

Universidade Técnica de Lisboa
Faculdade de Medicina Veterinária

Salsicharia tradicional da Zona do Pinhal

Caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos

João José Sotto Maior Salavessa

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

ORIENTADOR

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto

VOGAIS

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto

Doutor Miguel Nuno Geraldo Viegas Santos Elias

Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

Doutor Carlos Alberto Nunes dos Santos

2009
LISBOA

Universidade Técnica de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Salsicharia tradicional da Zona do Pinhal

Caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos

João José Sotto Maior Salavessa

DISSERTAÇÃO DE DOUTORAMENTO APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
DA UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

ORIENTADOR

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto

VOGAIS

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto

Doutor Miguel Nuno Geraldo Viegas Santos Elias

Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

Doutor Carlos Alberto Nunes dos Santos

**2009
LISBOA**

Para a Inês e a Rosarinho.

NOME - JOÃO JOSÉ SOTTO MAIOR SALAVESSA

DEPARTAMENTO - Produção Animal e Segurança Alimentar

DOUTORAMENTO EM - Ciência e Tecnologia Animal

ORIENTADOR - Prof. Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto

DATA - 4 de Setembro de 2008

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

Salsicharia tradicional da Zona do Pinhal

Caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos

RESUMO

Este trabalho visou caracterizar a tecnologia tradicional de fabrico dos Maranhos, determinar as suas características físico-químicas, microbiológicas e organolépticas, identificar os factores que limitam a sua conservação e que dificultam a sua distribuição, antecipar os potenciais perigos que possam advir do seu consumo e, experimentar alterações tecnológicas capazes de melhorar e adequar o produto às exigências do mercado actual. Idealizaram-se e experimentaram-se alterações tecnológicas assentes na conjugação de diferentes barreiras físico-químicas, testando-se a acção de diferentes combinações dos aditivos nitrito de sódio (E250), ácido ascórbico (E300), sorbato de potássio (E202) e metabissulfito de sódio (E223) em Maranhos processados termicamente, embalados a vácuo e conservados a 4 °C, recorrendo a ensaios de validade com controlo periódico dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais, estabelecidos de acordo com a sua relevância para a qualidade do produto. No Lote 2 e também no Lote 4 foi possível alargar a validade do produto já cozinhado para 3 semanas, cumprindo desta forma com as exigências da moderna distribuição e melhorando inclusivamente conforme foi perceptível pela avaliação do painel de provadores, algumas das suas características organolépticas.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos tradicionais; Produtos cárneos; Tecnologia de Barreiras; Cocção; Aditivos alimentares; REPFEDs.

Traditional meat products from “*Pinhal*” zone

Characterization and technological improvement of “*Maranhos*” manufacturing process

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize the traditional manufacturing process of “*Maranhos*” and determinate its physical-chemical, microbiological and sensorial attributes, identify the factors that compromises its shelf-life and commercial distribution, anticipate potentials hazards due to its consumption and experiment technological changes in order to improve and add value to the product according to the present market requirements. Technological changes based on the combined action of some different physical-chemical hurdles were idealized and experimented. The impact of some different combinations of food additives, sodium nitrite (E250), ascorbic acid (E300), potassium sorbate (E202) and sodium metabisulphite (E223) were evaluated by shelf-life trials, based on regular control of some previous established physical-chemical, microbiological and sensorial attributes considered relevant to the quality of refrigerated (4°C) vacuum packaged cooked “*Maranhos*”. An extension of 3 weeks at shelf-life of this cooked meat product was attained in batch 2 and also in batch 4, according to the requests of modern commercial distribution, improving also some of the product sensory attributes has it was revealed by the sensory analysis expertise’s.

KEY WORDS: Delicatessens; Meat products; Hurdle technology; Cooking; Food additives; REPFEDs.

Agradecimentos

Ao concluir este trabalho, olhando para trás, vejo que nem sempre tudo foi fácil e eventualmente foi como tinha de ser. A transposição das barreiras que se foram desvanecendo com o passar do tempo, foi em muito facilitada por ter contado com o apoio daqueles a quem agora me cabe agradecer.

Ao meu orientador Professor Doutor António Salvador Barreto, pela confiança, ensinamentos e motivação transmitida.

À Professora Doutora Marília Ferreira, pela ajuda e atenção dispensada sempre que necessário, especialmente na idealização e organização das apresentações públicas dos resultados deste trabalho.

À Professora Doutora Maria João Fraqueza, pela amizade, pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo que tomamos para nós próprios.

Ao Professor Doutor Tello da Gama pelos ensinamentos e apoio prestado no tratamento estatístico dos dados experimentais.

À Dr.^a Cristina Alfaia e marido pela amizade, pelo empréstimo de bibliografia rara e de referência, e pelo apoio na elaboração das fórmulas de estrutura apresentadas nesta tese.

Às técnicas do Laboratório de Tecnologia da Faculdade de Medicina Veterinária, Maria Helena na microbiologia e Eng.^a Maria José Fernandes na química, pela simpatia, amizade e disponibilidade sempre demonstrada em nos auxiliar no cumprimento dos nossos muitos trabalhos de laboratório.

À Sr.^a D. Maria, que entretanto já se aposentou, mas que enquanto esteve ao serviço do Laboratório de Tecnologia da Faculdade de Medicina Veterinária muito nos ajudou nas actividades de planeamento e organização do preparatório.

Aos que infelizmente já não se encontram connosco por terem partido desta vida, mas que nos acompanharam durante a execução de uma boa parte deste trabalho, fica a nossa eterna saudade do Professor Doutor Mário Ribeiro e da técnica do laboratório de microbiologia Paula Carapinha.

À Confraria do Maranhão pelo apoio e disponibilidade demonstrada na organização das sessões de prova, tão necessárias para se atingirem os objectivos deste trabalho.

Aos produtores de Maranhos que acederam em colaborar na realização deste trabalho, oferecendo parte das amostras, mas principalmente pela abertura de portas e facilidade na utilização das suas instalações, equipamentos e pessoal para a manufactura dos lotes a ensaiar.

Ao SNESup - Sindicato Nacional do Ensino Superior por todo o apoio recebido, e pelo esforço que se vê ser feito em prol da resolução dos inúmeros problemas que, infelizmente, vão por força das circunstâncias surgindo um pouco por todas as instituições de ensino superior deste país, mas que mais se sentem naquelas em que se nota maior fragilidade.

À FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, pela bolsa de investigação para doutoramento concedida com a referência: SFRH/BD/34186/2006.

Ao CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, por nos ter acolhido e ao nosso projecto, dentro da sua vasta e conceituada estrutura de investigação científica.

Agradeço ao meu pai e à minha mãe todo o apoio e o esforço que fizeram ao educar-me, na tentativa de que eu conseguisse alcançar os meus muitos objectivos de vida.

Às duas grandes mulheres com quem tenho partilhado a minha vida, a minha esposa Maria Inês e a minha pequena grande filha Maria do Rosário, um beijinho muito grande por todo o apoio e pela partilha dos sacrifícios que passámos juntos nesta fase da nossa vida.

Aos que eventualmente me falta aqui referir e que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Bem hajam todos.

Publicações científicas

Trabalhos de carácter científico publicados no âmbito desta dissertação de doutoramento:

Salavessa, J. & Barreto, A. (2009) – “Avaliação do potencial da utilização do nitrito de sódio, ácido ascórbico, sorbato de potássio e metabissulfito de sódio nos Maranhos”. 9º Encontro de Química dos Alimentos – Qualidade e Sustentabilidade. Sociedade Portuguesa de Química, Centro de Investigação e Tecnologia Agrária dos Açores. Angra do Heroísmo, Açores.

Salavessa, J. & Barreto, A. (2007) - "Ensaio sobre a tecnologia de fabrico dos Maranhos tradicionais da Beira Baixa". Livro de actas das Jornadas do Ensino Pós Graduado da FMV/Simpósio do CIISA. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

Salavessa, J. & Barreto, A. (2005) - “Novas perspectivas na tecnologia de produção dos Maranhos”. Livro de resumos do Congresso em Ciências Veterinárias 2005, 3º Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias. Estação Zootécnica Nacional, Fonte Boa, Portugal.

Salavessa, J. & Barreto, A. (2005) - “Influence of some combined preservative factors on the shelf life of “Maranhos”. Proceedings of 51th ICoMST – International Congress of Meat Science and Technology. Baltimore, USA.

Salavessa, J. & Barreto, A. (2004) - “Manufacturing process development on a ready to heat and eat Portuguese traditional product: Maranhos”. Proceedings of 50th ICoMST – International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finland.

Salavessa, J. & Barreto, A. (2003) – “Maranhos: Preliminary Physicochemical and Microbiological Characterization”. Proceedings of 49th ICoMST –International Congress of Meat Science and Technology and 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology. Campinas, Brasil.

Financiamentos

Este trabalho beneficiou do seguinte apoio financeiro:

Bolsa de Investigação no âmbito do POS _C - Desenvolver Competências -
Medida 1.2 da Fundação para a Ciência e Tecnologia Ref. SFRH/BD/34186/2006.

Índice geral

Agradecimentos	III
Publicações científicas	V
Financiamentos	VI
Índice geral.....	VII
Índice de quadros	XII
Índice de gráficos	XIV
Índice de figuras.....	XVI
Índice de abreviaturas	XVII
1 - Introdução	1
1.1 - Considerações sumárias sobre os Maranhos.....	1
1.2 - Produtos tradicionais e o desenvolvimento rural.....	2
1.3 - Objectivos integrantes do trabalho	7
2 - Revisão bibliográfica	8
2.1 - Deterioração dos alimentos.....	8
2.1.1 - Mecanismos responsáveis pela deterioração dos alimentos	10
2.1.1.1 - Transferência de humidade e/ou vapor de água	10
2.1.1.2 - Transferência física de outras substâncias.....	14
2.1.1.2.1 - Interações entre alimento e embalagem.....	15
2.1.2 - Alterações químicas e bioquímicas	17
2.1.2.1 - Oxidação	17
2.1.2.1.1 - Oxidação dos lípidos	17
2.1.2.1.2 - Oxidação dos pigmentos.....	26
2.1.2.1.3 - Oxidação das vitaminas	26
2.1.2.2 - Hidrólise	27
2.1.2.2.1 - Hidrólise dos lípidos.....	27
2.1.2.2.2 - Hidrólise dos prótidos.....	29
2.1.2.3 - Escurecimento dos alimentos	33
2.1.2.3.1 - Escurecimento enzimático	33
2.1.2.3.2 - Escurecimento não enzimático – Reacção de Maillard	34
2.1.3 - Actividade microbiológica nos alimentos	36
2.1.3.1 - Microrganismos saprófitas.....	40

2.1.3.1.1 - Bactérias Gram-negativas em forma de bastonete	45
2.1.3.1.2 - Bactérias Gram-positivas esporulantes	46
2.1.3.1.3 - Bactérias ácido lácticas	47
2.1.3.1.4 - Outras bactérias Gram-positivas	49
2.1.3.1.5 - Fungos	49
2.1.3.1.5.1 - Bolores	50
2.1.3.1.5.2 - Leveduras	53
2.1.2.4 - Microrganismos patogênicos	54
2.1.2.4.1 - <i>Clostridium botulinum</i>	57
2.1.2.4.2 - <i>Clostridium perfringens</i>	63
2.1.2.4.3 - <i>Escherichia coli</i>	68
2.1.2.4.4 - <i>Staphylococcus aureus</i>	71
2.1.2.4.5 - <i>Salmonella</i> spp.	75
2.1.2.4.6 - <i>Listeria monocytogenes</i>	79
2.2 - Conservação de alimentos	85
2.2.1 - Processamento térmico	93
2.2.1.1 - Cocção	101
2.2.2 - Temperaturas baixas	103
2.2.2.1 - Refrigeração	105
2.2.3 - Embalagem	111
2.2.4 - Alimentos processados refrigerados de vida útil prolongada	116
2.3 - Aditivos e auxiliares tecnológicos	120
2.3.1 - Importância dos aditivos e dos auxiliares tecnológicos	120
2.3.2 - Definição de aditivos alimentares e auxiliares tecnológicos	124
2.3.3 - Enquadramento legal para a utilização de aditivos alimentares	126
2.3.3.1 - Utilização de aditivos alimentares em produtos cárneos	131
2.3.3.1.1 - Nitratos e nitritos	134
2.3.3.1.2 - Ácido ascórbico e ascorbatos	142
2.3.3.1.3 - Ácido sórbico e sorbatos	145
2.3.3.1.4 - Dióxido de enxofre e sulfitos	148
3 - Material e métodos	154
3.1 - A tecnologia tradicional de produção dos Maranhos	154
3.2 - Estrutura do trabalho	156
3.2.1 - Análises físico-químicas	157

3.2.1.1 - Determinação da temperatura no centro térmico do produto .	157
3.2.1.2 - Determinação do pH.....	158
3.2.1.3 - Determinação da actividade da água (a_w).....	158
3.2.1.4 - Determinação da humidade	158
3.2.1.5 - Determinação da cinza total.....	159
3.2.1.6 - Determinação da proteína total.....	159
3.2.1.7 - Determinação da matéria gorda livre.....	159
3.2.1.8 - Determinação do valor energético	160
3.2.1.9 - Determinação do azoto básico volátil total (ABVT)	160
3.2.1.10 - Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA).....	160
3.2.1.11 - Determinação do índice de peróxidos (IP)	161
3.2.1.12 - Determinação do índice de acidez da gordura.....	161
3.2.1.13 - Determinação do teor em cloretos	161
3.2.1.14 - Determinação do teor em nitritos	162
3.2.1.15 - Determinação dos sulfitos totais.....	162
3.2.2 - Análises microbiológicas.....	162
3.2.2.1 - Preparação da amostra	162
3.2.2.2 - Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C	163
3.2.2.3 - Contagem de microrganismos aeróbios termotróficos	163
3.2.2.4 - Contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos.....	164
3.2.2.5 - Contagem de microrganismos anaeróbios psicrotróficos.....	164
3.2.2.6 - Contagem de bolores e leveduras	164
3.2.2.7 - Contagem de Enterobacteriaceae.....	165
3.2.2.8 - Contagem de bactérias ácido lácticas	165
3.2.2.9 - Contagem de <i>Escherichia coli</i>	165
3.2.2.10 - Pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores.....	165
3.2.2.11 - Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	166
3.2.2.12 - Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	166
3.2.2.13 - Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	167
3.2.3 - Análise sensorial.....	167
3.2.3.1 - Preparação e apresentação da amostra para análise sensorial	167
3.2.3.2 - Constituição do painel	168
3.2.3.3 - Avaliação sensorial.....	168
3.2.4 - Análise estatística	168

4 - Resultados e discussão	170
4.1 - Processamento térmico dos Maranhos	170
4.2 - Caracterização físico-química dos Maranhos tradicionais.....	173
4.2.1 - Caracterização físico-química dos Maranhos tradicionais.....	173
4.2.1.1 - pH.....	173
4.2.1.2 - Actividade da água (a_w)	175
4.2.1.3 - Composição centesimal.....	177
4.2.1.4 - Valor energético	180
4.2.1.5 - Teor de cloretos.....	181
4.2.1.6 - Azoto básico volátil total (ABVT).....	183
4.2.1.7 - Índice do ácido tiobarbitúrico (TBA).....	184
4.2.1.8 - Índice de peróxidos (IP).....	186
4.2.1.9 - Índice de acidez da gordura.....	187
4.3 - Caracterização microbiológica dos Maranhos tradicionais.....	188
4.3.1 - Microrganismos.....	188
4.3.1.1 - Aeróbios totais a 30 °C.....	188
4.3.1.2 - Aeróbios termotróficos.....	190
4.3.1.3 - Aeróbios psicrotróficos	192
4.3.1.4 - Anaeróbios psicrotróficos	193
4.3.1.5 - Fungos	194
4.3.1.6 - Enterobacteriaceae	197
4.3.1.7 - Bactérias ácido lácticas	198
4.3.1.8 - <i>Escherichia coli</i>	199
4.3.1.9 - Esporos de clostrídios sulfito-redutores.....	201
4.3.1.10 - <i>Staphylococcus aureus</i>	202
4.3.1.11 - <i>Salmonella</i> spp.	204
4.3.1.12 - <i>Listeria monocytogenes</i>	205
4.4 - Avaliação dos parâmetros físico-químicos nos Maranhos de tecnologia modificada.....	207
4.4.1 - pH.....	208
4.4.2 - Actividade da água (a_w)	209
4.4.3 - Humidade	210
4.4.4 - Cinza total	211
4.4.5 - Proteína total	212

4.4.6 - Matéria gorda livre	213
4.4.7 - Valor energético.....	214
4.4.8 - Azoto básico volátil total (ABVT)	215
4.4.9 - Índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)	217
4.4.10 - Índice de peróxidos (IP).....	218
4.4.11 - Índice de acidez da gordura	220
4.4.12 - Teor de cloretos	221
4.4.13 - Teor em nitritos	223
4.4.14 - Teor em sulfitos totais	225
4.5 - Avaliação da evolução dos parâmetros microbiológicos.....	226
4.5.1 - Microrganismos	226
4.5.1.1 - Aeróbios totais a 30°C	226
4.5.1.2 - Aeróbios termotróficos	228
4.5.1.3 - Aeróbios psicrotróficos.....	230
4.5.1.4 - Anaeróbios psicrotróficos.....	232
4.5.1.5 - Bolores.....	234
4.5.1.6 - Leveduras.....	235
4.5.1.7 - Enterobacteriaceae.....	237
4.5.1.8 - Bactérias ácido lácticas.....	239
4.5.1.9 - <i>Escherichia coli</i>	241
4.5.1.10 - Esporos de clostrídios sulfito-redutores.....	241
4.5.1.11 - <i>Staphylococcus aureus</i>	241
4.5.1.12 - <i>Salmonella</i> spp.....	242
4.5.1.13 - <i>Listeria monocytogenes</i>	243
4.6 - Análise sensorial.....	244
4.6.1 - Aspecto geral	245
4.6.2 - Cor	246
4.6.3 - Cor ao corte.....	248
4.6.4 - Cheiro	249
4.6.5 - Sabor	251
4.6.6 - Textura.....	252
5 - Conclusões e perspectivas futuras	255
6 - Bibliografia.....	258

Índice de quadros

Quadro 1 - Algumas limitações das formas tradicionais de conservação de alimentos baseadas na aplicação de uma barreira.....	87
Quadro 2 – Lista de procedimentos recomendados para impedir o potencial desenvolvimento e produção de toxinas por estirpes não proteolíticas de <i>C. botulinum</i> em REPFEDs.....	119
Quadro 3 - Aditivos permitidos na carne e produtos cárneos excepto corantes e edulcorantes*.....	132
Quadro 4 – Valores médios de pH dos Maranhos em função do processamento térmico.....	174
Quadro 5- Valores médios de a_w dos Maranhos em função do processamento térmico.....	176
Quadro 6 – Análise centesimal da Humidade, Cinza total, Proteína total e Matéria gorda livre dos Maranhos.....	178
Quadro 7- Valores médios do valor energético dos Maranhos em função do processamento térmico (kJ/100g).....	181
Quadro 8- Valores médios do teor em cloretos dos Maranhos em função do processamento térmico.....	182
Quadro 9 - Valores médios do ABVT dos Maranhos em função do processamento térmico (mg de NH_3 /100g).....	184
Quadro 10 - Valores médios do TBA dos Maranhos em função do processamento térmico (mg de aldeído malónico/kg).....	185
Quadro 11 - Valores médios do IP dos Maranhos em função do processamento térmico (miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura extraída).....	186
Quadro 12 - Valores médios de acidez dos Maranhos em função do processamento térmico (% de ácido oleico na gordura extraída).....	188
Quadro 13 - Valores médios das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).....	189
Quadro 14 - Valores médios das contagens de microrganismos aeróbios termotróficos nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).....	191
Quadro 15 - Valores médios das contagens de microrganismos aeróbios psicrotróficos nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).....	193
Quadro 16 - Valores médios das contagens de microrganismos anaeróbios psicrotróficos nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).....	194
Quadro 17 - Valores médios das contagens de bolores nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).....	196
Quadro 18 - Valores médios das contagens de leveduras nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).....	196
Quadro 19 - Valores médios das contagens de Enterobacteriaceae nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).....	197
Quadro 20 - Valores médios das contagens de BAL nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).....	199
Quadro 21 - Valores médios das contagens de <i>Escherichia coli</i> nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).....	200
Quadro 22 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução do ABVT nos diferentes lotes em estudo.....	217

Quadro 23 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução do IP nos diferentes lotes em estudo.....	220
Quadro 24 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução do teor em nitritos nos diferentes lotes em estudo.....	225
Quadro 25 - Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C nos diferentes lotes em estudo.....	228
Quadro 26 - Coeficientes das equações lineares ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução das contagens de microrganismos aeróbios termotróficos nos diferentes lotes em estudo.	230
Quadro 27 - Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de microrganismos aeróbios psicrotróficos nos diferentes lotes em estudo.....	232
Quadro 28 - Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de microrganismos anaeróbios psicrotróficos nos diferentes lotes em estudo.....	234
Quadro 29 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução das contagens de bolores nos diferentes lotes em estudo.....	235
Quadro 30 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução das contagens de leveduras nos diferentes lotes em estudo.....	237
Quadro 31 - Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de Enterobacteriaceae nos diferentes lotes em estudo.....	239
Quadro 32 - Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de BAL nos diferentes lotes em estudo.....	240

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Representação gráfica de uma curva de morte térmica e do respectivo tempo de redução decimal (D). (Stoforos & Taoukis, 2006).	95
Gráfico 2 – Representação gráfica da obtenção do valor da taxa de morte térmica (z) a partir do tempo de redução decimal (D). (Stoforos & Taoukis, 2006).	97
Gráfico 3 – Evolução média das temperaturas ao longo do processamento térmico.	171
Gráfico 4 – Composição centesimal dos Maranhos cozidos.	179
Gráfico 5 – Ocorrência de esporos de clostrídios sulfito redutores em Maranhos não processados (NP) e processados termicamente (P).	202
Gráfico 6 - Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> em Maranhos não processados (NP) e processados termicamente (P).	203
Gráfico 7 - Ocorrência de <i>Salmonella</i> spp. em Maranhos não processados (NP) e processados termicamente (P).	205
Gráfico 8 - Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em Maranhos não processados (NP) e processados termicamente (P).	206
Gráfico 9 – Evolução média do valor de pH nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	208
Gráfico 10 - Evolução média do valor de a_w nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	210
Gráfico 11 - Evolução média do teor de humidade nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	211
Gráfico 12 - Evolução média do teor de cinza total nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	212
Gráfico 13 - Evolução média do teor de proteína total nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	213
Gráfico 14 - Evolução média do teor de matéria gorda livre total nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	214
Gráfico 15 - Evolução média do valor energético nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	215
Gráfico 16 - Evolução média do ABVT nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	216
Gráfico 17 - Evolução média do TBA nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	218
Gráfico 18 - Evolução média do IP nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	219
Gráfico 19 - Evolução média do índice de acidez da gordura nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	221
Gráfico 20 - Evolução média do teor em cloretos nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	222
Gráfico 21 - Evolução média do teor em nitritos nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	223
Gráfico 22 - Evolução média do teor em sulfitos nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.	226
Gráfico 23 – Evolução das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4 °C.	227
Gráfico 24 - Evolução das contagens de microrganismos aeróbios termotróficos nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.	229
Gráfico 25 - Evolução das contagens de microrganismos aeróbios psicrotróficos nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.	231

Gráfico 26 - Evolução das contagens de microrganismos anaeróbios psicrotróficos nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.	233
Gráfico 27 - Evolução das contagens de bolores nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.	235
Gráfico 28 - Evolução das contagens de leveduras nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.	236
Gráfico 29 - Evolução das contagens de Enterobacteriaceae nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.	238
Gráfico 30 - Evolução das contagens de BAL nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.	240
Gráfico 31 - Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase + nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.	242
Gráfico 32 - Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.	244
Gráfico 33 – Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente ao aspecto geral.	246
Gráfico 34 - Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente à cor.	247
Gráfico 35 – Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente à cor ao corte.	249
Gráfico 36 - Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente ao cheiro.	250
Gráfico 37 – Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente ao sabor.	252
Gráfico 38 - Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente à textura.	253

Índice de figuras

Figura 1 – Localização geográfica do Pinhal Interior Sul em Portugal Continental.....	1
Figura 2 – Reacção da formação em meio ácido, de ácido nitroso a partir do nitrito...136	136
Figura 3 - Fórmula da estrutura do grupo heme da molécula de mioglobina (Fe – protoporfirina IX).....	136
Figura 4 – Fórmula da estrutura da molécula de ácido ascórbico.....	143
Figura 5 – Fórmula da estrutura da molécula de ácido sórbico.	145
Figura 6 – Diferentes tipos de equilíbrio entre sulfitos.....	150
Figura 7 - Diagrama de fabrico dos Maranhos.....	154

Índice de abreviaturas

%(m/m) – Percentagem em massa.

* - Significante ($p < 0,05$).

** - Muito significante ($p < 0,01$).

ABVT – Azoto básico volátil total.

a_w – Actividade da água.

BAL – Bactérias ácido lácticas.

BHA – hidroxianisol butilado.

BHT – hidroxil-tolueno butilado.

CE – Comunidade Europeia.

CEE – Comunidade Económica Europeia.

DDA – Dose diária admissível.

GLM – General linear model.

HACCP – Hazard analysis critical control point.

IP – Índice de peróxidos.

L_1 – Lote 1.

L_2 – Lote 2.

L_3 – Lote 3.

L_4 – Lote 4.

lag – Fase de latência.

log ufc/g – Logaritmo das unidades formadoras de colónias por grama.

N.S. – Não significante.

NP – Não processados.

°C – Grau Celsius.

p – Probabilidade.

P – Processado.

PAC – Política Agrícola Comum.

pH – Potencial hidrogeniónico.

REPFED – Refrigerated processed product of extended durability.

s – Desvio padrão.

s% - Coeficiente de variação.

TBA – Índice do ácido tiobarbitúrico.

desde sempre um sector de actividade zootécnica muito importante, tendo chegado a contabilizar um efectivo de mais de 100.000 cabras (Salavessa, 2000).

Os Maranhos são um produto destinado a ser consumido depois de cozido, que tem como ingredientes principais a carne de cabra e o arroz, sendo por vezes enriquecido com chouriço, toucinho ou presunto. Esta mistura é temperada com vinho, sal e hortelã (*Mentha* spp.), sendo posteriormente ensacada em invólucros especialmente elaborados para o efeito a partir das buchadas, compartimentos gástricos da cabra (Carvalho, 1999).

A valorização dos produtos agrícolas e agro-alimentares passa pela aquisição de dimensão competitiva mediante a concentração da oferta, a modernização tecnológica, a valorização dos recursos humanos e o desenvolvimento de técnicas de comercialização, capazes de salientar junto dos consumidores nacionais e estrangeiros, a qualidade, a origem e os modos particulares de produção desses produtos (Soeiro, 1998).

Os Maranhos são um produto regional muito apreciado pelos Beirões e com destaque na gastronomia local, o que justifica a sua procura por todos os que visitam a Beira Baixa e que proporcionam um crescente na actividade turística da região.

São muitos os que entre boas recordações levam também na bagagem os Maranhos e a vontade de os poder experimentar novamente no regresso à sua vida quotidiana; porém, a produção de Maranhos encontra-se limitada por dificuldades de ordem tecnológica que têm contrariado a expansão da sua distribuição.

1.2 - Produtos tradicionais e o desenvolvimento rural

Não é fácil definir de forma clara o conceito de produto tradicional, sendo variadas as interpretações encontradas de acordo com diferentes autores (Tibério, 1998).

Os produtos tradicionais são produtos únicos, que resultam das matérias-primas e dos conhecimentos aplicados, dos usos e práticas de produção, de consumo e de distribuição, que actualmente recebem entre outras, as denominações de produto local, tradicional, artesanal ou regional (Ribeiro & Martins, 1996).

Também são referidos como sendo, em sentido lato, produtos identificáveis pela sua origem geográfica, pelo seu processo de produção e pelas suas qualidades intrínsecas (Tibério, 1998).

Designam-se, também, por produtos espacialmente ligados a um território e culturalmente a costumes ou modos de fazer, com um mínimo de permanência no tempo ou antiguidade, detentores de características qualitativas particulares que os diferenciam dos outros produtos (Caldentey & Gomez, 1996).

Os produtos são tradicionais porque persistem no tempo, sempre se fizeram num determinado lugar e de uma determinada maneira e conservam, em maior ou menor grau, as características que os definem em termos sensoriais (Bernat, 1996).

Portugal, fruto da sua baixa competitividade, está inserido no grupo de países periféricos europeus que vêem os seus esforços de desenvolvimento e modernização da agricultura dificultados (Lourenço, 2001). Neste contexto, os produtos tradicionais agrícolas e agro-alimentares são hoje em dia apontados como um pilar fundamental na resolução de alguns dos problemas do mundo rural (Tibério, 1998).

A produção e comercialização de produtos tradicionais constituem em si uma oportunidade de diversificação dos rendimentos dos agricultores, contribuindo para a desejada fixação de populações rurais nos seus locais de origem (Teixeira, 1998).

A valorização comercial dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios que, ou pela sua origem ou pelos seus modos de produção se distinguem dos produtos similares correntes no mercado, pode contribuir significativamente para a melhoria dos rendimentos dos produtores, para a salvaguarda da genuinidade de recursos importantes das regiões desfavorecidas e dos modelos de agricultura extensivos aí existentes, que por vezes são predominantes (Soeiro, 1998).

A necessidade e capacidade de obter produtos de qualidade, surge actualmente quer em programas de desenvolvimento rural, quer no discurso político generalizado, como uma importante via para assegurar o desenvolvimento em zonas que tradicionalmente se dedicam à agricultura e produção de alimentos tradicionais (Dinis, 1995; Silva *et al.*, 2000).

Para além das componentes históricas e culturais, os produtos agrícolas e agro-alimentares com características qualitativas especiais podem desempenhar um papel relevante numa perspectiva de desenvolvimento rural, constituindo um elemento

estruturante da Política Agrícola Comum (PAC) (Soeiro, 1998). Esta percepção tem levado à incorporação da questão da qualidade na concepção de instrumentos de política sectorial, bem visível, no caso da PAC, através do reconhecimento e apoio à agricultura biológica e também no incentivo à regulamentação de Denominações de Origem Protegida, Indicações Geográficas Protegidas e Certificados de Especificidade, que visam a valorização dos produtos baseada essencialmente na sua qualidade (Dinis, 1995).

Simultaneamente, tem-se verificado também uma tendência crescente de largos sectores de consumo urbano para privilegiar a qualidade na sua alimentação, em particular através do consumo de produtos específicos com uma origem geográfica determinada, o que tem contribuído para a revalorização dos produtos tradicionais (Teixeira, 1998).

Portugal, tal como a maioria dos países mediterrâneos, possui um rico património de produtos agrícolas e agro-alimentares cujas características qualitativas são devidas quer à sua origem geográfica quer ao seu modo particular de produção, assente em hábitos ancestrais, métodos locais, leais e constantes, que interessa preservar e transmitir às gerações vindouras (Soeiro, 1998).

É hoje objecto de largo consenso que não só nos países em vias de desenvolvimento mas também nos países desenvolvidos, a agricultura é indispensável para o crescimento das zonas rurais mais desfavorecidas e que a sua sobrevivência depende, em muitos casos, de estratégias assentes na qualidade, particularmente através de produções específicas e originais, orientadas para determinados segmentos e nichos de mercado (Dinis, 1995).

O crescente interesse pelos produtos agrícolas tradicionais e regionais e o papel que hoje lhes é atribuído no desenvolvimento de algumas zonas rurais, tem que ver por um lado com a necessidade de solucionar ou pelo menos atenuar, os efeitos dos modelos de desenvolvimento dominantes sobre o espaço rural e a percepção de que essas soluções não poderão, no quadro actual de globalização da economia, basear-se numa agricultura do tipo produtivista, especialmente nas zonas natural e estruturalmente mais débeis; por outro lado, a revalorização, dentro de um contexto ideológico essencialmente urbano, do património rural nas suas vertentes natural e cultural, como ligação nostálgica a um passado e pretensão regresso às raízes e às tradições; por outro

lado ainda, as atitudes de alguns sectores de consumo urbano, marcadas por alguma desconfiança relativamente à qualidade dos alimentos industriais e por uma crescente apetência por produtos naturais associados à tradição (Dinis, 1995; Teixeira, 1998).

Os sistemas de produção tradicionais, têm uma forte interligação com a história e o espaço rural, utilizam tecnologias mais respeitadoras do equilíbrio ambiental e da paisagem, são pouco intensivos em capital e bastante intensivos em trabalho, especialmente quando na própria exploração se procede à transformação das produções agrícolas. Neste tipo de explorações, o rendimento proveniente das actividades agrícolas pode ser complementado com actividades não agrícolas como o turismo, o lazer, ou a transformação das produções agrícolas em produtos alimentares de elevada qualidade, permitindo uma ocupação mais intensa da mão-de-obra e uma melhor remuneração do trabalho familiar (Dinis, 1995).

A diminuição crescente da relevância da agricultura na evolução do emprego local e no desenvolvimento rural, levou a que fossem dados novos usos ao espaço rural, como as actividades de lazer, as habitações secundárias ou as formas alternativas de turismo, revestindo-se todas elas de crescente interesse económico para o meio rural português (Lourenço, 2001).

Assim, paralelamente aos pequenos negócios, ao artesanato e às actividades turísticas, as estratégias de diversificação das economias rurais têm vindo a colocar uma grande ênfase na produção agrícola de qualidade, o que se traduz no apoio aos produtos ou potencialidades específicas de cada zona, em especial os produtos artesanais raros, com elevado valor acrescentado e valorizando o saber-fazer tradicional e local (Cavaco, 1995).

Importa substituir a saída das matérias-primas em bruto para fora das regiões de origem, por uma transformação no local e conseqüente personalização dos produtos, designadamente pela criação de uma imagem de marca da zona, retendo na origem uma boa parte do valor acrescentado aos produtos (Dinis, 1995).

É hoje consensual que é preciso a partir de produções adaptadas produzir matéria-prima de qualidade, valorizá-la transformando-a num produto alimentar de qualidade, e realizar uma comercialização eficaz (Pujol, 1997).

Do sucesso deste tipo de estratégias depende a manutenção de uma agricultura local, sector de actividade indispensável à vida económica e social das zonas em questão.

Contudo, o êxodo rural determinou uma diminuição da produção de salsicharia tradicional de qualidade, encontrando-se a oferta destes produtos muito aquém da procura no mercado, pelo que a produção industrial e semi-industrial assumiu o fabrico de produtos tradicionais como, por exemplo, o chouriço, salpicão e alheira (Esteves, 2005).

Para que uma política agrícola baseada na qualidade tenha sucesso é preciso que integre formas de protecção dos produtos agrícolas ou alimentares, identificáveis pela sua proveniência geográfica, o seu modo de produção e as suas qualidades específicas que, por um lado, protejam os produtores da competição de produtos não genuínos, permitindo-lhes praticar preços mais elevados como contrapartida de um real esforço qualitativo, e, por outro, evidenciem junto dos consumidores as características especiais dos produtos, protegendo-os de práticas desleais e imitações (Dinis, 1995).

A criação e promoção de denominações de origem como construções sociais que associam a manutenção da actividade agrícola à protecção de um produto regional obtido a partir de matérias-primas e saber-fazer de origem local podem, portanto, constituir um eixo interessante de desenvolvimento endógeno nas zonas rurais marginalizadas, onde subsistem práticas tradicionais de produção (Dinis, 1995).

A concorrência da grande indústria agro-alimentar incitou, durante algumas décadas, os artesãos e pequenos industriais a adoptar estratégias de resistência, fundadas em parte na defesa da qualidade dos produtos, tendo assim surgido dispositivos de regulamentação e certificação de qualidade não obrigatórios que permitem distinguir produtos com características específicas de produtos de massa homólogos (Sylvander, 1994).

Neste cenário, tem-se também verificado uma vontade comum entre os produtores de Maranhos em desenvolver novas formas de apresentação do produto, buscando uma solução dentro da filosofia dos pratos pré-cozinhados, mas tal desígnio terá simultaneamente de garantir a segurança alimentar do consumidor e a genuinidade do produto tradicional, para que possa reflectir-se no aumento das vendas.

1.3 - Objectivos integrantes do trabalho

Os produtos de salsicharia, especialmente os enchidos, constituem uma das mais antigas formas de processamento dos alimentos (Varnam & Sutherland, 1995).

A preocupação com a necessidade de preservação dos alimentos terá levado o Homem, talvez por intuição, a criar os enchidos, recorrendo a invólucros de tripa animal que encheu de carne picada, originando assim um dos mais antigos produtos alimentares processados (Esteves, 2005).

Hoje, continua a ser importante produzir alimentos cárneos de baixo preço, de alto valor proteico, com boas qualidades gastronómicas, e simultaneamente com um bom poder de conservação e sanitariamente seguros (Sousa & Ribeiro, 1983).

Nos Maranhos, a produção industrial é ainda muito semelhante à produção doméstica, diferindo basicamente na diversidade da origem das matérias-primas utilizadas e na dimensão da produção, mas persistindo os problemas de conservação e, conseqüentemente, de distribuição do produto.

Além disso a procura, a pressão comercial associada à produção industrial, leva a que frequentemente se desvirtue a receita e se utilize carne de ovino em detrimento da carne de caprino que tradicionalmente era a única carne usada na confecção dos Maranhos.

Assim, pretendeu-se fazer o levantamento e a descrição da tecnologia de fabrico actualmente utilizada e, simultaneamente, contribuir para a caracterização físico-química e microbiológica deste produto regional de características organolépticas únicas.

Posteriormente, visando facilitar e promover a distribuição e o consumo dos Maranhos, não descuidando as características que lhes são tradicionalmente associadas nem as questões relacionadas com a segurança alimentar, ensaiaram-se alterações tecnológicas no âmbito do desenvolvimento e aplicação de uma tecnologia de barreiras eficaz na conservação do produto.

2 - Revisão bibliográfica

2.1 - Deterioração dos alimentos

Os géneros alimentícios podem ser constituídos por um só ingrediente, mas em muitos casos são-no por vários, podendo incluir para além das matérias-primas tradicionais certas substâncias com propriedades tecnológicas ou organolépticas características (Dias, 1989; Haard, 1998; Man, 2002).

A deterioração de um alimento é algo inevitável que se inicia imediatamente após a colheita, o abate ou a manufactura do produto, e o acompanha ao longo do tempo de armazenamento e distribuição que antecede o seu consumo final. Pode então ser entendida como qualquer alteração que torna o alimento inaceitável para o consumo humano, que é resultado da acção de um ou mais mecanismos que podem desenvolver-se simultaneamente (Huis in't Veld, 1996; Singh, 1996; Cardello, 1998; Wells & Singh, 1998; Leistner & Gould, 2002)

O conhecimento e a compreensão dos mecanismos de deterioração dos alimentos permitem identificar e posteriormente controlar os factores de maior relevância para a sua eficiente conservação, atrasando ou minimizando a sua extensão e impacto na longevidade comercial desejada, enquanto não for possível impedir completamente a sua deterioração (Ellis, 1996; Wells & Singh, 1998; Man, 2002).

Quando os alimentos não são submetidos a nenhum tratamento, a deterioração microbiana é a principal responsável pela perda de qualidade e de segurança, porém, mesmo quando sujeitos a tratamentos que visam reduzir ou eliminar a flora microbiana, ocorrem processos físico-químicos de deterioração que passam a determinar a longevidade e as alterações na qualidade do produto (Walker, 1996; Taub & Singh, 1998).

A deterioração dos alimentos contribui para a ocorrência de avultadas quebras económicas, estimando-se que nos países desenvolvidos cerca de 25% dos alimentos se perde exclusivamente por acção dos microrganismos, principalmente psicrotróficos, bolores e leveduras, contrariamente ao que acontece nos países em desenvolvimento cujas principais quebras resultam da acção de pragas (Walker, 1996; Huis in't Veld, 1996).

Um alimento deteriorado poderá, algumas vezes, ser facilmente reconhecido como tal, por exemplo, como quando se verificam alterações físicas, crescimento visível de microrganismos, formação de visco ou danos provocados por insectos. Porém, frequentemente é difícil a identificação de alguns mecanismos responsáveis por reacções químicas, bioquímicas e/ou microbiológicas com consequências na qualidade dos alimentos (Huis in't Veld, 1996; Cardello, 1998). Nestes casos, torna-se imprescindível o recurso à análise laboratorial dos alimentos, que sendo mais objectiva, permite que para alguns produtos se possam estabelecer e utilizar índices químicos, bioquímicos e critérios microbiológicos capazes de avaliar o seu grau de deterioração (Ellis, 1996; Cardello, 1998).

Actualmente, para além do interesse económico associado à deterioração dos alimentos, procura-se garantir a segurança alimentar, tomando todas as medidas e condições necessárias ao longo da produção, processamento, armazenamento, distribuição e preparação culinária dos alimentos, que garantam que estes são seguros, saudáveis e adequados para o consumo humano (Miller, 1984).

Nos países desenvolvidos atingiu-se um nível de segurança sanitária dos alimentos manifestamente superior ao registado há algumas décadas, e que ainda persiste em países subdesenvolvidos. Este facto não invalida que, excepcionalmente ocorram incidentes na cadeia alimentar humana, já que os géneros alimentícios poderão conter doses residuais de certos elementos ou compostos provenientes das matérias-primas, dos aditivos, das embalagens, do ambiente ou do processo de fabrico, cuja presença embora indesejável poderá ser de todo impossível de evitar (Dias, 1989).

A possibilidade de ocorrência destes incidentes, associada a uma expansão da alimentação colectiva, da preparação industrial de alimentos e crescente proporção de indivíduos imunocomprometidos, exige uma participação cada vez mais responsável de todos os intervenientes na cadeia trófica. Tanto mais que, para além da população humana ter aumentado cerca de 3,3 vezes nos últimos cem anos, houve uma deslocação populacional do espaço rural para ambientes urbanos, sendo cada vez menor a população envolvida na produção primária de alimentos, o que obviamente requer que o sistema de produção e distribuição alimentar seja cada vez mais eficiente (Hubbert *et al.*, 1996; Soares, 2003).

2.1.1 - Mecanismos responsáveis pela deterioração dos alimentos

Quando se pretende definir estratégias tecnológicas que visem retardar a deterioração dos alimentos e, conseqüentemente, minimizar as perdas na sua qualidade, é fundamental conhecer e compreender a natureza dos fenómenos responsáveis pela instabilidade das diferentes fracções constituintes dos géneros alimentícios, bem como os factores que permitem controlar essa instabilidade (Ellis, 1996; Sinhg, 1996).

Sendo, actualmente, o principal objectivo dos responsáveis pela produção e distribuição de alimentos fornecer produtos seguros, nutritivos, de elevada qualidade e que sejam do agrado do consumidor, isso implica a capacidade de contrariar a instabilidade natural das principais fracções constituintes dos alimentos e/ou de escolher condições de armazenamento que minimizem a cinética das reacções responsáveis pela sua deterioração (Ellis, 1996; Taub & Singh, 1998).

2.1.1.1 - Transferência de humidade e/ou vapor de água

A água é, em muitos produtos alimentares, o principal componente, tendo cada alimento um conteúdo característico (Le Meste *et al.*, 2006).

Dependendo da quantidade, localização e orientação, a água é crucial nos processos vitais e influencia profundamente a estrutura, aspecto e sabor dos alimentos, interferindo inevitavelmente na respectiva susceptibilidade à alteração (Fennema, 1993).

Por si só a água não é apenas um meio onde ocorrem reacções químicas e bioquímicas, é também um reagente e participa nalgumas delas; já do ponto de vista microbiológico, a água é um dos factores mais críticos e influencia decisivamente a ocorrência ou não de desenvolvimento microbiano (Lenovich, 1987; Troller, 1987; Le Meste *et al.*, 2006).

São muito diversos os alimentos sensíveis às variações de humidade e, dependendo do sentido de transferência da humidade ou vapor de água, são inúmeras as

situações que podem ocorrer, como sejam o emurchecimento de produtos vegetais frescos, o amolecimento de biscoitos e cereais, o endurecimento do pão e a “queimadura” pelo frio da carne congelada, resultante da sublimação do gelo (Bourne, 1987; Man, 2002).

Os fenómenos de transferência de humidade e vapor de água ocorrem sempre que se verifica um gradiente de potencial hídrico; nos produtos compostos, este processo ocorre entre as várias componentes adjacentes do produto e continua mesmo a temperaturas inferiores a 0 °C até que se atinja um equilíbrio e se anule o gradiente inicial (Man, 2002; Le Meste *et al.*, 2006).

A água nos alimentos encontra-se retida por acção de diferentes mecanismos físico-químicos. A água não ligada constitui frequentemente a principal fracção dum alimento; pode encontrar-se livre ou retida por matrizes de moléculas que evitam a sua exsudação, comportando-se de forma muito idêntica à da água pura no decorrer dos processos de transformação dos alimentos, influenciando decisivamente a mesma, permitindo velocidades rápidas para a maioria das reacções químicas e o crescimento microbiano (Fennema, 1993; Cybulska & Doe, 2002).

Por água ligada deve entender-se a água que existe na vizinhança dos solutos e outros constituintes não aquosos, que exhibe reduzida mobilidade molecular e outras propriedades significativamente alteradas, comparativamente com as da água não ligada que existe no mesmo sistema e que não congela a -40 °C (Fennema, 1993).

A água ligada pode, por sua vez, subdividir-se em três tipos, água de constituição, água vicinal e água de multicamada. A água de constituição encontra-se fortemente ligada aos constituintes não aquosos do alimento, está situada por exemplo nos interstícios das proteínas ou faz parte de hidratos, não se encontrando disponível para reagir. Em termos de tenacidade da ligação segue-se a água vicinal, que ocupa os sítios da primeira camada dos grupos mais hidrófilos dos constituintes não aquosos, iões e grupos iónicos. Segue-se a água de multicamada, que ocupa os restantes sítios da primeira camada formando várias capas por detrás da água vicinal e que, estando menos fortemente ligada, se encontra ainda suficientemente próxima dos constituintes não aquosos para que as suas propriedades se encontrem alteradas (Fennema, 1993; Cybulska & Doe, 2002).

A água ligada não está totalmente imobilizada, sendo que à medida que aumenta o grau de ligação, diminui a velocidade com que uma molécula de água muda de lugar, sem normalmente se atingir o zero. A eventual remoção da água de constituição permitiria a autooxidação dos constituintes não aquosos, e assim, a estabilidade global será ótima quando o valor de actividade da água é coincidente com a água vicinal. Para além desse valor, o aumento do conteúdo em água está invariavelmente associado ao aumento da velocidade de quase todas as reacções (Fennema, 1993).

Ainda que importante, a água ligada nos alimentos com elevado teor de humidade está presente em quantidades relativamente pequenas, estimando-se que a água ligada aderente às proteínas oscila entre 30 a 50% do seu peso seco, considerando-se por isso mais vantajosa a utilização do conceito de actividade da água (Cheftel *et al.*, 1993; Fennema, 1993).

Desde 1929 que se reconhece que a estabilidade química e microbiológica dos alimentos, e conseqüentemente o seu poder de conservação, não está directamente relacionado com o seu teor em água mas antes com uma sua propriedade designada por actividade da água (a_w) (Cybulska & Doe, 2002; Le Meste *et al.*, 2006).

O a_w é um parâmetro que exprime a fracção da água do alimento que está disponível para participar no metabolismo microbiano, actividade enzimática, e reacções físico-químicas. É definido como a razão entre a pressão parcial de vapor de água no alimento e a da água pura à mesma temperatura (Lenovich, 1987; Sablani *et al.*, 2007).

Como a água presente nos alimentos tem diferentes disponibilidades, a principal forma de determinar o grau de imobilização da água no alimento é mediante a determinação do valor de a_w relacionando-o depois com o teor de humidade. O a_w , baseado no conceito termodinâmico de potencial químico da água em soluções, serve assim de referência para o controlo do comportamento da água no sistema constituído pelo alimento (Le Maguer, 1987, Sablani *et al.*, 2007).

A relação entre a quantidade de água e o a_w não é linear, só podendo ser obtida analiticamente determinando o a_w correspondente a diferentes teores em água a temperatura constante. O resultado é, para a maioria dos alimentos, uma curva sigmóide denominada isoterma de sorção, que pode ser calculada para diferentes temperaturas

através da equação de Clausius-Clapeyron da termodinâmica clássica (Cybulska & Doe, 2002; Le Meste *et al.*, 2006; Sablani *et al.*, 2007).

Em soluções ideais, o a_w pode ser relacionado com a fracção molar da água, dependendo da concentração das substâncias dissolvidas, mas, os solutos raramente apresentam propriedades ideais, havendo possibilidade de dissociação ou interacção entre moléculas. Na matriz de um alimento, todo este fenómeno se torna ainda mais complexo (Le Maguer, 1987).

O a_w desempenha um importante papel no que diz respeito ao desenvolvimento dos microrganismos, porém a influência que este factor tem sobre a sua morte e sobrevivência é complexa, existindo múltiplos factores extrínsecos e intrínsecos que influenciam esta relação, que difere para os diferentes tipos de alimento, processamento e microflora envolvida (Lenovich, 1987).

Mesmo, a valores baixos de a_w , capazes de impedir o desenvolvimento microbiano, várias reacções químicas continuam a ocorrer, podendo mesmo acelerar como as reacções de Maillard, que conduzem a perdas de lisina e ao escurecimento não enzimático e apresentam um pico de actividade para valores compreendidos entre 0,5 e 0,8, e a oxidação lipídica não enzimática que aumenta rapidamente a valores de a_w inferiores a 0,4 (Cybulska & Doe, 2002; Sablani *et al.*, 2007).

Muitos dos processos unitários utilizados para a estabilização dos alimentos têm como objectivo, remover ou tornar inactiva a água contida nos alimentos, como acontece respectivamente, na secagem, evaporação, congelação e imobilização em géis (Le Maguer, 1987; Le Meste *et al.*, 2006).

Na carne, o conteúdo aquoso é proveniente principalmente do tecido muscular, composto por cerca de 75% de água, cuja retenção é feita por mecanismos ainda não completamente esclarecidos. Estima-se que 5% pode estar quimicamente ligada às proteínas, 25% estará retida por capilaridade e pode ser esgotada sob pressão e 45% está firmemente retida por mecanismos ainda desconhecidos. O tecido adiposo contém apenas 10% de água, que se encontra retida nas membranas celulares dos adipócitos (Ranken, 2000).

É possível distinguir três diferentes graus de disponibilidade da água na carne. Água sem actividade, correspondendo a um a_w inferior a 0,2 e que não pode ser manipulada tecnologicamente; água com actividade reduzida mas que permite a

ocorrência de deterioração enzimática e físico-química, com um a_w entre 0,2 e 0,8; e água com uma actividade superior a 0,8 que permite o crescimento microbiano e outras reacções de deterioração, mas que é susceptível de manipulação tecnológica (Correia & Correia, 1985).

A água dos produtos de salsicharia bem como a sua disponibilidade é, pois, decorrente das matérias-primas utilizadas e dos procedimentos tecnológicos a que os produtos são submetidos no decorrer do seu processamento, passando o seu controlo pela remoção da água por desidratação ou indisponibilizando-a no seio do produto, principalmente pela adição de humectantes (Patarata, 1995^a; Leistner & Gould, 2002).

2.1.1.2 -Transferência física de outras substâncias

A transferência física entre os alimentos e o meio envolvente de outras substâncias que não a água, também pode afectar a qualidade do produto e deste modo contribuir para a sua deterioração, comprometendo o respectivo tempo de conservação (Hernández-Muñoz *et al.*, 2002; Man, 2002).

As interacções dos alimentos com as embalagens e com o meio exterior através da embalagem assumem um papel fundamental na qualidade dos produtos, sendo de referir não só aspectos toxicológicos e de inocuidade, mas também organolépticos que determinam a vida útil do produto acondicionado (Stöllman *et al.*, 1996; Poças & Oliveira, 1997).

São exemplos de transferências que ocorrem do alimento para o meio envolvente a perda de dióxido de carbono nas bebidas carbonatadas, ou a absorção de compostos aromáticos pelo material da embalagem e, no sentido inverso, a aquisição pelo alimento de cores e sabores estranhos inculidos pela embalagem ou ambiente envolvente, e a migração de substâncias como monómeros, aditivos ou metais pesados desde as embalagens para o alimento (Stöllman *et al.*, 1996; Hernández-Muñoz *et al.*, 2002; Man, 2002).

2.1.1.2.1 - Interações entre alimento e embalagem

A preocupação com as interações entre alimentos e embalagens baseia-se do ponto de vista toxicológico, no perigo potencial de toxicidade crónica resultante da ingestão prolongada de determinados compostos presentes em quantidades muito pequenas e, do ponto de vista organoléptico e nutricional, em problemas específicos ao nível da aceitação pelo consumidor de alterações do sabor ou outros aspectos característicos do género alimentício (Poças & Oliveira, 1997; Hernández-Muñoz *et al.*, 2002).

As interações entre as embalagens e os produtos alimentares, podem classificar-se em 4 grandes grupos - migração de componentes da embalagem para o alimento; permeabilidade ao vapor de água, a gases e aromas; absorção de componentes do produto alimentar pelo material; e transparência à luz, em particular a ultravioleta (Poças & Oliveira, 1997).

A transferência de substâncias da embalagem para o alimento é normalmente classificada em migração global e migração específica, compreendendo a primeira a totalidade dos componentes cedidos e a segunda a determinação de compostos bem identificados (Poças & Oliveira, 1997).

A migração, ou mais genericamente as interações físico-químicas, depende por um lado da natureza do material de embalagem e da concentração da substância migrante, e por outro lado das características físico-químicas do alimento, das condições de temperatura e do tempo de contacto (Hernández-Muñoz *et al.*, 2002; Tehrany *et al.*, 2006).

Os polímeros usados em embalagens plásticas são materiais bastante inertes devido ao tamanho e estrutura das suas macromoléculas, no entanto, a presença de moléculas mais pequenas e de maior mobilidade, com origem em substâncias usadas no processo de polimerização, monómeros residuais, aditivos e substâncias usadas na transformação dos materiais são uma possível fonte de migrações (Tehrany *et al.*, 2006).

A interação entre as embalagens metálicas e os alimentos enlatados têm normalmente origem em reacções electroquímicas, reacções de corrosão entre os

materiais metálicos e os produtos alimentares. Ainda que possam ocorrer migrações de componentes do verniz de revestimento, este oferece uma protecção indispensável na maioria dos casos (Turner, 1995; Poças & Oliveira, 1997).

Algumas das formas de corrosão mais frequentemente encontradas são a corrosão por nitratos, a corrosão em latas com formação de hidrogénio e a sulfuração. A primeira promove o desestanhamento homogéneo e superficial, até ao consumo de todo o estanho livre, sem formação de gases; a corrosão em latas com formação de hidrogénio pode conduzir nos casos mais graves, à perfuração da lata; e a sulfuração, não produzindo produtos tóxicos provoca o escurecimento das superfícies internas da lata com prejuízo para a apresentação do produto (Turner, 1995).

As interacções entre os materiais celulósicos e os alimentos colocam-se a nível da migração de substâncias usadas no fabrico de pasta de papel ou na sua transformação e de outras substâncias contaminantes. Este problema é hoje mais complexo devido ao recurso cada vez mais frequente a papel reciclado, sendo frequentemente encontrados valores de contaminantes superiores aos regulamentados (Conti, 1996; Ozaki *et al.*, 2004).

O vidro é considerado como o material de maior inércia química no contacto directo com os alimentos. Os principais compostos extraídos por soluções aquosas são a sílica e o óxido de sódio que não têm efeitos significativos nas características organolépticas do produto, e a contaminação por chumbo ou cádmio é difícil de ocorrer pois estes compostos raramente entram na composição do vidro de embalagem, ao contrário do que acontece com os recipientes cerâmicos (Poças & Oliveira, 1997).

Na União Europeia (UE), a transferência para os alimentos de substâncias provenientes de materiais com os quais contactam, está salvaguardada pelo Regulamento N.º 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Outubro de 2004, que estabelece os critérios a cumprir relativamente aos materiais usados.

2.1.2 - Alterações químicas e bioquímicas

Os produtos alimentares, tal como a maioria das matérias-primas que são utilizadas no seu fabrico, são de origem biológica, o que torna inevitável a ocorrência de algumas alterações químicas e bioquímicas que, excepção feita à maturação de alguns tipos de queijo e de produtos cárneos, envelhecimento dos vinhos e amadurecimento de frutos após a colheita, são quase sempre indesejáveis e diminuem o tempo de vida útil do alimento (Man, 2002).

2.1.2.1 - Oxidação

2.1.2.1.1 - Oxidação dos lípidos

Os lípidos constituem uma importante fracção de praticamente todos os alimentos, pelo que o conhecimento e compreensão das alterações físico-químicas que lhes são características, e respectivas consequências, devem obrigatoriamente ser considerados em qualquer abordagem relativa à qualidade dos alimentos (Nawar, 1998; Richards, 2006).

Na carne e nos produtos cárneos, adicionalmente à actividade microbiana, a principal causa de deterioração são as alterações na gordura, limitando frequentemente a vida útil das carnes congeladas e dos produtos cárneos fermentados, devido a alterações provocadas na cor, odor e sabor (Kanner *et al.*, 1992; Bauer, 1995; Botsoglou *et al.*, 2003; Serdaroglu & Yildiz-Turp, 2004).

Apesar de ter pouca importância prática, normalmente designam-se por óleos ou por gorduras os lípidos que à temperatura ambiente, se apresentam, respectivamente, no estado líquido ou no estado sólido (Nawar, 1993; Richards, 2006).

Os óleos e as gorduras compõem a principal fracção da dieta humana, são fonte de energia e de nutrientes essenciais como os ácidos linoleico e linolénico, e também promovem a absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K. Além disso, desempenham um importante papel funcional para a determinação das características sensoriais dos alimentos (Chu & Hwang, 2002; Sukan & Weerasinghe, 2005).

Os lípidos têm propriedades físico-químicas peculiares que resultam da sua composição, estrutura, comportamento na fusão e na solidificação, relação com a água e outras moléculas não lipídicas, que são especialmente importantes no que diz respeito às propriedades que influenciam a textura dos alimentos (Nawar, 1993; Richards, 2006). Podem ser de origem animal ou vegetal, são insolúveis em água, compostos principalmente por triacilglicéridos, que resultam da esterificação de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácidos gordos, originando uma molécula de triacilglicerol e três moléculas de água (Nawar, 1993; Chu & Hwang, 2002).

A natureza dos ácidos gordos que compõem os triacilglicéridos influencia os comportamentos físico-químicos que denotam. A maioria dos ácidos gordos é composta por uma cadeia linear de átomos de carbono, considerados saturados quando não apresentam nenhuma ligação dupla, e insaturados ou polinsaturados quando existe respectivamente uma ou mais do que uma ligação dupla (Nawar, 1993; Chu & Hwang, 2002; Richards, 2006). Da geometria e número de duplas ligações, resulta uma maior ou menor estabilidade dos ácidos gordos e, conseqüentemente, dos produtos de que estes fazem parte (Kanner *et al.*, 1992; Hamilton, 1994; Chu & Hwang, 2002).

A presença em maior ou menor escala de outros compostos nos alimentos e a forma como eles reagem e interagem, juntamente com outros factores, como o meio em que se encontram as moléculas de substrato, a sua orientação molecular, os estados físicos do substrato e do meio, influenciam muito o comportamento físico-químico dos lípidos determinando a sua taxa de oxidação (Kanner *et al.*, 1992; Nawar, 1998).

Assim, a estabilidade oxidativa dos lípidos depende de vários factores como o grau de insaturação, a natureza da insaturação relativamente ao posicionamento das duplas ligações, a presença de antioxidantes naturais ou sintéticos, a presença de metais, cloreto de sódio, pigmentos fotossensíveis, enzimas pró-oxidantes e das condições de conservação como a temperatura, luz, oxigénio e humidade (Hamilton, 1994; Bauer, 1995; Chu & Hwang, 2002).

Apesar dos ácidos gordos saturados poderem reagir com o oxigénio, a susceptibilidade dos lípidos à oxidação aumenta com o seu grau de insaturação, sendo especialmente sensíveis os ácidos gordos que contêm um ou mais sistemas pentadieno não conjugados (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) (Nawar, 1998).

Ainda que exista muita documentação relativa à decomposição dos substratos lipídicos puros, essa informação não se pode aplicar de forma directa aos alimentos devido à complexidade das inúmeras reacções que envolvem o processo oxidativo (Nawar, 1993, 1998; Richards, 2006).

Apesar da diversidade existente entre os alimentos relativamente ao seu teor em gordura, sua composição química e estado físico, são idênticos os processos responsáveis pelas alterações na fracção lipídica, sendo a oxidação e a decomposição hidrolítica as principais causas de preocupações na conservação dos mais variados tipos de alimento (Hamilton, 1994; Nawar, 1998).

A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração dos alimentos originando sabores e odores desagradáveis, designados por ranço, que tornam os produtos inaceitáveis para o consumidor reduzindo a sua vida útil; além disso, as reacções de oxidação também podem diminuir a qualidade nutricional do alimento e originar produtos de oxidação potencialmente tóxicos. Porém, em determinados casos é desejável um certo grau de oxidação lipídica (Nawar, 1993; Man, 2002; Richards, 2006).

Geralmente considera-se que a autooxidação, isto é, a reacção com o oxigénio molecular, é a principal implicada na deterioração causada pela oxidação lipídica, mas não devem deixar de considerar-se também a oxidação fotossensível, os mecanismos enzimáticos por acção da lipoxigenase, não enzimáticos e as interacções de todos eles com a autooxidação (Nawar, 1993; Hamilton, 1994; Chu & Hwang, 2002).

As reacções de autooxidação dos lípidos ocorrem mediante mecanismos típicos de radicais livres, que são caracterizados por - marcadas inibições na presença de substâncias químicas que se sabe interferirem nas reacções; serem catalisadas pela luz e por outras substâncias capazes de produzir radicais livres; originarem elevada produção de hidroperóxidos; terem rendimentos quânticos superiores à unidade quando a reacção de oxidação se inicia pela luz; possuírem um período de indução relativamente longo quando ocorrem no substrato puro (Nawar, 1993).

O mecanismo simplificado da autooxidação é constituído por três etapas, etapa de iniciação, de propagação e de terminação, sendo a reacção de iniciação termodinamicamente difícil (Nawar, 1993, 1998; Richards, 2006).

A etapa de iniciação que precede a reacção em cadeia produz os primeiros radicais livres por acção de um catalisador, geralmente um metal, luz, elevada radiação energética, oxigénio singlete ou produtos da decomposição de outros peróxidos ocasionalmente adicionados (Nawar, 1998)

É pouco provável que seja o oxigénio na sua forma mais estável, tripleto, a desencadear o primeiro ataque às ligações duplas dos ácidos gordos. Será antes o oxigénio singlete, mais electrofílico e portanto mais reactivo em zonas de densidade electrónica alta como são as ligações duplas entre os átomos de carbono, o composto activo provavelmente implicado na iniciação do processo de autooxidação (Nawar, 1993, 1998; Richards, 2006).

Na presença de concentrações de oxigénio muito baixas, a taxa de oxidação é proporcional à pressão do oxigénio mas se a disponibilidade de oxigénio for ilimitada, então, a taxa de oxidação é independente da pressão de oxigénio não deixando porém de contribuir para a determinação dos mecanismos de oxidação concorrentes (Nawar, 1998).

Em virtude da sua baixa energia de activação o processo autoxidativo não é evitado pelas baixas temperaturas. E embora a velocidade das reacções oxidativas aumente com a temperatura, porém, com o aumento da temperatura o incremento esperado na taxa de oxidação perante uma maior concentração de oxigénio torna-se menos evidente, porque o oxigénio se torna menos solúvel (Hamilton, 1994; Nawar, 1998).

A formação de oxigénio no estado singlete pode ocorrer de diversas formas, sendo talvez a mais importante a fotossensibilização pelos pigmentos naturais dos alimentos como a clorofila, feofitina, hematoporfirina e a mioglobina, ainda que a eritrosina, sendo um corante sintético, também o faça. O tocoferol e o β -caroteno contrariam esse processo por sequestrarem o oxigénio singlete (Nawar, 1998).

A formação de hidroperóxidos pelo oxigénio singlete ocorre por mecanismos distintos dos da autooxidação por radicais livres, sendo o mais importante de todos a reacção “eno”, que implica a formação de um estado de transição em forma de anel de seis membros, em que o oxigénio se insere nos extremos de ligação dupla, produzindo então alterações que dão lugar a um hidroperóxido alílico na configuração trans (Nawar, 1993).

O oxigénio singlete, para além do seu papel como iniciador do processo de autoxidação, provocando activamente a formação de radicais livres, tem sido apontado como responsável por alguns produtos da oxidação lipídica cuja formação pode explicar-se apenas com base na decomposição dos hidroperóxidos típicos resultantes da sua actividade, sem no entanto se sobrepôr à acção da reacção em cadeia por radicais livres (Nawar, 1993).

Os hidroperóxidos dão origem a uma grande variedade de produtos de decomposição. Numa primeira fase cada hidroperóxido origina uma série de produtos de rotura inicial típicos, que dependem da posição na molécula original; posteriormente, estes compostos podem experimentar oxidações e decomposições diversas contribuindo assim para a formação de uma grande variedade de radicais livres. A multiplicidade das possíveis vias de reacção é tão complexa que muitas vezes se perde o rasto que nos conduziria até ao hidroperóxido inicial (Nawar, 1993).

Os hidroperóxidos decompõem-se à medida que se vão formando, e se nas primeiras etapas da autoxidação a velocidade de formação é superior à da sua decomposição nas últimas etapas ocorre o contrário (Nawar, 1993).

A primeira etapa da decomposição dos hidroperóxidos consiste na rotura das ligações oxigénio-oxigénio do grupo hidroperóxido, dando lugar a um radical alcóxilo e um radical hidroxilo. A segunda etapa desta decomposição consiste na rotura da ligação carbono-carbono num dos dois lados do grupo alcóxilo, originando um ácido e um aldeído ou um hidrocarboneto e um oxoácido, consoante a rotura ocorre do lado do ácido ou do lado hidrocarbonado (Nawar, 1993; Richards, 2006).

Os peróxidos cíclicos ou os peróxidos cíclicos com grupos hidroperóxido, que se formam geralmente na oxidação dos ácidos gordos polinsaturados também se decompõem e dão lugar a uma grande variedade de compostos (Nawar, 1993).

Os aldeídos são compostos típicos que resultam maioritariamente da oxidação das gorduras, mas cuja formação nem sempre se pode explicar unicamente a partir da rotura clássica de hidroperóxidos (Nawar, 1993).

Os aldeídos saturados podem oxidar-se facilmente dando origem aos ácidos correspondentes e também podem participar em reacções de condensação e dimerização. Os aldeídos insaturados, por sua vez, podem experimentar a autoxidação clássica mediante o ataque do oxigénio às posições α -metilénicas originando

hidrocarbonetos de cadeia curta, aldeídos e dialdeídos. Destes, é particularmente interessante a formação do malonaldeído, o qual constitui o fundamento do método para avaliação da oxidação das gorduras utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Nawar, 1993, 1998; Richards, 2006).

A dimerização e a polimerização são reacções importantes que ocorrem nos lípidos devido a mecanismos térmicos e de oxidação; estas alterações são geralmente acompanhadas de uma diminuição do índice de iodo, de um aumento do peso molecular, da viscosidade e do índice de refração (Nawar, 1993).

Uma vez formado um número suficiente de radicais livres, a reacção em cadeia propaga-se capturando átomos de hidrogénio nas ligações duplas das posições α . Posteriormente, mediante a ligação do oxigénio aos locais deixados livres pelo hidrogénio, formam-se radicais peróxido, os quais captam hidrogénio dos grupos α -metilénicos de outras moléculas para formar hidroperóxidos e grupos radicais livres, que por sua vez reagem com o oxigénio, repetindo-se novamente a sequência de reacção descrita (Nawar, 1993).

Os hidroperóxidos, produtos primários da autooxidação lipídica, são relativamente instáveis e intervêm em numerosas e complexas reacções de rotura e interacção, que são responsáveis por miríades de compostos com diferentes pesos moleculares, responsáveis por aromas e biologicamente activos (Nawar, 1993).

Ocorre uma maior taxa de oxidação dos lípidos quando o grau de insaturação dos ácidos gordos que os compõem é maior, já que a oxidação lipídica leva à formação primária de hidroperóxidos, que sendo extremamente instáveis se decompõem posteriormente em aldeídos, álcoois, ácidos, e hidrocarbonetos, compostos que são responsáveis por alterações de cheiro e sabor dos óleos e gorduras (Nawar, 1998; Chu & Hwang, 2002; Richards, 2006).

A primeira fase da oxidação dos lípidos ocorre a uma taxa relativamente baixa produzindo peróxidos, mas, após se atingir um determinado nível de oxidação inicia-se uma segunda fase de reacção, com formação de compostos secundários voláteis e não voláteis que desde o primeiro instante fazem sentir os efeitos do ranço (Kanner *et al.*, 1992; Chu & Hwang, 2002).

Os hidroperóxidos resultantes da oxidação dos lípidos podem ser determinados através do índice de peróxidos (IP), e do teor em ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). A

resistência de uma determinada gordura ou óleo à oxidação pode ser avaliada pelo teste de Schaal, Swift e pelo índice de estabilidade do óleo (Chu & Hwang, 2002).

A maioria dos óleos de origem vegetal contem antioxidantes naturais como é o caso do tocoferol, que interessa preservar no decorrer do processamento dos alimentos. Porém, é muito frequente o recurso a antioxidantes de síntese como são os compostos fenólicos, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitoleno butilado (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propilo (PG) (Chu & Hwang, 2002).

A presença de metais, geralmente cobre, magnésio e ferro, acelera o processo oxidativo dos lípidos, porém, a inativação do seu efeito catalítico pode conseguir-se mediante o recurso a agentes sequestrantes, como por exemplo o ácido cítrico, agente quelante muito utilizado na indústria de extracção de óleos e gorduras (Chu & Hwang, 2002; Richards, 2006).

Além do recurso a antioxidantes e agentes sequestrantes, existem outras formas de retardar a oxidação dos lípidos, nomeadamente diminuindo o oxigénio na atmosfera em contacto com os produtos, recorrendo ao vácuo ou a atmosfera modificada (Chu & Hwang, 2002).

O ranço oxidativo pode diminuir o valor nutritivo dos alimentos, pois os radicais livres e os peróxidos gerados destroem os ácidos gordos polinsaturados e as vitaminas lipossolúveis A e E, podendo também reagir com as ligações sulfídricas das proteínas, indisponibilizando os aminoácidos sulfurados e diminuindo consequentemente o valor proteico (Sanders, 1994).

Vários produtos resultantes da oxidação lipídica como os peróxidos e os seus produtos subsequentes, material polimérico e esteróis oxidados são tóxicos; os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos produzidos pela pirólise de gorduras no grelhar e assar a carne e peixe são potencialmente carcinógenos (Sanders, 1994).

Os radicais livres podem sofrer uma ciclização intermolecular, podendo ocorrer a formação de monómeros cíclicos tóxicos. Porém, é aceite que podendo este tipo de compostos tóxicos ser gerados através de aquecimento abusivo ou excessiva oxidação, a ingestão moderada de fritos feitos em óleos de qualidade e de acordo com as boas práticas de fritura não constituem em si perigo significativo para a saúde do consumidor (Nawar, 1998; Richards, 2006).

Nos sistemas biológicos, incluindo os alimentos, as moléculas de lípidos encontram-se frequentemente num estado altamente ordenado, e tanto a distância entre si como a sua mobilidade são reduzidas, dependendo da estrutura física. Para além de se encontrarem intimamente associadas com matérias vizinhas de origem não lipídica de que fazem parte os hidratos de carbono, água, enzimas, sais, vitaminas, e pró-oxidantes e anti-oxidantes (Nawar, 1993, 1998).

A composição dos lípidos, o seu grau de ordenamento molecular e a sua associação com os componentes não lipídicos varia consideravelmente em função da espécie vegetal ou animal e da sua localização no organismo do indivíduo, o que obviamente vai influenciar os mecanismos e as consequências das reacções de oxidação lipídica que podem ser completamente diferentes das verificadas nos modelos ensaiados com lípidos puros em fase homogénea, tornando assim extremamente difícil o estudo dos mecanismos de reacções de oxidação dos lípidos em sistemas biológicos (Nawar, 1993; Richards, 2006).

A via enzimática de oxidação dos lípidos inicia-se com a lipólise; depois os ácidos gordos polinsaturados libertados oxidam-se por acção das lipoxigenases e das ciclooxigenases originando, respectivamente, hidroperóxidos ou endoperóxidos. Até há pouco tempo julgava-se que as lipoxigenases estavam restringidas às plantas mas actualmente está demonstrado que também existem nos animais. A etapa posterior implica a rotura dos hidroperóxidos e endoperóxidos originando os produtos responsáveis pelo ranço (Nawar, 1993).

Também podem ocorrer mecanismos de oxidação enzimática, por acção de lipoxigenases que se encontram em plantas e animais e que actuam especificamente sobre determinados ácidos gordos polinsaturados, catalisando a produção de hidroperóxidos intermédios semelhantes aos formados pela autoxidação não enzimática. Porém, as suas exigências em termos de substratos e condições específicas de actuação há semelhança do que acontece com as hidroxidases, remete para segundo plano a sua acção no processo oxidativo dos lípidos em alimentos (Nawar, 1998).

A oxidação de uma gordura ocorre na sua zona de interface com o oxigénio, aumentando proporcionalmente com a área exposta ao ar; a taxa de oxidação depende, assim, da inter-relação dos diferentes componentes do alimento, da sua conformação molecular, arranjo dos substratos e do meio no qual eles existem (Nawar, 1998).

A relação entre a estabilidade oxidativa dos ácidos gordos e a sua distribuição espacial na molécula de tiacilglicerol é controversa, tendo diferentes autores chegado a diferentes resultados (Nawar, 1998).

Além dos pró-oxidantes e antioxidantes já mencionados, muitos outros componentes menores presentes nos alimentos contribuem para o balanço oxidativo/antioxidante, alguns ocorrendo naturalmente nos alimentos, outros, tendo a sua génese no decurso de processos de armazenamento e transformação dos alimentos, como acontece com muitos produtos da reacção de Maillard com conhecido efeito antioxidante (Nawar, 1998; Richards, 2006).

Sob condições de oxidação ocorrem interacções de extrema complexidade, como as que se verificam entre grupos amina livres e aldeídos provenientes quer da oxidação lipídica quer da degradação de proteínas ou hidratos de carbono, cuja importância é reconhecida na origem de produtos responsáveis por alterações na cor, textura e sabor e com influência no balanço oxidativo/antioxidativo (Nawar, 1998; Richards, 2006).

As interacções entre lípidos em processo de oxidação, produtos de oxidação já existentes e outros componentes presentes nos alimentos influenciam decisivamente o balanço oxidativo/antioxidante verificado. As relações verificadas entre estas diferentes componentes de uma mistura em oxidação e o contributo ou resistência de cada um deles ao processo oxidativo, são difíceis de estabelecer mas não deixam de ser de grande importância para o estudo da qualidade dos alimentos, sendo necessária ainda muita pesquisa para melhorar estes conhecimentos (Nawar, 1998; Richards, 2006).

Nos alimentos muito secos, com $a_w < 0,1$, a oxidação lipídica processa-se muito rapidamente, mas com um aumento do a_w para 0,3 diminui, aparentemente por retardar a catálise dos metais, sequestrar radicais livres, promover o escurecimento não enzimático e impedir o acesso de oxigénio aos locais de oxidação; a valores de a_w superiores a 0,55 a taxa de oxidação aumenta novamente, presumivelmente devido a uma maior mobilização dos catalisadores presentes (Nawar, 1998).

A complexidade de reacções intervenientes no processo de deterioração dos lípidos, que podem ocorrer em cadeia, simultaneamente ou concorrencialmente e são influenciadas por múltiplas variáveis que afectam as taxas de reacção, a natureza e o destino dos produtos formados, impossibilita o recurso a um método único de medição do processo oxidativo capaz de servir para todos os tipos de alimento, sob todas as

condições de processamento e nos diferentes graus de oxidação, necessitando-se frequentemente combinar vários testes para obter resultados fiáveis (Nawar, 1998).

Para evitar a deterioração dos lípidos devem tomar-se certas precauções, a fim de aumentar a vida útil dos alimentos e prevenir baixas de qualidade nos produtos. É, pois importante a selecção de matérias-primas e ingredientes de qualidade, utilizar técnicas que diminuam a interacção entre substratos e catalisadores, impedir o contacto com o oxigénio, luz e metais, evitar elevadas temperaturas, utilizar embalagens que proporcionem uma eficaz barreira para os gases durante armazenamento e distribuição, diminuir as superfícies em contacto directo com o ar, utilizar equipamentos apropriados e fazer uso adequado de antioxidantes (Nawar, 1998; Richards, 2006).

2.1.2.1.2 - Oxidação dos pigmentos

Todos os pigmentos naturais são instáveis, e embora as alterações na cor dos alimentos não conduzam necessariamente a perdas no seu valor nutricional, é sabida a importância deste parâmetro no aspecto geral do produto e, conseqüentemente, na sua aceitação pelo consumidor (Clydesdale, 1998; Man, 2002; Lee & Schwartz, 2006).

A cor da carne fresca é devida à mioglobina, que pode existir em três estados, oximioglobina de cor vermelha, mioglobina reduzida de cor púrpura e metamioglobina de cor acastanhada. As alterações na cor da carne são provocadas pela oxidação da oximioglobina e da mioglobina em metamioglobina, pelo que a cor da carne é frequentemente tida como indicador do seu grau de frescura (Francis, 1993; Clydesdale, 1998; Toldrá, 2006).

2.1.2.1.3 - Oxidação das vitaminas

As vitaminas são das poucas fracções constituintes dos alimentos em que é possível demonstrar quantitativamente a redução no seu teor ao longo de um período de tempo. Quimicamente são um grupo heterogéneo de compostos, sem semelhanças a nível estrutural ou relativamente aos seus mecanismos de degradação, porém, muitas

delas são sensíveis ao oxigénio (Tannenbaum *et al.*, 1993; Ye & Eitenmiller, 2006; Steinberg & Rucker, 2006).

Nos alimentos fortificados com vitaminas, a adição destas substâncias, cujos teores são declarados no rótulo, pode constituir, por si só, um factor limitante da vida útil do alimento. Para cumprir as informações constantes no rótulo é prática comum entre os fabricantes adicionar quantidades iniciais de vitaminas superiores aos valores declarados, compensando desta forma eventuais quebras que possam ocorrer durante a conservação e distribuição dos produtos; a esta prática acresce-se a importância da escolha adequada da embalagem que deve garantir a ausência de oxigénio e, por vezes também da luz (Tannenbaum *et al.*, 1993; Man, 2002).

2.1.2.2 - Hidrólise

Por hidrólise entende-se a decomposição que ocorre, sob condições favoráveis nomeadamente de temperatura e pH, de certas moléculas na presença de água, limitando a vida útil do produto em que se inserem (Man, 2002).

2.1.2.2.1 - Hidrólise dos lípidos

Na carne fresca a lipólise é uma das causas de deterioração dos lípidos, sendo regida por uma série de enzimas específicas de origem endógena ou exógena, designadas por lipases e fosfolipases que promovem a libertação dos ácidos gordos (Gandemer, 2002).

A hidrólise dos triacilglicéridos na presença de água e enzimas, liberta ácidos gordos de cadeia curta (C₆ - C₁₀) que causam sabores indesejáveis muito fortes, o que também acontece em alguns cereais e óleos vegetais (Nawar, 1993, 1998; Man, 2002; Richards, 2006).

Este tipo de reacção é responsável pelo rompimento das ligações éster entre os ácidos gordos e o glicerol, e pode ser catalisada por ácidos, bases, calor, humidade ou lipases (Nawar, 1998; Richards, 2006).

As enzimas lipolíticas actuam geralmente em zonas de interface entre os lípidos e a água, apresentando quase sempre especificidade de substrato, e podem ocorrer naturalmente nos alimentos ou nos produtos com os quais estes vão ser misturados, mas também podem ter origem microbiana (Nawar, 1998; Lopes *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 2002).

Nos animais vivos os ácidos gordos livres estão virtualmente ausentes das gorduras, mas após o sacrifício do animal podem começar a libertar-se mediante acção enzimática. Considerando que as gorduras animais geralmente não são refinadas para reduzir o seu teor em ácidos gordos livres, é importante que se obtenham rapidamente após o sacrifício do animal, apesar das temperaturas empregues no processo de fusão e extracção serem geralmente suficientes para inactivar as lipases (Kanner *et al.*, 1992; Nawar, 1993; Toldrá, 2007).

Nos produtos de salsicharia secos este fenómeno não tem muita expressão, pois, as condições do meio estão longe de ser as ideais para a actividade das lipases, porém, por vezes pode ser desejável se os resultados beneficiarem o sabor e aroma dos produtos em questão (Sucan & Weerasinghe, 2005). No entanto o mais frequente é que a hidrólise dos lípidos provoque alterações indesejáveis nos alimentos, como o desenvolvimento de sabores inaceitáveis de ranço, alterações nas propriedades funcionais dos lípidos e o aumento da susceptibilidade para fenómenos de autoxidação (Nawar, 1998; Lopes *et al.*, 1999, 2002; Sucan & Weerasinghe, 2005; Richards, 2006).

Contrariamente ao que acontece nas gorduras animais, as gorduras vegetais provenientes de sementes imaturas podem sofrer uma hidrólise substancial no período que decorre entre a colheita e a extracção, originando elevadas quantidades de ácidos gordos livres. Assim, muitas vezes após a extracção do óleo, recorre-se a um processo de neutralização destes ácidos gordos livres (Nawar, 1993; Richards, 2006).

A lipólise é, também, uma das principais reacções que ocorre durante a fritura dos alimentos; o elevado conteúdo em água dos alimentos e as altas temperaturas a que ocorre o processo aumentam os níveis de ácidos gordos livres ao longo do tempo, facto

que está associado a uma diminuição do ponto de fumo e da tensão superficial do óleo com a consequente diminuição da qualidade dos fritos (Nawar, 1993).

As estratégias de protecção dos lípidos contra a hidrólise, passam principalmente pela selecção das matérias-primas de alta qualidade, a inactivação das lipases por acção do calor e a conservação dos produtos em condições que contrariem o desenvolvimento de microrganismos capazes de desenvolver actividade lipolítica (Kanner *et al.*, 1992; Nawar, 1998; Richards, 2006).

2.1.2.2.2 - Hidrólise dos prótidos

As proteínas são macromoléculas complexas, biopolímeros compostos por carbono, hidrogénio, oxigénio, azoto e habitualmente enxofre, contendo algumas ainda ferro, cobre, fósforo ou zinco. Da sua hidrólise completa por acção ácida, alcalina ou enzimática, resultam aminoácidos de configuração L que se diferenciam entre si pela constituição das suas cadeias laterais (Cheftel *et al.*, 1993; Damodaran, 2006; Tarté & Amundson, 2006).

Nos alimentos as proteínas desempenham um papel multifuncional, geralmente associado à solubilidade, gelificação, emulsificação, espuma e capacidade de retenção de água, constituindo o principal componente estrutural de alimentos como a carne, os ovos, o leite, os cereais e os legumes, influenciando de forma significativa os atributos sensoriais e a qualidade geral destes produtos (Cheftel *et al.*, 1993; Corredig, 2006; Culbertson, 2006).

As proteínas são susceptíveis de sofrerem alterações induzidas pelas diferentes operações de processamento como o aquecimento, o arrefecimento, a secagem, a redução de tamanho e a pressão; pelas condições ambientais como a força iónica, o pH, os tipos de sal e o potencial de oxidação-redução, mas também pela interacção com outros ingredientes a qual se acumula ao efeito das condições ambientais (Culbertson, 2006; Howell, 2006; Kilara, 2006).

A interacção das proteínas com a água pode dar-se através de ligações peptídicas, ligações tipo dipolo-dipolo ou pontes de hidrogénio, ou ainda através das

cadeias laterais dos seus aminoácidos como acontece nas interações com os grupos polares ionizados ou mesmo não polares (Cheftel *et al.*, 1993; Tarté & Amundson, 2006).

A solubilidade das proteínas depende de vários parâmetros, mas é sempre função da interação com o solvente, o que depende fundamentalmente do pH, da força iónica, do tipo de solvente e da temperatura (Cheftel *et al.*, 1993, Culbertson, 2006; Damodaran, 2006; Kilara, 2006). Com valores de pH superiores ou inferiores ao seu ponto isoeléctrico, as proteínas possuem carga negativa ou positiva, facto que influencia a sua interação com as moléculas de água e conseqüentemente a sua solubilidade. Além disso, as cadeias proteicas com a mesma carga eléctrica têm tendência a repelir-se, dissociar-se ou desagregar-se, pelo que a solubilidade mínima de uma determinada proteína corresponde à verificada no seu ponto isoeléctrico, quando as interações com as moléculas de água são mínimas e pode ocorrer a precipitação (Cheftel *et al.*, 1993; Culbertson, 2006).

Os iões de sais neutros em molaridades baixas compreendidas entre 0,5 e 1 M, podem aumentar a solubilidade das proteínas (*salting in*), pois reagem com as suas cargas e diminuem a atracção entre as cargas opostas de moléculas vizinhas, além de que a solvatação relacionada com estes iões aumenta também a das proteínas. Porém, concentrações de sais neutros superiores a 1 M, em virtude da competição gerada pelas moléculas de água disponíveis, diminuem a solvatação das proteínas que se agregam e precipitam (*salting out*), o que é raro acontecer em alimentos já que se tornariam demasiado salgados (Cheftel *et al.*, 1993; Culbertson, 2006; Kilara, 2006).

Também alguns solventes não aquosos como o etanol ou a acetona, para além de competirem com as proteínas pelas moléculas de água, diminuem a constante dieléctrica do meio em que se encontram dispersas e, conseqüentemente, as forças de repulsão existentes, favorecendo a sua agregação e posterior precipitação (Cheftel *et al.*, 1993; Damodaran, 2006).

A sensibilidade das proteínas às condições que lhes provocam alterações na forma e estrutura, como se verifica no caso de valores de pH extremos, solventes orgânicos, elevadas concentrações salinas, acção mecânica e temperaturas elevadas, provoca a sua desnaturação, muitas vezes irreversível (Culbertson, 2006).

Valores de pH e força iónica constantes, temperaturas entre os 40 – 50 °C favorecem normalmente a solubilidade das proteínas, no entanto, acima destes valores ocorre frequentemente desnaturação seguida de agregação, o que diminui a solubilidade relativamente à forma nativa. Porém, a capacidade da proteína agregada fixar água mantém-se ou pode mesmo aumentar, principalmente devido à absorção pelos capilares do gel do coágulo resultante, como acontece na gelificação (Cheftel *et al.*, 1993; Corredig, 2006; Culbertson, 2006; Toldrá, 2007).

As proteínas presentes nos alimentos não processados ou minimamente processados, bem como naqueles que sofreram tratamentos para destruir a flora saprófita e patogénica, são susceptíveis de alterações químicas provocadas por componentes endógenos ou exógenos que por sua vez são influenciadas pelas diversas condições de processamento e/ou armazenamento (Barnett & Hie-Joon, 1998; Corredig, 2006).

Deste modo, a deterioração das proteínas pode ocorrer por hidrólise das ligações peptídicas ou proteólise mediante a acção das enzimas proteolíticas. Mas, também pode ficar a dever-se a reacções de agregação ou degradação, a modificações causadas por interacção com aditivos alimentares ou devido a reacções entre os grupos amina e os grupos carbonilo de compostos endógenos ou adicionados, como acontece por exemplo com os açúcares redutores (Barnett & Hie-Joon, 1998; Howell, 2006).

A instabilidade das proteínas resulta assim de fenómenos de natureza bioquímica como na proteólise, ou estritamente química como na interacção com os aditivos e no escurecimento não enzimático. Algumas vezes poderá ser vantajosa e outras vezes prejudicial, nestes casos, mesmo quando não afecta significativamente a qualidade nutricional das proteínas compromete frequentemente a qualidade sensorial dos produtos, porém esta acção é susceptível de ser minimizada mediante o controlo dos parâmetros físico-químicos do meio em questão (Barnett & Hie-Joon, 1998; Culbertson, 2006).

A carne magra é constituída em cerca de 15 a 22% do seu peso por proteína, a maioria da qual é miofibrilhar, sendo este o tipo de proteína responsável pela capacidade de contracção muscular e pelo desenvolvimento do *rigor mortis*. As restantes fracções proteicas são a sarcoplasmática, solúvel em água, e o tecido

conjuntivo ou proteínas insolúveis em água (Varnam & Sutherland, 1995; Tarté & Amundson, 2006; Wang, 2006; Toldrá, 2006, 2007).

Quando o *rigor mortis* se instala os filamentos das miofibrilhas interagem fortemente formando a actomiosina, o que a torna a carne firme, rija e dura, com um pH próximo do valor isoeléctrico. Estas ligações proteína-proteína são fortes e expulsam a água das miofibrilhas, diminuindo a sua capacidade de retenção e produzindo exsudado (Koochmaraie, 1994; Prates, 1999; Tarté & Amundson, 2006; Wang, 2006).

Durante a maturação a carne torna-se mais tenra, devido à acção das endopeptidases musculares tais como as catepsinas lisossomais, calpaínas sarcoplasmáticas e pelo complexo endopeptidásico multicatalítico (CEM), que modificam a estrutura da carne fragmentando a estrutura das proteínas sarcoplasmáticas e citoesqueléticas, promovendo a fractura transversal dos sarcómeros e o enfraquecimento das miofibrilhas (Koochmaraie, 1992, 1994; Prates, 1999).

O tempo despendido no processo de maturação da carne e o conseqüente aumento da tenrura e desenvolvimento do *flavour*, depende da temperatura, do pH e da espécie animal, variando de 1-2 dias nas aves a 10-20 dias nos bovinos (Dransfield, 1992; Koochmaraie, 1994; Toldrá, 2007). Mas a proteólise não explica por si só todo o processo de maturação da carne (Dransfield, 1992; Barnett & Hie-Joon, 1998).

A tenrificação da carne pode também ser favorecida pela utilização de enzimas exógenas como a papaina, a ficina e a bromelina, aplicadas sob a forma de solução ou pó sobre a carne. Esta prática deve ser cuidadosa porque excessos de proteólise localizada produzirão uma excessiva perda de consistência do tecido muscular. Ao contrário do processo natural de maturação da carne, as enzimas exógenas têm acção sobre todas as proteínas do músculo incluindo as do tecido conjuntivo, o que faz com que se possa verificar uma diminuição do prazo de validade devido a uma acção proteolítica continuada, associada a um aumento da actividade microbiana devido ao aumento da disponibilidade de substratos de baixo peso molecular (Barnett & Hie-Joon, 1998).

Existem também, variados tipos de microrganismos que se desenvolvem no tecido muscular da carne ou do peixe, e segregam enzimas extracelulares com acção proteolítica. Estes microrganismos utilizam primeiro os hidratos de carbono e só após o esgotamento deste tipo de nutrientes passam a metabolizar outros compostos de baixo

peso molecular como os aminoácidos, originando metabolitos voláteis associados às primeiras fases de decomposição, de que são exemplos os tióis, as aminas e os ésteres etílicos (Nychas *et al.*, 1988; Nychas & Tassou, 1997; Fraqueza, 2006).

2.1.2.3 - Escurecimento dos alimentos

O escurecimento dos alimentos ocorre frequentemente durante o seu processamento e conservação, especialmente na manipulação de carne, peixe, frutas e vegetais, diminuindo as suas propriedades sensoriais, alterando a cor, o sabor, a textura e o valor nutritivo (Martinez & Whitaker, 1995).

Este fenómeno pode resultar da oxidação enzimática ou não enzimática dos compostos fenólicos, bem como da reacção de Maillard que ocorre quando misturas de aminoácidos e açúcares redutores são submetidas a temperaturas elevadas. Por vezes é difícil determinar a origem, enzimática ou não enzimática, uma vez que o escurecimento pode desenvolver-se de forma não enzimática a partir de compostos intermédios que resultaram da acção oxidativa de enzimas entretanto desactivadas (Wedzicha, 1984; McEvily *et al.*, 1992).

2.1.2.3.1 - Escurecimento enzimático

O escurecimento enzimático é um fenómeno especialmente importante em frutas e hortaliças, mas também ocorre no marisco, camarão, lagosta e lagostim. Este tipo de alteração da cor limita frequentemente a vida útil dos vegetais minimamente processados, congelados ou desidratados, mas também pode ser desejável por contribuir para o desenvolvimento da cor e do *flavour* em alimentos como as passas de uva, ameixas secas, cacau, chá e café (McEvily *et al.*, 1992; Martinez & Whitaker, 1995; Man, 2002).

Para que o escurecimento enzimático se desenrole é necessária a presença de compostos fenólicos, de oxigénio e da enzima polifenol-oxidase, e também que

simultaneamente se verifiquem condições de pH óptimas entre 5 e 7 e uma temperatura que permita que a reacção decorra. O controlo deste mecanismo de deterioração assenta em fundamentos físicos e químicos, frequentemente usados em simultâneo, mas que diferem de acordo com o alimento em questão (Nicoli *et al.*, 1991; McEvily *et al.*, 1992; Martinez & Whitaker, 1995).

Sendo a polifenol-oxidase uma enzima relativamente sensível ao calor, que se inactiva após exposição a temperaturas superiores a 50 °C, são exemplos de formas de controlo do escurecimento enzimático os tratamentos térmicos, a atmosfera modificada, a adição de sulfitos e de ácido ascórbico, e a redução do pH mediante a adição de ácido cítrico, málico ou fumárico (Nicoli *et al.*, 1991; Man, 2002).

2.1.2.3.2 - Escurecimento não enzimático – Reacção de Maillard

As reacções de Maillard são consideradas as mais importantes no processo de escurecimento não enzimático, constituindo uma das mais frequentes e complexas formas de alteração dos géneros alimentícios, influenciando a sua cor, aroma, sabor e valor nutricional. O desenvolvimento da reacção é influenciado por factores como o pH, a temperatura, a humidade, os iões de metais pesados, a luz, os sulfitos e os fosfatos, entre outros constituintes dos alimentos (Friedman, 1996; Martins *et al.*, 2001; Pan & Melton, 2007).

Este tipo de reacções continua a ser objecto de grande interesse, relacionado principalmente com as qualidades organolépticas dos alimentos, com a sua inocuidade relativamente à formação de mutagénios, com a biodisponibilidade de aminoácidos, e com a química das proteínas *in vivo* em fenómenos relacionados com o envelhecimento e a diabetes mellitus (Nunes & Baptista, 2001).

São intervenientes nestas reacções os compostos detentores de grupos amina, como a amónia, aminoácidos, peptídeos e proteínas, e os compostos detentores de grupos carbonilo como os açúcares redutores, e outros compostos que podem resultar da oxidação dos ácidos gordos, do ácido ascórbico e de polifenóis (Friedman, 1996; Martins *et al.*, 2001; Nunes & Baptista, 2001).

As primeiras etapas destas reacções são relativamente simples e ocorrem entre grupos amínicos livres e os grupos hidroxil-glucosídicos dos açúcares redutores, podendo os aldeídos e as cetonas também reagir com os grupos amínicos, conduzindo à formação de um número limitado de derivados: bases de Schiff, aldose-aminas e compostos de Amadori (Friedman, 1996; Nunes & Baptista, 2001; Pan & Melton, 2007).

As etapas seguintes, mais complexas, caracterizam-se pela degradação dos compostos de Amadori, originando a formação de variadíssimos outros compostos, muitos deles moléculas insaturadas capazes de se polimerizar (Friedman, 1996; Nunes & Baptista, 2001).

A caramelização que decorre do aquecimento ou do tratamento de açúcares por soluções alcalinas, não deve ser confundida com as reacções de Maillard onde intervêm grupos amina e carbonilo, isto apesar de determinadas reacções que ocorrem durante a degradação por efeito térmico positivo dos açúcares serem semelhantes às que se verificam a temperaturas inferiores entre oses e aminoácidos (Nunes & Baptista, 2001).

Nas primeiras fases da reacção de Maillard os complexos amina-açúcar que se produzem, detêm certas propriedades físico-químicas como a ausência de cor, alta solubilidade e estabilidade ao calor, que diferem muito das propriedades dos produtos finais que marcam a reacção e se caracterizam por serem pouco solúveis e de cor castanha (Martins *et al.*, 2001; Nunes & Baptista, 2001). A sua expressão é tanto maior quanto o tempo e a temperatura a que ocorrem as reacções, a disponibilidade de grupos amina e de aldeídos, as condições alcalinas do meio e a presença de fosfatos (Friedman, 1996; Man, 2002; Pan & Melton, 2007).

A diversidade de produtos resultantes influenciam de forma significativa a qualidade nutricional dos alimentos, quer pela diminuição da sua digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos, quer pela presença de compostos tóxicos e mutagénios (Friedman, 1996; Nunes & Baptista, 2001; Ramírez *et al.*, 2004).

Mas pode também ocorrer uma melhoria dessa qualidade quando alguns desses produtos detêm acção antioxidante, antimicrobiana ou contribuem para a obtenção de características organolépticas desejadas em produtos tostados como o cacau, café, pão, bolos, biscoitos, cereais e carnes cozinhadas (Barnett & Hie-Joon, 1998; Man, 2002; Martins *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2004).

Determinados conservantes alimentares derivados do enxofre, como o dióxido de enxofre, sulfitos, bissulfitos e metabissulfitos, também têm como principal função retardar a produção de compostos que levam ao escurecimento não enzimático, formando compostos intermediários estáveis com os intermediários insaturados e instáveis das reacções de Maillard, reduzindo dessa forma a concentração de reagentes intermediários capazes de formar melanoidinas (Wedzicha, 1984; Nunes & Baptista, 2001; Man, 2002).

2.1.3 - Actividade microbiológica nos alimentos

Entre os diversos aspectos incluídos na microbiologia dos alimentos, destacam-se pela sua importância potencial, a protecção do consumidor contra as doenças de origem microbiana transmitidas por alimentos e, a prevenção da deterioração microbiológica dos alimentos (Mossel *et al.*, 1995; Walker, 1996; Eifert *et al.*, 2006).

A origem e as características bioquímicas são, em geral, diferentes entre os microrganismos de interesse sanitário e os microrganismos responsáveis pela deterioração dos alimentos. Este facto determina que os alimentos portadores de microrganismos potencialmente patogénicos e/ou suas toxinas em quantidades capazes de causar doença, não apresentem geralmente sinais evidentes de deterioração, e que as medidas eficazes no controlo do crescimento dos microrganismos patogénicos não o são necessariamente para o controlo da microflora saprófita (Mossel & Garcia, 1985; Mossel *et al.*, 1995; Walker, 1996; Eifert *et al.*, 2006). Por outro lado, a inibição do desenvolvimento dos microrganismos saprófitas principalmente por refrigeração, é também geralmente eficiente no controlo do crescimento dos microrganismos patogénicos (Walker, 1996; Gram, 2006; James, 2006). A contaminação microbiológica de um alimento corresponde a uma situação completamente distinta da multiplicação de microrganismos num alimento (Mossel & Garcia, 1985; Sprenger, 1993; Anderson & Pascual, 2000; Gram, 2006).

Por vezes, a presença de uma relativamente pequena quantidade de microrganismos é suficiente para causar doença, e um alimento contaminado pode contaminar outros alimentos. Porém, a contaminação de um alimento não implica

necessariamente que este cause doença no consumidor ou que seja responsável por alterações dos caracteres organolépticos do produto, o perigo potencial vem antes da posterior possibilidade de multiplicação desses microrganismos, que importa controlar (Mossel & Garcia, 1985; Sprenger, 1993; Nicholas, 1995; Hubbert *et al.*, 1996).

Nem sempre a multiplicação dos microrganismos nos alimentos resulta em perigo para a saúde do consumidor nem determina a sua deterioração. É o que acontece nos alimentos curados e fermentados, detentores de elevados teores de microrganismos sem prejuízo da saúde do consumidor. Porém, a margem entre as populações de microrganismos desejáveis e não desejáveis é frequentemente estreita, passando a garantia de qualidade microbiológica desses produtos pela obediência aos mesmos princípios que regem a produção de alimentos perecíveis não fermentados, procurando-se controlar a influência nas populações microbianas presentes nos alimentos de diversos factores como o processamento industrial e o modo de conservação, (Beales & Smith, 2004; Demeyer, 2006; Guizani & Mothershaw, 2006; Garriga & Aymerich, 2007; Petäjä-Kanninen & Puolanne, 2007).

Quando um microrganismo é transferido para um novo ambiente, a sua sobrevivência depende da sua capacidade em se adaptar, primeiro através do ajuste termodinâmico da célula, por exemplo ao stresse osmótico, e depois de forma mais lenta e progressiva mediante alterações nas suas actividades metabólicas (Sinell, 1980; Lenovich, 1987; Mossel *et al.*, 1995; Eifert *et al.*, 2006).

Deste modo, o tipo e a quantidade de metabolitos resultantes da actividade microbiana dependem do alimento e dos microrganismos que nele se desenvolvem. Por exemplo, na carne e nos produtos cárneos, o desenvolvimento de visco superficial e a diminuição do pH, dependem da presença de hidratos de carbono fermentáveis, e a presença de D-lactato e de acetato reflectem a presença de grandes quantidades de *Lactobacillus* sp., enquanto a presença de D-lactato e de etanol resultam de grandes populações de *Leuconostoc* sp. (Borch *et al.*, 1996; Gram, 2006).

Assim e em alternativa à realização de análises microbiológicas, podem utilizar-se, por vezes, outros indicadores capazes de espelhar as alterações microbianas ocorridas na carne e produtos cárneos, como o D-lactato, acetoína, tiramina, pH e a composição gasosa da embalagem, porém, o recurso a este tipo de indicadores depende

muito da composição do produto em questão (Bauer, 1996; Borch *et al.*, 1996; Ellis, 1996; Eburne & Prentice, 1996).

Na carne e nos produtos cárneos, a deterioração pode ser definida a partir de um determinado nível de contaminação microbiana ou de outras características como cheiro, sabor ou aparência que os tornam inaceitáveis (Varnam & Sutherland, 1995; Ellis, 1996; Bauer, 1996; Eburne & Prentice, 1996; Singh, 1996; Guerrero & Chabela, 2000; Nychas & Drosinos, 2000; Ranken, 2000; Konstantinus *et al.*, 2006).

No caso de produtos com validade curta ou muito curta, o recurso aos métodos clássicos de microbiologia não permite a obtenção de resultados em tempo útil, uma vez que os alimentos são comercializados ou consumidos em fase anterior ao conhecimento dos resultados analíticos (Mossel *et al.*, 1995; Nicholas, 1995; Anderson & Pascual, 2000; Uyttendaele & Debevere, 2006^{a,b}).

Esta situação desencadeou o desenvolvimento de métodos rápidos específicos e extremamente sensíveis para a detecção de microrganismos potencialmente patogénicos, baseados em técnicas imunológicas e moleculares, as quais poderão igualmente vir a ser desenvolvidas para a detecção precoce de microrganismos saprófitas específicos de determinados produtos alimentares (Huis in't Veld, 1996; Khachatouranis & Arora, 2000; Upmann & Bonaparte, 2000; Uyttendaele & Debevere, 2006^b).

A identificação dos microrganismos saprófitas associados à deterioração dos diferentes géneros alimentícios, e o conhecimento objectivo dos seus efeitos, constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de métodos rápidos para a detecção ou enumeração precoce deste tipo microrganismos (Huis in't Veld, 1996; Khachatouranis & Arora, 2000).

A deterioração microbiológica de um alimento resulta, assim, da actividade de uma variedade de microrganismos que o colonizam e que constituem a sua flora microbiana. O tipo e a proliferação destes microrganismos depende das características do produto, e o seu desenvolvimento é influenciado por, parâmetros intrínsecos, parâmetros extrínsecos, o modo de processamento/conservação e parâmetros implícitos (Sinell, 1980; Mossel *et al.*, 1995; Guerrero & Chabela, 2000; Hansen & Bautista, 2000; Moss, 2000; Nychas & Drosinos, 2000; Eifert *et al.*, 2006). O efeito de qualquer um destes parâmetros vai interferir nos restantes, e geralmente o efeito de uma combinação

de parâmetros apresenta uma complexidade e dimensão superior à esperada pela soma de cada um (Sinell, 1980; Huis in't Veld, 1996; Eifert *et al.*, 2006).

Os parâmetros intrínsecos são as propriedades físicas, químicas e estruturais dos alimentos, de que são exemplos mais importantes a actividade da água, acidez, potencial redox, os nutrientes disponíveis e a existência de substâncias naturais de cariz antimicrobiano (Mossel *et al.*, 1995; Huis in't Veld, 1996; Eifert *et al.*, 2006).

As condições ambientais em que os alimentos se encontram armazenados, nomeadamente, a temperatura, humidade relativa e a composição gasosa da atmosfera envolvente constituem os parâmetros extrínsecos (Mossel *et al.*, 1995; Huis in't Veld, 1996; Beales & Smith, 2004; Eifert *et al.*, 2006).

Os métodos de processamento e conservação dos alimentos, sejam de carácter físico ou químico, alteram as características do produto e vão determinar a microflora associada a cada tipo de alimento (Sinell, 1980; Beales & Smith, 2004; Eifert *et al.*, 2006).

Finalmente, por parâmetros implícitos, entendem-se as relações mútuas verificadas entre os diferentes grupos de microflora presentes no alimento, que, de forma sinérgica ou antagónica, influenciam a respectiva actividade (Mossel *et al.*, 1995; Huis in't Veld, 1996; Beales & Smith, 2004; Eifert *et al.*, 2006).

São exemplos de efeitos sinérgicos a produção ou a disponibilização de nutrientes essenciais decorrentes do desenvolvimento de determinados grupos de microrganismos, possibilitando desse modo o crescimento de outros que de outra forma não conseguiriam desenvolver-se. Também as alterações no pH, potencial redox e a_w provocadas pela proliferação de alguns microrganismos podem contribuir para o desenvolvimento de outros, menos tolerantes ao efeito inibitório desses factores, que desse modo passam a contribuir para a deterioração secundária do alimento (Bauer, 1995; Beales & Smith, 2004; Eifert *et al.*, 2006).

Por seu lado, os processos antagónicos incluem a competição pelos nutrientes essenciais, alterações no pH, potencial redox ou a formação de substâncias de cariz antimicrobiano, de que são exemplo a bacteriocinas, que afectam negativamente a sobrevivência e crescimento dos restantes microrganismos (Huis in't Veld, 1996; Beales & Smith, 2004; Eifert *et al.*, 2006).

Outro fenómeno com interesse na conservação dos alimentos é a homeostase dos microrganismos, processo que garante a sua sobrevivência em ambiente adverso mediante respostas adequadas, e que interessa conhecer a fim de prolongar a fase lag ou mesmo promover a sua morte antes do equilíbrio normal voltar a ser restabelecido (Roller, 1999; Gorris, 2000; Leistner, 2000; Beales & Smith, 2004).

Não são ainda completamente conhecidas as reacções dos microrganismos perante situações de stresse que ocorrem frequentemente nos alimentos, advindo a maioria deste conhecimento de extrapolações realizadas a partir de experiências laboratoriais em culturas puras. Porém, parece evidente que os microrganismos possuem uma série de mecanismos através dos quais se adaptam mais ou menos rapidamente a determinados ambientes, permitindo-lhes colonizar e desenvolver-se em diferentes substratos, e numa vasta gama de condições hostis (Roller, 1999; Leistner & Gould, 2002; Stahnke & Tjener, 2007).

Os microrganismos não estão pois estritamente limitados a determinados intervalos específicos de temperaturas, pH, e a_w , conseguindo adaptar-se e sobreviver em condições para além dos valores estabelecidos laboratorialmente, mostrando diferentes respostas adaptativas como a acumulação de substâncias osmoprotectoras em situações de *stress* osmótico, e a tolerância a baixos valores de pH ou elevadas temperaturas pela indução de proteínas termorresistentes, além de outros compostos (Gould, 1988; Mossel *et al.*, 1995; Huis in't Veld, 1996; Leistner & Gould, 2002).

A compreensão destes mecanismos é de fundamental importância no controlo e prevenção do crescimento dos microrganismos nos alimentos, permitindo intervir de forma a contrariar contrariando o desenvolvimento de resistências aos diferentes tratamentos físicos e químicos (Leistner & Gorris, 1995; Roller, 1999; Leistner & Gould, 2002; Beales & Smith, 2004).

2.1.3.1 - Microrganismos saprófitas

A conservação da carne tem como principais preocupações o controlo das contaminações microbianas e das alterações autolíticas, resultantes da acção enzimática ao nível celular, sendo os maus sabores desenvolvidos a partir da actividade dos

microrganismos que a contaminam superficialmente uma das maiores causas de deterioração (Huis in't Veld, 1996; Borch *et al.*, 1996; Gill, 1996; Guerrero & Chabela, 2000).

Comparativamente com outros, a deterioração dos alimentos proteicos, como a carne, peixe, marisco, leite e laticínios é mais rápida e evidente, pelo facto de se tratar de produtos ricos em nutrientes, de pH neutro ou ligeiramente ácido e com elevado teor de humidade, o que facilita o rápido desenvolvimento de uma larga gama de microrganismo (Gill, 1996; Leistner & Gould, 2002; Dalgaard, 2006; Konstantinus *et al.*, 2006; Labadie, 2007).

Os padrões de deterioração microbiana nestes alimentos têm-se revelado similares. Inicialmente, os microrganismos saprófitas específicos de cada um encontram-se presentes em pequena quantidade, constituindo uma pequena fracção da microflora existente, mas, ao longo do armazenamento os microrganismos saprófitas específicos desenvolvem-se mais rapidamente que os restantes, produzindo metabolitos responsáveis pela formação de maus odores, sabores e visco que provocam a rejeição do produto (Huis in't Veld, 1996; Coppet & Christean, 2004; Konstantinus *et al.*, 2006; Labadie, 2007).

Porém, não deixa de ser extremamente difícil estabelecer uma correlação precisa entre os valores das contagens bacterianas, principalmente das bactérias ácido lácticas (BAL), e a deterioração sensorial dos produtos cárneos, o que dificulta a utilização dessas contagens como indicadores do grau de deterioração desses produtos (Huis in't Veld, 1996; Gill, 1996; Guerrero & Chabela, 2000).

Ainda assim, observam-se normalmente como valores máximos alcançados em contagens totais em carne e produtos cárneos conservados sob refrigeração, resultados respectivamente da ordem das $10^7 - 10^9$ ufc/cm² e $10^7 - 10^8$ ufc/g de produto analisado (Borch *et al.*, 1996; Gill, 1996; Guerrero & Chabela, 2000).

Em vez da contagem total de bactérias como indicador do grau de deterioração, deverá antes recorrer-se à análise do crescimento de determinados grupos específicos de microrganismos saprófitas, cuja presença está estreitamente relacionada com a degradação de determinado tipo de produto, sendo para isso necessário proceder antecipadamente à sua identificação (Borch *et al.*, 1996; Huis in't Veld, 1996).

O número de microrganismos saprófitas específicos no momento a partir do qual o produto é rejeitado, pode ser denominado por nível de deterioração mínimo, e pode também a concentração de metabolitos presentes nesse momento ser utilizada como um indicador químico do estado de deterioração do produto (Bauer, 1996; Dalgaard, 2006).

A alteração das condições extrínsecas permite atrasar a deterioração dos alimentos, o seu armazenamento adequado a baixas temperaturas não a impede por completo mas limita o normal desenvolvimento dos microrganismos, discriminando de forma positiva os psicrotróficos, que geralmente englobam juntamente com alguns bastonetes Gram-positivos compostos por bactérias ácido lácticas e bactérias esporulantes do género *Clostridium*, grande quantidade de bactérias Gram-negativas não esporulantes em forma de bastonete da família das *Pseudomonaceae* (Mossel *et al.*, 1995; Huis in't Veld, 1996; Ross & Nichols, 2000; Coppet & Christean, 2004 ; Gram, 2006).

Para além das bactérias ácido lácticas e de *Pseudomonas* spp., assume especial importância no caso dos produtos conservados pelo frio o microrganismo *Brochothrix thermosphacta*, que é anaeróbio facultativo, e que em função do pH e da permeabilidade ao oxigénio do material utilizado na embalagem, altera produtos cárneos embalados a vácuo, originando a formação de visco, aromas e sabores estranhos devidos à produção de ácidos gordos de cadeia curta (Marth, 1998; Holley, 2000; Guerrero & Chabela, 2000).

Embora muitas leveduras e bolores também sejam psicrotróficos, geralmente não apresentam vantagem competitiva sobre as bactérias, quando a baixas temperaturas porém, podem tornar-se importantes em alimentos em que as bactérias crescem com dificuldade, como é o caso dos alimentos ácidos, com elevadas concentrações de açúcar ou de sal (Huis in't Veld, 1996; Ross & Nichols, 2000; Gram, 2006).

O teor de bactérias mesófilas inicialmente presente na carne e nos produtos cárneos cozinhados, com origem em diferentes espécies animais, é de cerca de 10^2 - 10^3 ufc/g. Porém, só 10% destes microrganismos inicialmente presentes são capazes de se desenvolver a temperaturas de refrigeração, e dentro destes os que contribuem activamente para a alteração do produto constituem uma fracção ainda menor (Gill, 1996; Borch *et al.*, 1996; Zeuthen & Mead, 1996).

Como a grande maioria dos produtos cárneos no decorrer do seu processamento são submetidos a temperaturas da ordem dos 65-75 °C, verifica-se a morte da quase totalidade das células vegetativas presentes, pelo que uma recontaminação posterior comprometerá o prazo de validade destes produtos (Stiebing, 1992^a; Nicholas, 1995; Honikel, 1996; Shaw, 1996; Marks, 2006).

Dependendo do número e do tipo de microrganismos inicialmente presentes e do seu subsequente crescimento durante o armazenamento, a validade da carne fresca e dos produtos cárneos refrigerados pode variar desde alguns dias até alguns meses, em função das condições ambientais que vão seleccionar os microrganismos com capacidade de desenvolvimento, influenciando as suas taxas de crescimento e a respectiva actividade (Borch *et al.*, 1996; James, 1996, 2006; Zeuthen & Mead, 1996).

Assim, a estabilidade microbiológica dos produtos cárneos cozinhados ou curados depende de factores extrínsecos, principalmente do tipo de embalagem e da temperatura de conservação, e de factores intrínsecos como a composição do produto (Stiebing, 1992^b; Tändler, 1992^a; Labadie, 2007).

A principal alteração de sabor descrita em produtos cárneos processados refrigerados, embalados a vácuo ou em atmosfera modificada é a ocorrência do sabor azedo ou ácido, resultado da actividade das bactérias ácido lácticas (BAL), que dependendo do seu género, espécie e condições de crescimento produzem ácidos como o láctico, acético e o fórmico (Tändler^a, 1992; Eburne & Prentice, 1996; Zeuthen & Mead, 1996; Guerrero & Chabela, 2000).

Nos produtos cárneos em condições de aerobiose, ou embalados a vácuo recorrendo a filmes plásticos com elevada permeabilidade ao oxigénio, para além do sabor azedo ou ácido, podem desenvolver-se odores ligeiramente adocicados tipo queijo, pois as condições aeróbias induzem a formação de acetoína mediante a acção de *B. thermosphacta*, *Lactobacillus* spp. e *Carnobacterium* spp. (Borch *et al.*, 1996; Holley, 2000; Guerrero & Chabela, 2000; Holley *et al.*, 2002).

Alguns microrganismos, em condições de aerobiose, têm capacidade de produzir metabolicamente H₂O₂ que por oxidar o hemopigmento do músculo, a coleomioglobina, provoca o aparecimento de manchas de cor esverdeada (Bauer, 1995; Borch *et al.*, 1996; Holley *et al.*, 2002; Peirson *et al.*, 2003 ; Coppet & Christiean, 2004).

A formação destas manchas no centro dos produtos cárneos processados resulta geralmente da actividade de bactérias que resistem ao tratamento térmico e que posteriormente em condições aeróbias produzem H₂O₂, como a *Weissella viridescens* em salsichas, com capacidade para sobreviver mais de 40 minutos a uma temperatura de 68°C (Borch *et al.*, 1996; Holley *et al.*, 2002; Peirson *et al.*, 2003).

Quando a alteração de cor ocorre na superfície dos produtos deve-se geralmente a contaminação pós-processamento térmico, como é o caso das bactérias homofermentativas do género *Lactobacillus* spp., e das heterofermentativas dos géneros *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. e do *Carnobacterium divergens*, ou ainda de outras bactérias dos géneros *Enterococcus* spp. e *Pediococcus* spp. (Bauer, 1995; Borch *et al.*, 1996; Nychas & Drosinos, 2000; Guerrero & Chabela, 2000).

O desenvolvimento de visco é um dos primeiros sinais indicadores de deterioração dos produtos cárneos, ocorrendo frequentemente antes do termo da data de validade, associado à presença de bactérias das espécies *Lactobacillus sake*, *Leuconostoc amelibiosum*, *Ln. carnosum*, *Ln. gelidum*, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Borch *et al.*, 1996; Nychas & Drosinos, 2000; Guerrero & Chabela, 2000).

Nos produtos cárneos cozinhados e embalados a vácuo o visco resulta geralmente da acção de BAL heterofermentativas dos géneros *Leuconostoc* spp. e *Lactobacillus* spp., tendo sido isoladas bactérias produtoras de visco das espécies *L. sake* e *Ln. amelibiosum* em salas de unidades transformadoras de produtos cárneos, onde se procedia à manipulação do produto em fases posteriores ao seu tratamento térmico (Borch *et al.*, 1996; Eburne & Prentice, 1996; Guerrero & Chabela, 2000).

A ocorrência de odores estranhos também acompanha o processo de deterioração da carne e dos produtos cárneos, resultando da libertação de substâncias voláteis produzidas no decorrer deste processo, consequência da actividade e interacção entre os vários tipos de microrganismos presentes (Borch *et al.*, 1996; Huis in't Veld, 1996; Guerrero & Chabela, 2000).

Os primeiros sinais de deterioração da carne são reconhecidos pela formação de ésteres adocicados, frutados e, posteriormente por compostos sulfurados pútridos, odores causados por compostos voláteis como o indol, metanotiol, dimetilsulfito e amoníaco, que resultam da decomposição das proteínas e dos aminoácidos mediante

acção de bactérias, estando os problemas de ranço que geralmente ocorrem ligados mais à oxidação das gorduras, especialmente os lípidos insaturados, do que ao desenvolvimento microbiano (Huis in't Veld, 1996; Gill, 1996; Guerrero & Chabela, 2000).

A formação de gás, CO₂, também pode ocorrer e está geralmente associada ao desenvolvimento de microrganismos pertencentes ao género *Leuconostoc* spp. casos do *Ln. mesenteroides*, *Ln. carnosum* e *Ln. amelibiosum* (Borch *et al.*, 1996; Coppet & Christean, 2004).

2.1.3.1.1 - Bactérias Gram-negativas em forma de bastonete

Pseudomonas spp. são dos microrganismos saprófitas mais vulgares, e desenvolvem-se particularmente em alimentos acondicionados em aerobiose com elevado conteúdo em água e valores de pH próximos da neutralidade, e como muitas das suas espécies são psicrotróficas, estes microrganismos são frequentemente responsáveis pela degradação de produtos frescos conservados pelo frio como é o caso da carne, peixe, leite e laticínios (Mossel *et al.*, 1995; Sundheim *et al.*, 1998; Cousin, 2000).

Tal com a maioria das bactérias Gram-negativas em forma de bastonete, as *Pseudomonas* spp. constituem inicialmente apenas uma pequena parte da microflora dos alimentos frescos. Porém, o facto de se encontrarem amplamente distribuídas no ambiente, aliado à sua capacidade de fazer uso de diferentes tipos de substratos, garante-lhes uma significativa vantagem competitiva comparativamente com os restantes microrganismos presentes neste tipo de alimentos (Huis in't Veld, 1996; Zeuthen & Mead, 1996; Cousin, 2000; Nychas & Drosinos, 2000).

O maior ou menor desenvolvimento das *Pseudomonas* spp. assim como o de outras bactérias psicrotróficas Gram-negativas depende, entre outros factores, da tensão de oxigénio, do teor em sal, da presença de aditivos alimentares, e do pH e a_w do género alimentício (Mossel *et al.*, 1995; Sundheim *et al.*, 1998; Cousin, 2000).

A acção das *Pseudomonas* spp. na deterioração dos alimentos de origem animal começa por verificar-se na fracção rica em azoto não proteico, seguida da produção de lipases e de proteases que vão respectivamente catalisar reacções de degradação da fracção lipídica e proteica do alimento, com a consequente libertação de ácidos gordos e de aminoácidos responsáveis pelo surgimento de maus sabores, maus odores e ranço. Posteriormente, em fases mais adiantadas segue-se a formação de visco e de alterações visíveis da cor do alimento (Zeuthen & Mead, 1996; Marth, 1998; Sundheim *et al.*, 1998; Nychas & Drosinos, 2000).

Outros géneros de bactérias Gram-negativas em forma de bastonete com capacidade de se desenvolverem rapidamente a baixas temperaturas, que contribuem frequentemente para a deterioração dos alimentos de origem animal, são os microrganismos pertencentes aos géneros *Aeromonas* spp., *Photobacterium* spp., *Shewanella* spp. e *Vibrio* spp. (Huis in't Veld, 1996 ; Zeuthen & Mead, 1996; Blair *et al.*, 2000; Leisner & Gram, 2000; Gram & Vogel, 2000; Desmarchelier, 2000).

A temperaturas compreendidas entre os 5 e os 10 °C a família das Enterobacteriaceae geralmente é dominante relativamente às bactérias do género *Pseudomonas* spp., podendo desempenhar, caso as condições o permitam, uma posição relevante na deterioração dos alimentos. A sua presença é frequentemente usada como indicador de segurança alimentar, de eventual contaminação fecal, processamento inadequado do alimento ou de contaminações posteriores ao processamento (Huis in't Veld, 1996; Nychas & Drosinos, 2000; Pandey *et al.*, 2000).

Já as bactérias do género *Vibrio* spp. são pouco frequentes, sendo na sua grande maioria bactérias halófilas, constituindo preocupação principalmente em carnes curadas e peixes marinhos (Huis in't Veld, 1996; Desmarchelier, 2000).

2.1.3.1.2 - Bactérias Gram-positivas esporulantes

São muitos os alimentos que no decorrer do seu processamento são submetidos a tratamentos térmicos, e nestes casos são particularmente importantes os microrganismos capazes de sobreviver a esses tratamentos, como são os *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp., devendo dar-se especial atenção àqueles que evidenciam capacidade de

desenvolvimento a temperaturas de refrigeração (Huis in't Veld, 1996; Blaschek, 2000^a; Dahl, 2000).

Tendencialmente, o crescimento das bactérias esporulantes é mais lento do que o das bactérias Gram-negativas, porém, estas dificilmente resistem à acção das altas temperaturas sucumbindo durante o processamento térmico dos alimentos (Huis in't Veld, 1996).

As bactérias do género *Bacillus* spp. são maioritariamente aeróbias, sendo o *B. cereus* capaz de se desenvolver a temperaturas de 5 °C ou menos, e produzir enzimas susceptíveis de alterar os alimentos, podendo outras espécies deste género inclusivamente desenvolver-se a temperaturas muito próximas dos 0 °C (Dahl, 2000; Batt, 2000^a).

Já os microrganismos saprófitas do género *Clostridium* spp. não conseguem geralmente desenvolver-se a temperaturas de refrigeração inferiores a 5 °C, porém, a temperaturas ligeiramente superiores já podem causar estragos, tendo alguns *Clostridium* spp. psicrotróficos sido apontados como agentes da deterioração de carne, peixe e respectivos produtos embalados a vácuo, de vida útil prolongada ou “sous-vides” (Huis in't Veld, 1996; Blaschek, 2000^a).

2.1.3.1.3 - Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) deterioram os alimentos mediante a fermentação dos açúcares, dando origem à formação de ácido láctico, visco e CO₂, provocando a diminuição dos valores de pH e a formação de maus sabores (Huis in't Veld, 1996; Čurda, 2000).

Geralmente as BAL estão presentes em pequenas quantidades na microflora inicial do alimento, além de que em condições de refrigeração o seu desenvolvimento tende a ser lento e em condições de aerobiose é geralmente ultrapassado pelas bactérias do género *Pseudomonas* spp., por isso não são frequentemente responsáveis pela deterioração de alimentos frescos ricos em proteína (Huis in't Veld, 1996).

Porém, as BAL têm sido apontadas como os principais agentes de deterioração em carnes embaladas a vácuo, e também em produtos cárneos curados ou fermentados, pelo facto de se tornarem mais competitivas relativamente à restante microflora saprófita, tolerando com facilidade condições de anaerobiose, baixos valores de pH e outros factores de conservação (Huis in't Veld, 1996; Čurda, 2000).

É pois possível isolar a partir de produtos cárneos deteriorados culturas puras de BAL ou misturas de *Lactobacillus* spp. com *Leuconostoc* spp., mas também uma grande diversidade de outros microrganismos têm sido isolados a partir de produtos cárneos no final do seu prazo de validade (Borch *et al.*, 1996; Batt, 2000^b).

Além deste tipo de alimentos, as BAL podem também ser responsáveis pela deterioração de uma série de outros alimentos como leite e produtos lácteos, vegetais, sumos de fruta, produtos açucarados, bebidas alcoólicas e conservas em vinagre (Marth, 1998; Čurda, 2000).

O género e a espécie das BAL responsáveis pela deterioração de um determinado alimento está directamente relacionado com a sua composição específica, com flora tipicamente presente no produto, e também com a flora relacionada com o local de fabrico (Borch *et al.*, 1996; Lonvaud-Funel, 2000).

Tipicamente as BAL são bactérias anaeróbias facultativas, maioritariamente pertencentes aos géneros *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Pediococcus* spp., que consoante sejam homofermentativas ou heterofermentativas, produzindo respectivamente ácido láctico a partir do açúcar, ou ácido acético, fórmico, etanol e dióxido de carbono juntamente com o ácido láctico, vão deteriorar os alimentos de forma diferente (Huis in't Veld, 1996; Marth, 1998; Čurda, 2000).

Por outro lado, as BAL desenvolvem uma actividade benéfica na produção de alguns tipos de alimentos fermentados, o que juntamente com a sua capacidade de produção de bacteriocinas, as torna muitas vezes interessantes na conservação e segurança de determinados tipos de alimentos (Batt, 2000^b; Čurda, 2000; Lonvaud-Funel, 2000).

2.1.3.1.4 - Outras bactérias Gram-positivas

Dentro do grupo de bactérias Gram-positivas que participam na deterioração da carne e dos produtos cárneos, encontra-se o *Brocothrix thermosphacta*, que geralmente está presente na carne fresca, e que com a crescente utilização de embalagens a vácuo ou em atmosfera modificada, se torna por vezes o microrganismo saprófita dominante nestes produtos (Holley, 2000; Guerrero & Chabela, 2000).

O facto das bactérias do género *Micrococcus* spp. conseguirem desenvolver-se na presença de sal, torna-as algumas vezes responsáveis pela deterioração de produtos cárneos curados como o bacon, produzindo visco, exsudado e alterações de cor. Algumas estirpes, por serem termodúricas, têm capacidade de sobreviver a processamentos térmicos e, posteriormente, na ausência de competição com outros microrganismos podem tornar-se o principal agente microbiológico de deterioração destes alimentos (Huis in't Veld, 1996; García-López *et al.*, 2000).

2.1.3.1.5 - Fungos

A facilidade com que os bolores e as leveduras utilizam como substratos as pectinas e outros hidratos de carbono, ácidos orgânicos, proteínas e lípidos, é em parte justificação para a frequência com que são encontrados em diversos tipos de ambiente, desde as plantas aos produtos de origem animal, solo, água e insectos (Mossel & Garcia, 1985; Mossel *et al.*, 1995; Marth, 1998; Moss, 2000; Silva *et al.*, 2000).

A este facto acresce-se ainda a sua tolerância a valores baixos de pH e de a_w , temperaturas baixas e presença de conservantes. Não deixa de ser notável a capacidade das leveduras na utilização de aditivos alimentares como os ácidos láctico, acético e cítrico geralmente reconhecidos como inibidores do crescimento de muitos outros microrganismos, e de algumas espécies conseguirem mesmo metabolizar alguns conservantes como o benzoato, o propionato e o sorbato (Miller, 1979; Huis in't Veld, 1996; Statford, 2000; Thomas, 2000).

São pois muito frequentes os estragos causados em produtos alimentares por acção dos fungos, bolores e leveduras, afectando a aparência do produto mediante a

formação de visco frequentemente pigmentado, ou produzindo ácidos, álcool ou gás resultantes da fermentação de açúcares que provocam alterações de sabor e odor, diminuindo a qualidade sensorial do produto (Huis in't Veld, 1996; Khachatourians & Arora, 2000; Moss, 2000; Sarbhoy & Kulshrestha, 2000).

2.1.3.1.5.1 - Bolores

Os bolores têm capacidade para se desenvolver em todos os tipos de alimentos, podendo ser responsáveis por alterações de sabor, produção de toxinas, descolorações, apodrecimento e formação de propágulos patogénicos ou alergénios (Mossel *et al.*, 1995; Filtenborg *et al.*, 1996; Moss, 2000; Silva *et al.*, 2000).

A deterioração das características organolépticas dos alimentos resulta da acção das exoenzimas que são produzidas pelos bolores durante o seu desenvolvimento, os quais conseguem produzir uma grande diversidade de enzimas capazes de actuar sobre os lípidos, prótidos e hidratos de carbono e cuja actividade prevalece mesmo após a remoção ou destruição do micélio (Moss, 2000; Silva *et al.*, 2000; Labadie, 2007).

Da actividade destas enzimas resultam muitos compostos responsáveis por defeitos de sabor nos alimentos, alguns deles com limiares de detecção extremamente baixos como é o caso do tricloroanisol (TCA) cuja presença no café se faz notar a partir das 8 ng/l, mas também resulta um importante contributo para a desintegração da estrutura dos alimentos (Mossel *et al.*, 1995; Filtenborg *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2000).

Para além da deterioração visível dos alimentos, outro aspecto muito importante da actividade saprófita dos bolores é a produção de micotoxinas, sendo já conhecidas e com tendência a aumentar mais de 400, metabolitos secundários de toxicidade variável para os animais vertebrados, que variam muito quanto à sua toxicidade. Nos humanos as micotoxicoses crónicas são as mais preocupantes, sendo a acção das aflatoxinas a melhor estudada em termos toxicológicos (Filtenborg *et al.*, 1996; Marth, 1998; Khachatourians & Arora, 2000; Soares, 2003).

Algumas micotoxinas têm acentuada actividade antibiótica, o que poderá levar ao desenvolvimento de fenómenos de resistência cruzada em bactérias, possibilitando-

lhes sobreviver à acção de muitos antibióticos usados actualmente, além de que muitas das micotoxinas actuam de forma sinérgica (Filtenborg *et al.*, 1996; Soares, 2003).

Se bem que algumas micotoxinas estejam apenas presentes no micélio, a maioria é excretada para os alimentos onde se vai difundir mais ou menos rapidamente de acordo com as características do produto, contaminando-o total ou parcialmente. Em virtude da sua grande resistência aos tratamentos físicos e químicos a prevalência das micotoxinas nos alimentos é grande, acompanhando-os ao longo do seu processamento e armazenamento, pelo que, a utilização de qualquer matéria-prima contaminada na elaboração de alimentos vai certamente contribuir para a presença de micotoxinas no produto final (Filtenborg *et al.*, 1996; Moss, 2000; Soares, 2003).

Sendo metabolitos secundários, as micotoxinas são individualmente produzidas por um limitado número de espécies; por exemplo, as aflatoxinas são produzidas apenas por algumas espécies próximas como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, e outras micotoxinas como a ocratoxina-A é produzida só por algumas espécies como *Petromyces alliaceus*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* (Filtenborg *et al.*, 1996; Moss, 2000).

Por outro lado, um elevado número de espécies de bolores tidas como tóxicas têm capacidade para produzir um considerável número de micotoxinas diferentes, por exemplo, *Penicillium griseofulvum* produz patulina, griseofulvina, ácido ciclopiazónico e roquefortina-C. Põe-se mesmo a questão se haverá alguma espécie que exista naturalmente que não produza micotoxinas, sendo porém certo que o perfil e a quantidade de micotoxinas produzidas dependem sempre dos parâmetros ecológicos e de processamento característicos de cada alimento (Filtenborg *et al.*, 1996; Soares, 2003).

Os parâmetros característicos de cada alimento, para além de restringirem as micotoxinas que poderão eventualmente ser produzidas, também determinam as espécies de bolor capazes de nele se desenvolverem. Para cada alimento geralmente não existe mais do que uma dezena de bolores com capacidade para o deteriorar, sendo frequentemente esse número reduzido para duas ou três espécies (Khachatourians & Arora, 2000; Silva *et al.*, 2000).

Os bolores pertencentes aos géneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. são produtores de micotoxinas, porém, só certas espécies pertencentes

aos géneros *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. o conseguem fazer a baixas temperaturas. Dentro dos bolores psicrófilos incluem-se a *Botrytis cinerea*, *Geotrichium candidum*, *Pullaria pullulans* e algumas outras espécies dos géneros *Alternaria* spp., *Monilia* spp., *Mucori* spp., *Penicillium* spp., *Sporotrichium* spp. e *Rhizopus* spp. que não só se manifestam através da sua visível presença, como também pela libertação de enzimas capazes de degradar hidratos de carbono, lipídios e proteínas com consequências negativas a nível de textura, sabor e aroma dos alimentos (Huis in't Veld, 1996; Marth, 1998; Moss, 2000; Silva *et al.*, 2000).

As novas metodologias com recurso ao estudo de perfis combinados de metabolitos secundários, perfis de isoenzimas, características fisiológicas e ecológicas, padrões de DNA e morfológicos, têm possibilitado discernir entre as espécies de bolores que estão presentes como propágulos e as que efectivamente têm capacidade para deteriorar o alimento (Filtenborg *et al.*, 1996; Khachatourians & Arora, 2000; Sarbhoy & Kulshrestha, 2000).

Os propágulos constituídos por conídeos, ascósporos e fragmentos de micélio podem estar presentes pelas mais variadas razões, podendo mesmo constituir parte da microflora considerada normal no alimento, que não o deteriora e que por interacção pode mesmo impedir o desenvolvimento de outras espécies potencialmente capazes de o deteriorar (Mossel *et al.*, 1995; Moss, 2000; Silva *et al.*, 2000).

Nas primeiras fases dos processos fermentativos dos produtos de salsicharia fermentados são as leveduras que dominam a flora fúngica, mas após algumas semanas passam a ser os bolores a dominar. Algumas vezes, espécies como *Penicillium nalgiovense* são intencionalmente adicionadas aos produtos como cultura “starter” sendo depois responsáveis pela produção de micotoxinas e antibióticos (Filtenborg *et al.*, 1996; Spotti & Berni, 2007).

Cada espécie de bolor raramente aparece associada ao processo de deterioração de mais do que um tipo de alimento, o que será devido à selecção exercida pelas complicadas combinações de factores intrínsecos, extrínsecos e de processamento dos produtos alimentares, sendo apenas possível indicar a causa exacta da selecção em situação de acção extrema desse factor (Filtenborg *et al.*, 1996; Moss, 2000; Labadie, 2007).

Assim, alimentos que sejam submetidos a formas de processamento e conservação diferentes das que habitualmente lhe são aplicadas, podem ver dramaticamente, ainda que de forma limitada, alteradas as espécies de fungos responsáveis pela sua deterioração, à semelhança do que acontece com alimentos em que intencionalmente se utilizam os conservantes ácidos sórbico, benzóico e propiónico que possibilitam que *Penicillium roqueforti* passe a ser o fungo mais importante na deterioração desses alimentos (Filtenborg *et al.*, 1996; Statford, 2000; Thomas, 2000).

Deste modo, o limitado número de espécies de bolores que efectivamente são importantes para a qualidade dos alimentos simplifica as acções preventivas e de controlo que podem exercer-se, e conhecendo as espécies responsáveis pela deterioração é possível também otimizar o perfil de conservação dos géneros alimentícios, otimizar a sua produção, tomar medidas de higiene e desenvolver métodos simples de controlo analítico de pontos críticos de contaminação por bolores (Filtenborg *et al.*, 1996; Khachatourians & Arora, 2000; Sarbhoy & Kulshrestha, 2000).

A identificação dos bolores que estão associados a cada tipo de alimento é algo extremamente útil para a indústria agro-alimentar, permitindo estabelecer critérios de qualidade microbiológica, e o efectivo controlo e prevenção da deterioração dos alimentos por acção dos bolores com a consequente contaminação por micotoxinas (Moss, 2000; Silva *et al.*, 2000; Soares, 2003; Labadie, 2007).

2.1.3.1.5.2 - Leveduras

São vários os géneros de leveduras que podem ser encontrados em produtos cárneos e à base de peixe, como por exemplo as pertencentes aos géneros *Candida* spp., *Criptomococcus* spp., *Deboramyces* spp., *Hansenula* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Sporobolomyces* spp., *Torula* spp., *Torulopsis* spp. e *Trichospora* spp., sendo o seu desenvolvimento geralmente acompanhado pela formação de dióxido de carbono, juntamente com o aparecimento de defeitos de sabor e aroma como o fermentado, o frutado e o alcoólico (Miller, 1979; Marth, 1998; Khachatourians & Arora, 2000).

É ainda de referir a capacidade de algumas leveduras do género *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., e *Saccharomyces* spp., conseguirem desenvolver-se a baixas temperaturas da ordem dos -5 °C e a -2 °C, a valores ligeiramente acima do ponto de congelação de alguns produtos alimentares (Marth, 1998; Khachatourians & Arora, 2000).

2.1.2.4 - Microrganismos patogénicos

Os alimentos podem ser veículo de transmissão de diversos microrganismos e metabolitos microbianos algumas vezes patogénicos para o Homem, que de acordo com a sua procedência mais usual podem agrupar-se quanto à sua origem, em endógenos ou exógenos, se já existiam no alimento antes da sua obtenção ou se chegam ao alimento durante o seu processamento, conservação e utilização (Mossel & Garcia, 1985; Nicholas, 1995; Beales & Smith, 2004).

De entre os agentes endógenos destacam-se, nos alimentos de origem animal os microrganismos responsáveis por zoonoses, e em segundo plano os microrganismos causadores de doenças animais não transmissíveis ao Homem, enquanto que nos alimentos de origem vegetal os agentes endógenos não se revestem de importância por não serem patogénicos para o ser humano (Mossel & Garcia, 1985; Hubbert *et al.*, 1996; Zeuthen & Mead, 1996).

Os microrganismos exógenos não existem no alimento no momento da sua obtenção, vão surgindo posteriormente fruto de contaminações que ocorrem ao longo do percurso até ao consumidor final, sendo este tipo de flora maioritariamente constituída por microrganismos saprófitas, mas também eventualmente por microrganismos agentes de toxinfecções alimentares (Mossel *et al.*, 1995; Nicholas, 1995; Notermans & Barendsz, 2002).

Os agentes causadores de toxinfecções alimentares são, na sua grande maioria, de origem exógena, se bem que algumas vezes os alimentos já os podem conter originalmente, podendo o mesmo microrganismo ter em alguns casos origem exógena e noutras endógena como acontece com *Salmonella* spp. (Mossel & Garcia, 1985; Cox, 2000^a; Notermans & Barendsz, 2002).

As doenças causadas por microrganismos transmitidos pelos alimentos, podem dividir-se em dois grupos, infecções alimentares quando o agente patogénico é um microrganismo veiculado pelo alimento que depois se multiplica no interior do tubo digestivo invadindo o hospedeiro ou produzindo toxinas, e intoxicações alimentares quando a doença é causada por toxinas pré-formadas já presentes no alimento no momento em que é ingerido (Mossel & Garcia, 1985; Mossel *et al.*, 1995; Nicholas, 1995; Hubbert *et al.*, 1996; Notermans, 2000; Soares, 2003).

Temos assim doenças causadas por bactérias que contaminam os alimentos e que são capazes de se multiplicar no tracto gastrointestinal produzindo enterotoxinas, de que são exemplo *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. excepto *S. Typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e as causadas por bactérias que se multiplicam no alimento produzindo exotoxinas, de que são exemplo o *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus* (Batt, 2000^{c,d}; Blaschek, 2000^b; Rowe & Madden, 2000; Cox, 2000^a; Harvey & Gilmour, 2000).

Estas doenças, toxinfecções alimentares, resultam geralmente de dois factores, primeiro a contaminação dos alimentos com os agentes patogénicos responsáveis pela doença, segundo a deficiente conservação desses alimentos a temperaturas abusivas, que permitiram a multiplicação e o desenvolvimento dos microrganismos (Mossel & Garcia, 1985; Notermans, 2000; Notermans & Barendsz, 2002).

Analisando globalmente os surtos de toxinfecções alimentares ocorridas, verifica-se que a sua grande maioria fica a dever-se ao consumo de alimentos de origem animal, sendo as causas ou factores que determinaram a presença do microrganismo responsável no alimento, por ordem decrescente de importância, o arrefecimento inadequado de alimentos cozinhados; alimentos com algum tempo de conservação; processamento térmico insuficiente; contaminação por manipuladores infectados; regeneração não eficiente de alimentos já preparados; conservação a temperaturas permissivas; contaminação cruzada entre produtos frescos e produtos já cozinhados (Mossel *et al.*, 1995; Nicholas, 1995; Hubbert *et al.*, 1996; Notermans, 2000).

As doenças mais comuns transmitidas pelos alimentos são causadas por agentes biológicos, especialmente as toxinfecções alimentares devidas a bactérias patogénicas ou suas toxinas, que têm geralmente curtos períodos de incubação e se manifestam por gastroenterite aguda, estado patológico quase sempre benigno para o adulto saudável.

Porém, podem verificar-se situações complicadas, principalmente em indivíduos idosos, muito jovens ou debilitados, à semelhança do que acontece com a listeriose e o botulismo, cuja acção neurotóxica que acompanha o desenvolvimento clínico da enfermidade é, não raro, fatal (Nicholas, 1995; Hubbert *et al.*, 1996; Notermans & Barendsz, 2002; Soares, 2003).

As contaminações fecais e as rupturas da cadeia de frio, são causas frequentes de intoxicação alimentar, porém, a adopção de medidas de higiene simples e o tratamento térmico adequado dos alimentos reduz drasticamente grande número de perigos de origem bacteriana. Importa acrescentar que a contaminação de alimentos com vírus é também causa frequente de gastroenterites e outras doenças (Nicholas, 1995; Notermans, 2000; Soares, 2003).

Durante muitos anos julgou-se que os alimentos convenientemente conservados pelo frio permaneciam seguros por se acreditar que não era possível o desenvolvimento de bactérias patogénicas, quer em número quer em quantidade de toxinas produzidas (Tauxe, 1997; Marth, 1998; Notermans, 2000).

Actualmente é do conhecimento geral que vários são os microrganismos patogénicos que se desenvolvem a temperaturas de refrigeração, sendo disso exemplos *Aeromonas hydrophila*, *Listeria spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, estirpes não proteolíticas de *Clostridium botulinum*, algumas estirpes de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* enteropatogénica (Batt, 2000^{a,c,d}; Bhaduri, 2000; Blair *et al.*, 2000; Desmarchelier, 2000; Johnson, 2000).

Hoje também se sabe que alguns agentes patogénicos têm a capacidade de causar doença mesmo quando ingeridos em pequenas quantidades, como é o caso de *E. coli* O157:H7, em que a ingestão de apenas dez células pode provocar uma colite hemorrágica (Tauxe, 1997; Marth, 1998; Batt, 2000^d).

Relativamente a Portugal, embora não se encontrem referências a surtos de toxinfecções alimentares atribuídas ao consumo de produtos de salsicharia tradicional, tal não significa que estes sejam destituídos de perigo, principalmente produtos cujo processamento não inclui nenhum passo efectivo com acção bacteriostática ou bactericida e/ou a adição de conservantes, apresentando estes produtos muitas vezes características intrínsecas susceptíveis de suportar a multiplicação microbiana de agentes patogénicos (Esteves, 2005; Almeida *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007).

2.1.2.4.1 - *Clostridium botulinum*

O botulismo de origem alimentar é uma doença grave causada pela ingestão de alimentos contaminados com uma potente neurotoxina, cuja formação ocorre mediante o desenvolvimento e esporulação de *Clostridium botulinum*, um microrganismo amplamente espalhado pela natureza (Mossel *et al.*, 1995; Johnson, 2000; Küplülü *et al.*, 2006).

Trata-se de um microrganismo ubíquo que pode ocorrer em muitos e diferentes tipos de alimentos de origem animal ou vegetal e os seus esporos existem abundantemente no solo, poeiras, lodo de rios, lagos e zonas costeiras, no trato intestinal de peixes e animais, verificando-se um predomínio de determinados tipos de *C. botulinum* associados a determinadas regiões geográficas (ICMSF, 1996; Marth, 1998; Johnson, 2000; Webb *et al.*, 2007).

Foi Ermengem quem em 1896, a partir de restos de presunto apontado como causa de um surto de doença ocorrido em 1895, numa orquestra de 34 músicos belgas, caracterizada por neuroparalisia e responsável por 3 mortes, quem pela primeira vez isolou um bacilo anaeróbio, esporulante e produtor de toxinas, que designou por *Bacillus botulinus* (ICMSF, 1996; McLauchlin *et al.*, 2006).

A investigação sobre o *C. botulinum* ficou inicialmente a dever-se à rápida expansão da indústria de alimentos enlatados, e das conseqüentes preocupações com os perigos associados ao deficiente processamento térmico neste tipo de produtos. Hoje, avaliando o volume de produção comercial de enlatados e o número de surtos de botulismo que ocorrem, constata-se que se trata de uma ocorrência muito rara ficando geralmente a dever-se a falhas no processamento ou grandes desvios relativamente aos padrões estabelecidos (Johnson, 2000; Sobel *et al.*, 2004; Peck & Stringer, 2005).

C. botulinum pertence ao género *Clostridium* e à família das Bacillaceae, é composto por bactérias anaeróbias em forma de bastonete, de reacção Gram-negativa, móvel com flagelos peritricos, que podem apresentar actividade proteolítica, sacarolítica, ambas ou nenhuma das duas, e que são esporulantes originando esporos de forma oval (Johnson, 2000; Peck & Stringer, 2005; McLauchlin *et al.*, 2006).

Actualmente designam-se por *Clostridium botulinum* todos os microrganismos capazes de produzir a neurotoxina botulínica, e agrupam-se nos tipos A, B, C, D, E, F e

G consoante as características antigénicas específicas das toxinas que produzem. Destes os mais relacionados com surtos de doença em seres humanos são os do tipo A, B, E e F, sendo este último muito pouco frequente (Notermans, 2000^b; Sobel *et al.*, 2004; McLauchlin *et al.*, 2006).

Algumas estirpes de *C. botulinum* podem apresentar características morfológicas e culturais muito idênticas mas produzirem toxinas distintas entre si; as estirpes do tipo A são todas proteolíticas independentemente da sua origem geográfica, mas algumas estirpes do tipo B isoladas na Europa não são proteolíticas à semelhança do que também se verificou com algumas estirpes isoladas na América do Norte (ICMSF, 1996; Notermans, 2000^b; McLauchlin *et al.*, 2006).

São as estirpes não proteolíticas, produtoras de neurotoxinas do tipo E e algumas do tipo B e F, que se desenvolvem a temperaturas baixas (3,3°C), não conferindo quaisquer sinais de alteração ao produto durante o seu desenvolvimento, constituindo uma importante preocupação nos produtos refrigerados de vida útil prolongada. Já as estirpes proteolíticas, são mesófilas e desenvolvem-se geralmente em situações de abuso de temperatura, estando na maioria dos casos associadas a situações de consumo de produtos processados em ambiente doméstico à base de vegetais, peixe e carne (Marth, 1998; Sobel *et al.*, 2004).

Desde há muito reconhecido como um grupo heterogéneo de microrganismos agrupados pelo facto comum de produzirem a neurotoxina botulínica, o *C. botulinum* pode dividir-se em 4 subgrupos de acordo com as suas características serológicas (I, II, III e IV). As técnicas recentes de biologia molecular confirmam que os quatro grupos fenotípicos correspondem aos mesmos grupos que resultam da homologia de ADN e antigénios somáticos, constituindo assim quatro genótipos distintos (ICMSF, 1996; Marth, 1998; McLauchlin *et al.*, 2006).

C. botulinum do tipo I e II são os mais importantes no que diz respeito à conservação dos alimentos. Os do tipo I têm crescimento óptimo entre 35 e 40°C e crescimento lento abaixo dos 15°C, não se desenvolvendo abaixo dos 10°C. Assim, pode controlar-se o seu desenvolvimento através de baixas temperaturas, e detectar mais facilmente a sua actividade pela produção de odores desagradáveis devido à proteólise que se verifica durante o seu desenvolvimento (ICMSF, 1996; Hyytiä-Trees *et al.*, 2000).

Já *C. botulinum* do tipo II tem crescimento óptimo entre os 28 e os 30°C e consegue produzir toxinas às temperaturas frequentemente usadas na distribuição e retalho de alimentos refrigerados, não sendo geralmente o seu desenvolvimento acompanhado por sinais evidentes de deterioração, permanecendo os alimentos com as suas características organolépticas inalteradas (ICMSF, 1996).

A toxina botulínica está entre as substâncias naturais mais tóxicas que se conhecem, estimando-se que a quantidade necessária de toxina do tipo A para matar um homem é de apenas 0,1 a 0,3 µg. O botulismo humano e animal resulta quase sempre da ingestão de toxinas pré-formadas nos alimentos, sendo raro o botulismo infantil e o botulismo associado a feridas (Mossel *et al.*, 1995; Sobel *et al.*, 2004; Peck & Stringer, 2005).

Actualmente estão identificadas 8 neurotoxinas distintas, verificando-se que algumas estirpes relativamente raras têm capacidade de produzir simultaneamente mais do que uma toxina. Também se conhece a ocorrência de neutralização cruzada entre toxinas dos tipos C com D e dos tipos E com F, e que algumas estirpes não produzem toxinas ou produzem-nas em muito pouca quantidade (ICMSF, 1996; Johnson, 2000; McLauchlin *et al.*, 2006).

O botulismo de origem alimentar ocorre após a ingestão da toxina previamente formada nos alimentos contaminados, ocorrendo os primeiros sintomas poucas horas a alguns dias após a sua ingestão. Os primeiros sintomas são a sensação de fraqueza, fadiga e vertigens a que se seguem a visão distorcida, dificuldades respiratórias e de deglutição devidas às implicações neurotóxicas. A morte ocorre geralmente por falha respiratória (Mossel *et al.*, 1995; Sobel *et al.*, 2004; Peck & Stringer, 2005).

A evolução destes sintomas é susceptível de ser contrariada pela administração pronta de compostos antitoxina e cuidados médicos que podem até passar pela respiração assistida; no botulismo do tipo E as náuseas e vômitos podem ocorrer desde muito cedo contribuindo este facto positivamente para a sua identificação (ICMSF, 1996; Sobel *et al.*, 2004).

Das estirpes não proteolíticas de *C. botulinum*, as do tipo E estão frequentemente associadas ao consumo de produtos, crus ou mal processados à base de peixe e mamíferos marinhos. Constituem um perigo endémico no Norte do Japão, Báltico e regiões costeiras do Norte do EUA, quer devido à frequente presença de esporos deste

tipo de *C. botulinum* em peixes e animais marinhos que posteriormente contaminam os alimentos, quer devido ao tradicional consumo local destes alimentos crus e fermentados (Johnson, 2000; Sobel *et al.*, 2004; Dalgaard, 2006).

Os esporos de *C. botulinum* do tipo E são relativamente sensíveis ao calor, não sobrevivendo em alimentos cozinhados. Porém, podem sobreviver e desenvolver-se a temperaturas baixas como as usadas em alimentos domesticamente ou comercialmente refrigerados. Algumas vezes podem, inclusivamente, desenvolver-se em situações aparentemente não anaeróbias (Gould, 1999; Hyytiä-Trees *et al.*, 2000; Peck *et al.*, 2008).

Por seu lado, o grau de toxicidade das toxinas produzidas por *C. botulinum* tipo E é susceptível de aumentar por efeito de algumas enzimas bacterianas e pela acção da tripsina a valores de pH entre os 5,5 e 6,5, facto que será responsável pela elevada mortalidade verificada nos surtos causados por este tipo de *C. botulinum* apesar da baixa letalidade verificada em ensaios com ratinhos de laboratório (Notermans, 2000; Peck & Stringer, 2005; Dalgaard, 2006).

O botulismo infantil é conhecido desde 1976. Afecta crianças com idades inferiores a 1 ano e resulta da ingestão de esporos de *C. botulinum* que posteriormente germinam e se desenvolvem produzindo toxinas no intestino, onde a microflora instalada ainda não é suficiente para contrariar esta ocorrência. O consumo de mel tem sido frequentemente reportado como possível causa desta doença, não sendo por isso aconselhada a sua administração a bebés de idade inferior a 1 ano (ICMSF, 1996; Küplülü *et al.*, 2006).

É frequentemente apontada uma baixa incidência de *C. botulinum* em carne, mas em amostras de maior dimensão a sua presença tem sido facilmente comprovada especialmente em carne de suíno. Apesar de *C. botulinum* se encontrar amplamente difundido no ambiente e nos produtos agrícolas não processados, o grau de contaminação é frequentemente baixo ou muito baixo, no entanto a possibilidade de sobrevivência dos esporos aos numerosos tipos de processamento existentes, aliado ao seu potencial desenvolvimento e produção de toxinas torna importante não descuidar este perigo (ICMSF, 1996; Fernández & Peck, 1999; Peck & Stringer, 2005).

As células vegetativas de *C. botulinum* são rapidamente destruídas a temperaturas de pasteurização e de preparação culinária dos alimentos, aumentando a

sua resistência ao calor, à semelhança do que se verifica com outras bactérias, nos alimentos mais secos e com maior teor em gordura, enquanto as toxinas são destruídas a temperaturas na ordem dos 75-80 °C (Mossel *et al.*, 1995; Johnson, 2000; Dalgaard, 2006).

A elevada resistência dos esporos das estirpes proteolíticas de *C. botulinum* do tipo I fomentou o desenvolvimento da esterilização comercial equivalente a 12D, para alimentos enlatados pouco ácidos. Em virtude dos esporos do tipo II terem maior sensibilidade ao processamento térmico, passou a ser frequente o recurso a processamentos equivalentes a 6D para o seu controlo, aumentando-se a sua eficiência com o ajuste do pH a valores inferiores ou iguais a 5 e ajuste do NaCl na fase aquosa a valores inferiores ou iguais a 4,5 %, pois é este o tipo de esporos que se encontra mais amplamente disseminado no ambiente e nos produtos alimentares. A produção de alimentos enlatados pouco ácidos é um exemplo de como é viável eliminar com segurança o *C. botulinum* (ICMSF, 1996; Peck & Stringer, 2005; Marks, 2006).

Continua porém por esclarecer, o reconhecimento da recuperação mediante a acção de enzimas líticas de esporos do tipo II após processamentos térmicos aparentemente letais (ICMSF, 1996).

O pH que se atinge nos produtos cárneos fermentados é suficiente para impedir o desenvolvimento de *C. botulinum*, estando bem definidas as temperaturas abaixo das quais os diferentes tipos de *C. botulinum* não se conseguem desenvolver, podendo o G I ser controlado por temperaturas de refrigeração mas não o G II que pode desenvolver-se a temperaturas de refrigeração e em condições de abuso de temperatura (ICMSF, 1996; Petäjä-Kanninen & Puolanne, 2007).

Por outro lado, todos os esporos de *C. botulinum* são tolerantes ao frio e capazes de sobreviver por tempo indeterminado em alimentos refrigerados e ou congelados. Nenhum processo envolvendo baixas temperaturas pode garantir uma redução do número de esporos, e mesmo a ocorrência de alguma quebra no número de células vegetativas é pouco consensual permanecendo de igual modo inalterada a actividade das toxinas (Van Laack *et al.*, 1996; Fernández & Peck, 1999; Peck *et al.* 2008).

Também se verifica, à semelhança do que acontece com todos os esporos, que os esporos de *C. botulinum* são relativamente resistentes às radiações ionizantes, e a sua resistência aumenta a temperaturas inferiores a -80°C, comparativamente com a

temperatura ambiente. Esta sua resistência não é afectada por um prévio processamento térmico, mas a ocorrência de um processo de irradiação preliminar diminui a sua posterior resistência térmica (Ingram & Roberts, 1980; ICMSF, 1996).

Tal como todas as toxinas de origem proteica as de *C. botulinum* não são afectadas pela radiação ionizante dentro da gama em que esta é usada em alimentos (Ingram & Roberts, 1980).

O crescimento de *C. botulinum* diminui com o a_w e cessa a valores utilizados na conservação de alimentos, especialmente quando aplicada de forma conjugada com o pH e baixas temperaturas. Porém, existem diferenças entre estirpes dos mesmos tipos serológicos - geralmente as estirpe do tipo I não se conseguem desenvolver a a_w inferior a 0,935 e as do tipo II em a_w inferior 0,970 (ACMSF,1993; Beales & Smith, 2004; Peck & Stringer, 2005; Webb *et al.*, 2007).

Independentemente do tipo, todas as estirpes de *C. botulinum* em condições óptimas de crescimento, desenvolvem-se e produzem toxinas até valores de pH de 5,2, mas as do tipo II não suportam valores de pH inferiores a 5,0 enquanto as do tipo I crescem lentamente a valores de pH 4,6. Este valor está desde há muito definido para alimentos ácidos ou acidificados como o limite abaixo do qual não ocorre o desenvolvimento deste microrganismo (ICMSF, 1996; Dalgaard, 2006).

O recurso aos sais de cura tem sido um processo bem sucedido no controlo de *C. botulinum* em produtos cárneos curados, daí que quando foi proposta a redução da utilização do nitrito de sódio, muita investigação foi feita de forma a melhor perceber a forma como este aditivo contraria o desenvolvimento e impede a formação da toxina botulínica (Pivnic, 1980; Weeb *et al.*, 2007; Petäjã-Kanninen & Puolanne, 2007).

As preocupações resultantes do facto dos nitritos promoverem a formação de compostos nitrosados nas carnes curadas, levou a que se investigassem as potencialidades de outros aditivos como o sorbato, sulfitos, alguns polifosfatos, parabenos, antioxidantes, nisina e lactato de sódio, potencialmente úteis em utilização conjunta. Contudo, ainda não se conseguiu um efeito simultâneo na cor, aroma, sabor e controlo microbiano idêntico ao dos nitritos (Tompkin *et al.*, 1980; Peck & Stringer, 2005; Petäjã-Kanninen & Puolanne, 2007).

Os esporos de *C. botulinum* são inactivados pela exposição ao ozono e dióxido de cloro. Os desinfectantes vulgarmente usados na indústria alimentar, como o peróxido

de hidrogénio, soluções de cloro e de iodo são eficazes na sua destruição, sendo o efeito do cloro mais marcado a pH 3,5 comparativamente com valores neutros ou alcalinos de pH (ICMSF, 1996).

Algumas misturas de gases aplicadas na embalagem em atmosfera modificada, são considerados susceptíveis de controlar com êxito o desenvolvimento deste microrganismo (ACMSF,1993; ICMSF, 1996).

C. botulinum também sofre os efeitos da competição com outros microrganismos que afectam o seu desenvolvimento e a produção de toxina, mas falta ainda conhecer com exactidão o modo como este fenómeno se processa. Este microrganismo responde em geral a alterações no pH e a_w , parâmetros que podem ser alterados em virtude do desenvolvimento de outros microrganismos, mas também é inibido pela presença de bacteriocinas produzidas por algumas BAL (ICMSF, 1996; Beales & Smith, 2004; Vignolo & Fadda, 2007).

Em muitos alimentos *C. botulinum* é inibido pela combinação de factores que actuam em simultâneo, tendo sido reconhecidos além do nitrito a acção de outros importantes factores como o processamento térmico, pH, temperatura, teor em sal, o recurso ao ascorbato e isoascorbato, a disponibilidade de ferro e a utilização de alguns fosfatos e polifosfatos (ACMSF, 1993; Beales & Smith, 2004; ICMSF, 1996).

A incidência de botulismo resultante do consumo de produtos conservados pelo frio é extremamente baixa. No entanto, alguns relatos têm revelado a possibilidade de potenciais perigos associados a *C. botulinum* em produtos refrigerados de vida útil alargada, devendo pois sempre que possível promover-se o desenvolvimento de produtos estáveis sem refrigeração (Marth, 1998; Hyytiä-Trees *et al.*, 2000; Peck & Stringer, 2005; Peck *et al.*, 2008).

2.1.2.4.2 - *Clostridium perfringens*

Os primeiros relatos de surtos de toxinfecções alimentares atribuídas a *Clostridium perfringens* datam de 1943, altura a partir da qual se verificou o aumento dos surtos atribuídos a este microrganismo. Porém, já em 1895 Klein tinha relacionado

a presença de *C. perfringens* com a ocorrência de diarreia, suspeitando na altura de um pudim de arroz (ICMSF, 1996; Blaschek, 2000^b).

Em 1897, Dunham apontou pela primeira vez a resistência dos esporos de *C. perfringen* ao calor. Já em 1915, Simmonds associou a sua esporulação no conteúdo intestinal à ocorrência de distúrbios; desde então, o número de surtos de doença relacionada com *C. perfringens* não parou de aumentar (ICMSF, 1996; Petit *et al.*, 2000).

Apesar de ser frequentemente isolado a partir das fezes de Homem, fezes de animais e de alimentos, o facto do *C. perfringens* se encontrar amplamente espalhado pelo ambiente, no solo, pó, insectos e vegetação, contribuiu em muito para que lhe fosse atribuída importância como agente patogénico responsável pela ocorrência de toxinfecções alimentares (Lund, 1990; Huang, 2003; Soares, 2003).

Trata-se de uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia, classificada como um bacilo do Grupo III da família Bacillaceae, género *Clostridium*, proteolítico, sem mobilidade e com capacidade de formar esporos dificilmente observados em meios de cultura, mas cuja formação ocorre abundantemente no intestino (Mossel *et al.*, 1995; McClane, 1996; Blaschek, 2000^a).

As diferentes biovariedades de *C. perfringens* podem agrupar-se em 5 grupos distintos (A, B, C, D, E) de acordo com as exotoxinas que produzem. Os tipos A, C e D são patogénicos para o Homem. As enterotoxinas produzidas pelos tipos A e C são distintas das restantes exotoxinas, responsáveis por diarreias agudas características das toxinfecções causadas por este microrganismo, mas só as produzidas pelo tipo A são responsáveis pelo desenvolvimento da gangrena gasosa (Lund, 1990; Hubbert *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 2000).

As enterotoxinas produzidas por *C. perfringens* dos tipos A e C, são abundantemente produzidas quase exclusivamente no intestino, estando associadas à formação de esporos. Porém, pode ocorrer produção destas toxinas em alguns tipos de alimentos, facto que contribui para que após a sua ingestão se manifestem mais rapidamente os sintomas da toxinfecção causada por este microrganismo (Lund, 1990; Petit *et al.*, 2000).

Estas enterotoxinas são proteínas com um ponto isoeléctrico de 4,3 e compostas por 19 aminoácidos onde predominam o ácido aspártico, serina, leucina e o ácido

glutâmico. São termolábeis, desactivadas pelo calor a 60°C com um valor de D₉₀ de aproximadamente 4 minutos; também são susceptíveis de inactivação por acção de algumas enzimas produzidas por *Bacillus subtilis* mas não pelas enzimas que naturalmente ocorrem no aparelho digestivo (McClane, 1996; Petit *et al.*, 2000).

O modo de acção das enterotoxinas produzidas por *C. perfringens* é único entre as restantes enterotoxinas e envolve uma série de ocorrências antes de se ligar aos sítios específicos nas paredes do tracto intestinal, onde têm capacidade de inibir o transporte de glicose e provocar a perda de proteínas, alterando a permeabilidade da membrana celular e provocando a perda de fluídos (Lund, 1990; McClane, 1996; ICMSF, 1996).

Os alimentos geralmente relacionados com a ocorrência de surtos desta doença são os produtos cárneos não curados, já cozinhados, que após o processamento térmico são arrefecidos lentamente, conservados de forma inadequada e posteriormente consumidos sem uma eficiente regeneração. Os esporos podem então sobreviver no interior do alimento em zonas onde se verifica anaerobiose, germinando posteriormente aquando do reaquecimento, proliferando depois as formas vegetativas então geradas nos seus nichos anaeróbios de onde o oxigénio foi removido por acção do calor (Hubbert *et al.*, 1996; Blaschek, 2000^b; Huang, 2003).

A sensibilidade ao oxigénio é variável entre os diferentes tipos de *Clostridium* sendo *C. perfringens* a menos fastidiosa de todas as espécies, capaz de crescer em condições não estritamente anaeróbias e sendo apenas inibida a valores de potencial redox superiores a +300 mV. Os esporos também variam relativamente à sua resistência ao calor, o que influencia a sua capacidade de sobrevivência e desenvolvimento após a preparação culinária dos alimentos, sendo mais resistentes os que vão posteriormente desenvolver-se nos alimentos deficientemente conservados (ICMSF, 1996; Blaschek, 2000^a).

O *C. perfringens* ocorre na carne crua de todas as espécies em relativamente pequena quantidade, sendo comum a sua presença na superfície de carcaças recentemente abatidas. Em animais fatigados algumas células vegetativas podem mesmo ser isoladas imediatamente após o abate em partes profundas do músculo, número que aumenta noutros órgãos como por exemplo no fígado. No entanto, a contaminação de carcaças ocorre principalmente por contaminação fecal desde o intestino e pele, podendo

diminuir-se os níveis de contaminação evitando o contacto com as superfícies e mediante uma cuidadosa esfolagem e evisceração (ICMSF, 1996; Van Laack *et al.*, 1996).

Muitos outros alimentos podem conter *C. perfringens*, incluindo, aves, peixes, vegetais, produtos lácteos, alimentos desidratados e todos os alimentos que possam ter contactado com materiais susceptíveis de conter esporos. Deve dar-se especial atenção aos alimentos cozinhados cujos ingredientes podem conter esporos capazes de sobreviver ao processamento térmico, já que é necessária a ingestão de grandes quantidades de células vegetativas para que estas sobrevivam ao ácido do estômago, atingindo o intestino e aí iniciem o processo conducente a doença (Mossel *et al.*, 1995; Nicholas, 1995; Blaschek, 2000^b).

Os surtos causados por *C. perfringens* não apresentam qualquer carácter sazonal ocorrendo indiferentemente ao longo de todo o ano. São mais frequentes os surtos relacionados com refeições servidas a grandes grupos, geralmente devido a deficiências na conservação de grandes quantidades de comida que foi arrefecida lentamente e não refrigerada entretanto. Geralmente refeições à base de carne como peru recheado, rolos de carne, empadas e outros pratos em que os esporos à superfície são recolocados no interior do alimento em condições de anaerobiose propícias ao seu desenvolvimento (ICMSF, 1996; Blaschek, 2000^b; Huang, 2003).

A mais importante característica de *C. perfringens* associada ao seu desenvolvimento em carnes cozinhadas é o invulgarmente rápido tempo de geração, que pode ser inferior a 10 minutos a 43 – 47°C. Assim, grandes peças de carne, rolos de carne e carnes picadas são produtos em que os esporos podem existir naturalmente e em que após insuficiente processamento térmico podem desenvolver-se durante as fases de arrefecimento e armazenamento (Nicholas, 1995; Blaschek, 2000^b; Huang, 2003).

Pouco resistentes às temperaturas de congelação, as formas vegetativas de *C. perfringens* são também rapidamente destruídas por acção do calor. Contrariamente, a completa destruição dos esporos só é conseguida mediante a aplicação de severos processamentos térmicos (Lund, 1990; Van Laack *et al.*, 1996; Soares, 2003).

É conhecida, mas pouco compreendida a existência de diferentes graus de resistência ao calor entre as diferentes biovariedades deste microrganismo, e chegou-se mesmo a julgar que apenas as estirpes capazes de resistir a temperaturas superiores a

100°C seriam patogênicas, mas tal não se verifica já que existem relatos de surtos causados por estirpes menos termo-resistentes (ICMSF, 1996; Blaschek, 2000^b).

Dependendo do substrato, a inativação térmica das enterotoxinas ocorre a temperaturas compreendidas entre os 59 e 65°C em intervalos de tempo que variam de 1,5 a 149,4 minutos, não deixando no entanto de continuar a exibir actividade serológica (ICMSF, 1996; McClane, 1996; Huang, 2003).

As condições existentes em muitos alimentos não são favoráveis ao desenvolvimento dos esporos de *C. perfringens* nem à produção de toxinas pelas células vegetativas quando estas estão presentes, como acontece no caso dos produtos cárneos curados, em que não existe história de surtos de diarreia associados a este microrganismo devido à sua sensibilidade ao cloreto de sódio e nitritos (Pivnic, 1980; ICMSF, 1996; Novak & Juneja, 2002).

A resistência dos esporos das diferentes estirpes de *C. perfringens* ao efeito da irradiação γ varia, não se verificando qualquer vantagem em termos de taxa de inativação dos esporos na aplicação dum processamento térmico anterior à irradiação do produto, enquanto ao contrário torna os esporos mais sensíveis a um posterior processamento térmico (Ingram & Roberts, 1980; ICMSF, 1996; Novak & Juneja, 2002).

A manutenção dos alimentos a temperaturas acima de 55°C ou abaixo de 15°C impede a multiplicação do *C. perfringens*, e após o processamento térmico o arrefecimento deve ser tão rápido quanto possível, estando regulamentado nos EUA que os alimentos não podem permanecer mais de 1,5 horas a temperaturas compreendidas entre os 54,4°C e os 26,7°C e mais de 5 horas entre os 26,7°C e os 4,4°C. De igual forma se se tratar de uma peça inteira de carne, esta deve iniciar o processo de arrefecimento nos primeiros 90 minutos após o final do processamento térmico, devendo a temperatura baixar dos 48°C para os 12,7°C em menos de 6 horas, e o arrefecimento continuar até aos 4,4°C para poder então ser embalado para expedição (ICMSF, 1996; Novak & Juneja, 2002).

2.1.2.4.3 - *Escherichia coli*

Foi Escherich quem há mais de um século isolou pela primeira vez, a partir de fezes de uma criança, a bactéria que designou por *Bacterium coli*. Mais tarde esta bactéria passou a ser designada por *Escherichia coli*, ao mesmo tempo que aumentavam as evidências de que ocasionalmente era responsável por gastroenterites algumas vezes mortais em crianças, tendo a partir de meados dos anos quarenta do século XX passado a reconhecer-se a importância deste microrganismo e a estabelecerem-se medidas para o seu controlo nos países mais desenvolvidos (ICMSF, 1996; Batt, 2000^d; Oteiza *et al.*, 2003).

Pertencente à família das Enterobacteriaceae, *E. coli* caracteriza-se por ser um microrganismo Gram-negativo, catalase positivo, oxidase negativo, anaeróbio facultativo, em forma de bastonete curto, geralmente móvel por acção de flagelos peritricos, podendo apresentar fimbrias e outras estruturas relacionadas que influenciam a sua patogenia, sendo a maioria das estirpes de fácil cultivo nos meios usuais em laboratório (Pandey *et al.*, 2000; Batt, 2000^d; Soares, 2003).

Trata-se de um bactéria que integra a microflora do tracto intestinal do Homem e da maioria das espécies de sangue quente, em que algumas estirpes podem causar doença, constando dos alimentos cujo consumo está geralmente associado a problemas com *E. coli* patogénicas, a carne, vegetais, cidra de maçã, leite cru, queijos de pasta mole e a água (Batt, 2000^d; Marth, 1998; Soares, 2003).

As estirpes patogénicas de *E. coli* que são responsáveis por síndromas diarreicos no Homem e em animais, estão divididas em seis grupos distintos de acordo com o mecanismo através do qual provocam a doença: as enteropatogénicas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EaggEC) e as difusamente aderentes (DAEC), dando-se maior importância às quatro primeiras (ICMSF, 1996; Hau-Yang, 2000; Batt, 2000^d).

Os sintomas de doença relacionada com este microrganismo dependem do tipo de *E. coli* presente. Se EPEC o tempo de incubação varia entre 17 e 72 horas causando diarreia aquosa com proeminente quantidade de mucosidades mas não ensanguentada, náuseas, dores abdominais, vómitos, dores de cabeça, febre e arrepios de frio que duram até 3 dias (Mossel & Garcia, 1985; ICMSF, 1996).

Já a doença causada por *E. coli* do tipo ETEC, demora entre 8 e 44 horas a manifestar-se, dura em média 3 a 19 dias e causa diarreia aquosa, febres baixas, espasmos abdominais, mal-estar e náuseas, assemelhando-se nos casos graves a cólera, podendo levar à desidratação do paciente (Mossel & Garcia, 1985; ICMSF, 1996; Hau-Yang, 2000).

As *E. coli* do tipo EIEC demoram entre 8 a 24 horas a manifestar-se, e os sintomas podem durar de alguns dias a várias semanas. Provocam disenteria, arrepios de frio, febre, dores de cabeça, mialgias, espasmos abdominais e as fezes contêm mucosidades e laivos de sangue (Mossel & Garcia, 1985; ICMSF, 1996).

Maior período de tempo demoram as *E. coli* do tipo EHEC a manifestar-se, geralmente só 3 a 9 dias após o contágio, prolongando-se os sintomas por 2 a 9 dias e caracterizando-se por colite hemorrágica, diarreia muito ensanguentada, dores abdominais fortes, vômitos, algumas vezes febre, síndrome urémico hemolítico, nefrite aguda, coma e morte (Mossel & Garcia, 1985; ICMSF, 1996).

A *E. coli* O157:H7 foi identificada pela primeira vez como agente patogénico responsável por surtos de colites hemorrágicas no ano de 1982, tendo posteriormente sido relatados numerosos surtos de doença normalmente associados ao consumo de carne picada de bovino. O mecanismo através do qual o microrganismo provoca a doença tem sido alvo de muita investigação, sendo sugerido que coloniza o intestino grosso onde produz as verotoxinas VT1 e VT2 (Mead & Griffin, 1998; Oteiza *et al.*, 2003, 2006; Santos *et al.*, 2008).

É presentemente difícil reconhecer a extensão em que os diferentes tipos de *E. coli* são responsáveis pelos surtos de doença ocorridos um pouco por todo o mundo, pois são poucas vezes apontados como agentes causais desses surtos, em parte devido à dificuldade que existe em isolar e enumerar a sua presença (ICMSF, 1996; Batt, 2000^d).

O consumo de certos alimentos como vegetais crus e água em países em desenvolvimento, é frequentemente apontado como causa da ocorrência de surtos causados por ETEC. Porém, em países desenvolvidos é pouco frequente a associação de surtos com a presença de ETEC, EIEC e EPEC, contrariamente ao que acontece com a *E. coli* O157:H7, frequentemente apontada como responsável por surtos de doença associados ao consumo de carne picada mal cozinhada e ao consumo de leite não pasteurizado (Mead & Griffin, 1998; Santos *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2008).

Embora não sejam consideradas verdadeiramente psicrófilas, as estirpes patogênicas de *E. coli* conseguem crescer a temperaturas tão baixas como os 7°C e tão altas como os 46°C, com o ótimo entre os 35 e os 40°C. Porém, o crescimento de *E. coli* O157:H7 é mais limitado e só ocorre entre os 8°C e os 45°C com ótimo nos 37°C, sobrevivendo bem em alimentos conservados em refrigeração e também a temperaturas de congelamento, tendo alguns trabalhos revelado a diminuição do seu número em carne picada armazenada ao longo de 9 meses a -20°C (ICMSF, 1996; Marth, 1998; Oteiza *et al.*, 2003).

A inativação de *E. coli* O157:H7 ocorre mediante o processamento térmico dos alimentos, e sendo mais sensível do que a *Salmonella* spp. um processamento térmico suficiente para eliminar este microrganismo será também suficiente para garantir a ausência de *E. coli* O157:H7. Igual comportamento se verifica com a irradiação γ à qual *E. coli* revela completa ausência de resistência, bastando aplicar tratamentos idênticos aos aplicados para eliminar a *Salmonella* spp. (ICMSF, 1996; Tortorello, 2000; Oteiza *et al.*, 2006).

Algumas estirpes de *E. coli* são ácido tolerantes, um fenômeno induzido e complexo que depende da fase de crescimento, persistindo a tolerância a meios ácidos ao longo de largos períodos de conservação pelo frio; o efeito do pH no crescimento depende do tipo de ácido presente, por exemplo *E. coli* O157:H7 consegue desenvolver-se num meio de pH 4,5 ajustado com ácido clorídrico mas não com ácido láctico. Porém, não se desenvolvem em queijos de pH inferior a 5,4 (ICMSF, 1996; Marth, 1998; Tortorello, 2000; Ibrahim *et al.*, 2008).

Por fim, a *E. coli* não apresenta qualquer resistência ao cloro sendo inativada por tratamentos iguais aos aplicados para a inativação da *Salmonella* spp., mas pode desenvolver-se em 6% de NaCl e, no caso da *E. coli* O157:H7 pode, apesar de lentamente, crescer em 6,5% mas não em 8,5% de NaCl, mostrando-se *E. coli* mais tolerante ao cloreto e ao nitrito de sódio do que a *Salmonella* spp. (ICMSF, 1996; Tortorello, 2000).

2.1.2.4.4 - *Staphylococcus aureus*

As primeiras menções a *Staphylococcus* spp. foram elaboradas pelo médico escocês Sir Alexander Ogston, numa série de publicações feitas entre 1879 e 1882, em que descreveu a presença destes microrganismos em pus retirado de abscessos em seres humanos, e a sua posterior capacidade de causar doença piogénica quando injectados em ratos. Dois anos depois, Rosenbach estudou e descreveu a cultura pura, tendo denominado a bactéria por *Staphylococcus aureus* (ICMSF, 1996; Tatini & Bennett, 2000).

Embora a primeira associação de *S. aureus* com a ocorrência de toxinfecção alimentar tenha provavelmente sido feita por Voughan e Sternberg em 1884, quando descreveram um grande surto de doença no Michigan associado ao consumo de queijo, só em 1930 Barber esclareceu o modo de acção e a importância desta bactéria, tendo demonstrado tratar-se de um importante e amplamente disperso microrganismo patogénico de origem alimentar (Mossel & Garcia, 1985; Tatini & Bennett, 2000; Reinoso *et al.*, 2008).

S. aureus é uma bactéria do tipo cocos, Gram-positiva, catalase-positiva, que se agrupa em formas irregulares e tridimensionais de células semelhantes a cachos de uvas (estafilococos), e apresenta um metabolismo anaeróbio facultativo conseguindo por isso desenvolver-se em ambiente redutor ou oxidativo (Mossel *et al.*, 1995; Harvey & Gilmour, 2000; Wirtanen & Salo, 2005).

Pode, então, crescer em condições de anaerobiose ou em condições de aerobiose, porém, o seu crescimento é mais lento em condições de anaerobiose, apesar de a sua sobrevivência ser majorada nestas condições comparativamente ao verificado para as condições de aerobiose (Hubbert *et al.*, 1996; Harvey & Gilmour, 2000; Luppens *et al.*, 2002).

Os sintomas da intoxicação provocada pela enterotoxina do *S. aureus* manifestam-se 1 a 7 horas após a ingestão dos alimentos contaminados, consistindo geralmente em náuseas, vômitos, espasmos abdominais e diarreia, em casos graves podem ocorrer dores de cabeça e colapso, porém, a recuperação é rápida dando-se geralmente em 2 dias (Hubbert *et al.*, 1996; Harvey & Gilmour, 2000).

Para além das enterotoxinas responsáveis por intoxicações alimentares, *S. aureus* produz uma ampla variedade de outras substâncias, exotoxinas e agressinas, associadas à sua capacidade infectante e à doença causada (Mossel *et al.*, 1995; Martin & Landolo, 2000; Reinoso *et al.*, 2008).

As enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. são proteínas de cadeia simples com baixo peso molecular, consistindo numa cadeia polipeptídica com quantidades relativamente elevadas de lisina, tirosina, ácidos glutâmico e aspártico, podendo ser produzidas de duas formas distintas, ou como metabolitos secundários no final da fase estacionária de crescimento ou durante a fase de crescimento exponencial. Estas diferenças reflectem-se nos tipos de toxinas que se formam nos alimentos, verificando-se que a maioria dos surtos envolve mais as toxinas do tipo A e D do que as toxinas do tipo B e C, e ocorrem em variados tipos de alimentos detentores de uma larga amplitude de valores de pH, a_w e Eh (ICMSF, 1996; Bergdoll, 2000; Martin & Landolo, 2000).

Os biótipos humanos de *S. aureus* produzem mais frequentemente enterotoxinas do que os provenientes de aves ou outros animais, sendo a quantidade necessária para desencadear os sintomas de doença dependente do peso e da sensibilidade do indivíduo, sendo aceite que 0,1 a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de enterotoxina são suficientes para causar doença em seres humanos e que a tolerância à sua presença aumenta com o número de vezes que os indivíduos são expostos à sua acção (Mossel *et al.*, 1995; Bergdoll, 2000).

S. aureus é um microrganismo ubíquo que pode ser isolado a partir do pó, em sistemas de ventilação, mas ocorre principalmente na maioria das mucosas e na pele dos animais de sangue quente, é um agente patogénico oportunista comportando-se geralmente como comensal, podendo provocar infecções em feridas abertas ou em indivíduos com alterações fisiológicas, como por exemplo alterações hormonais (Hubbert *et al.*, 1996; Tatini & Bennett, 2000).

Estima-se que 50% dos seres humanos são portadores deste microrganismo, geralmente nas fossas nasais e na zona perineal, mas pode também ocorrer noutras superfícies como em zonas da pele muito danificadas ou que se encontram frequentemente húmidas (Mossel *et al.*, 1995; Hubbert *et al.*, 1996; Harvey & Gilmour, 2000).

S. aureus é também resistente à ausência de humidade podendo instalar-se em equipamentos usados no processamento de alimentos, em especial em zonas de difícil

acesso. Algumas estirpes são resistentes à acção do cloro, mas na maioria das vezes é rapidamente eliminado pela aplicação da maioria dos desinfectantes geralmente empregues na desinfeção de instalações e equipamentos de unidades fabris (ICMSF, 1996; Luppens *et al.*, 2002; Wirtanen & Salo, 2005).

A capacidade de *S. aureus* competir com os restantes microrganismos é diminuta, sendo por isso pouco frequente o seu desenvolvimento e a consequente produção de toxinas em alimentos crus, excepto no caso do leite proveniente de animais mastíticos em que o número de *S. aureus* é extremamente elevado (Hubbert *et al.*, 1996; Reinoso *et al.*, 2008).

O efeito da presença de outros microrganismos no desenvolvimento de *S. aureus* é extremamente complexo, sendo difícil distinguir entre os efeitos da produção de alguns metabolitos e a diminuição só por si do pH, a depleção de nutrientes ou a produção de factores anti-estfilocócicos. A eficiência dos microrganismos competidores no controlo do crescimento e produção de enterotoxinas, depende da proporção e tipo de populações presentes, da temperatura de armazenamento e do tipo de substrato (Hubbert *et al.*, 1996; Harvey & Gilmour, 2000; Vignolo & Fadda, 2007).

O processamento térmico dos alimentos é geralmente suficiente para eliminar a presença de *S. aureus* mas não é eficiente na destruição das toxinas entretanto formadas, que podem inclusivamente resistir a tratamentos de esterilização em alimentos pouco ácidos (Mossel *et al.*, 1995; Martin & Landolo, 2000)

Na maioria dos casos a presença de *S. aureus* fica a dever-se à contaminação após o processamento térmico por manipuladores portadores do microrganismo, ocorrendo a produção de enterotoxinas especialmente a temperaturas entre os 20 e os 40°C, por exemplo em recheios de bolos, carnes cozinhadas, mariscos e outros alimentos prontos a consumir (ICMSF, 1996; Tatini & Bennett, 2000; Luppens *et al.*, 2002).

Também podem ocorrer surtos de intoxicação devidos ao consumo de queijos e de produtos de salsicharia fermentados, pois se esta operação não decorre convenientemente vai permitir a presença de *S. aureus* e a consequente produção de toxinas no decorrer da maturação, já que a resistência destas bactérias lhes permite desenvolverem-se em alimentos com baixo a_w (ICMSF, 1996; Bergdoll, 2000).

S. aureus é uma bactéria tolerante ao sal e consegue, quando as restantes condições são óptimas, crescer a valores de a_w , tão baixos como 0,850. Porém, geralmente o seu crescimento é inibido a valores superiores, sendo a produção de enterotoxinas mais restrita quando se verificam baixos valores de a_w predominando a produção de enterotoxina A (Mossel *et al.*, 1995; ICMSF, 1996; Harvey & Gilmour, 2000).

Em condições óptimas, *S. aureus* consegue crescer a valores de pH inferiores a 4,5 quando o agente acidulante é um ácido inorgânico, porém este valor aumenta consideravelmente quando se trata de ácidos orgânicos (Doores, 1993; Statford, 2000).

Os efeitos das interações entre factores extrínsecos e intrínsecos no crescimento e sobrevivência de *S. aureus* são variados, verificando-se que em anaerobiose e a baixos valores de pH e a_w o seu crescimento é limitado a temperaturas sub-óptimas e promovido a um ritmo lento com produção de enterotoxinas a temperaturas óptimas, sendo ainda influenciadas as interações entre estes factores por parâmetros como a resistência ao calor (Mossel *et al.*, 1995; ICMSF, 1996).

As temperaturas limites para que ocorra crescimento de *S. aureus* são 7 e 48°C, sendo o óptimo conseguido a temperaturas compreendidas entre os 35 e os 40°C. A 10°C a fase lag pode superar as 20 horas e o crescimento inicia-se muito lentamente; já a temperaturas mais baixas o crescimento é limitado por pequenas diminuições no pH e no a_w , sendo este efeito mais pronunciado em condições de anaerobiose (Mossel *et al.*, 1995; ICMSF, 1996).

A resistência de *S. aureus* ao efeito das altas temperaturas depende das condições em que o microrganismo se desenvolveu inicialmente, sendo maior em microrganismos desenvolvidos a temperaturas superiores a 37°C do que em microrganismos que cresceram a temperaturas inferiores a 20°C; a sua resistência ao calor também aumenta em produtos secos e com elevado teor de gordura. Porém, *S. aureus* é instantaneamente morto a temperaturas de pasteurização e de confecção dos alimentos, muito embora as enterotoxinas sejam resistentes às elevadas temperaturas, podendo persistir com actividade tóxica mesmo quando já não detêm actividade serológica (Mossel *et al.*, 1995; Bergdoll, 2000).

S. aureus é muito resistente à congelação e à descongelação, sobrevivendo bem em alimentos conservados a temperaturas inferiores a -20°C. Porém, a temperaturas

superiores, entre -10 e 0°C, a sua viabilidade diminui acentuadamente, não sendo a estabilidade das toxinas afectada pelo armazenamento no frio (Mossel *et al.*, 1995; ICMSF, 1996;).

Já a irradiação ionizante ou não ionizante eliminam de imediato *S. aureus*, evidenciando-se uma maior resistência a esta acção em alimentos comparativamente com o verificado em meios de cultura, porém, as suas enterotoxinas são extremamente resistente aos efeitos da irradiação γ não sendo destruídas nas doses geralmente empregues no processamento dos alimentos (Ingram & Roberts, 1980; ICMSF, 1996).

2.1.2.4.5 - *Salmonella* spp.

Budd em 1874 foi o primeiro a inferir que a febre tifóide era transmitida pelo consumo de água e de alimentos. Mais tarde, em 1880 Eberth apontou *Salmonella* Typhi como o agente etiológico da doença que foi posteriormente isolado por Graffky em 1884, tendo o nome do género sido atribuído por Lignières em 1900 em homenagem aos trabalhos de Dr. Salmon, desde então o género *Salmonella* spp. (ICMSF, 1996; Cox, 2000^a; Almeida, 2008).

Existem milhares de serótipos de *Salmonella* spp., quase todos com capacidade de provocar doença nos seres humanos, sendo actualmente reconhecida como principal causa de febres entéricas e gastroenterites provocadas por alimentos em todo o mundo (Young, 1991; Bezirtzoglou *et al.*, 2000; Thong *et al.*, 2002; Almeida, 2008).

O género *Salmonella* spp. pertence à família das Enterobacteriaceae, que se caracteriza por ser constituída por bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, sem capacidade de esporulação, em forma de bastonete, cujas formas móveis estão providas de flagelos peritricos, capazes de degradar a glicose e de reduzir nitratos a nitritos, geralmente catalase positivas e oxidase negativas, que existem normalmente no tracto intestinal do Homem e de animais como microrganismos comensais ou patogénicos (ICMSF, 1996; Cox, 2000^a; Almeida, 2008).

As bactérias do género *Salmonella* spp. são geralmente bastonetes móveis, excepção feita aos serótipos *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, sendo algumas das suas

característica utilizadas em processos de isolamento selectivo deste microrganismo. Porém, apesar da grande diversidade de marcadores fenotípicos e genotípicos, a serotipificação continua a ser a forma mais utilizada para discriminar os isolados de *Salmonella* spp. (ICMSF, 1996; Soares, 2003; Esteves, 2005).

É sugerido que o género *Salmonella* spp. corresponde a uma só espécie, que de acordo com o código internacional de nomenclatura bacteriana deveria denominar-se por *Salmonella enterica*, por exemplo, *Salmonella typhimurium* deveria denominar-se *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium, ou de maneira abreviada *Salmonella* Typhimurium (Soares, 2003).

Mas também é reconhecida a possibilidade de existirem duas espécies (Cox, 2000^a; Esteves, 2005), *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, e seis subespécies classificadas de acordo com a homologia de ADN e os hospedeiros, *Salmonella enterica*: I (*enterica*); II (*salamae*); IIIa (*arizonae*); IIIb (*diarizona*); IV (*houtonae*) e V (*indica*).

Estão já actualmente identificados cerca de 2300 serótipos de *Salmonella* spp., mas, de acordo com o número de combinações possíveis entre os factores tidos em consideração na serotipificação, existe a possibilidade de ser 20.000 o número potencial de serótipos de acordo com o esquema de Kauffmann-White (ICMSF, 1996; Almeida, 2008).

O género *Salmonella* spp. pode causar diferentes síndromas clínicos que vão de ligeiras gastroenterites a complicadas doenças sistémicas como a febre tifóide, dependendo a evolução da doença do serótipo envolvido, se está ou não adaptado ao hospedeiro, da sua virulência e das defesas do hospedeiro, factores que influenciam a capacidade invasiva do microrganismo, como acontece nos humanos com a *S. Typhi* e a *S. Paratyphi* A e B (Mossel & Garcia, 1985; Cox, 2000^b; Bezirtzoglou *et al*, 2000).

Os sintomas da salmonelose do tipo não tifóide, gastroenterites na maioria das vezes causadas pelos serótipos *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Virchow*, vão de náuseas e dores abdominais a febre, dores de cabeça, mal-estar geral, diarreia forte e algumas vezes vômito, sintomas que ocorrem geralmente 12-36 horas após a ingestão do alimento contaminado, e normalmente se resolvem em 2-3 dias, ainda que por vezes pode durar semanas, podendo o indivíduo tornar-se portador são do microrganismo (Mossel & Garcia, 1985; Hubbert *et al.*, 1996; Bezirtzoglou *et al*, 2000; Soares, 2003).

Em indivíduos susceptíveis, algumas biovariedades não adaptadas ao ser humano podem adoptar carácter invasivo podendo desencadear processos mais complicados de febre entérica, septicemia e infecções localizadas, como por exemplo acontece com *S. Belgdam*, *S. Bredeney*, *S. Cholerae-suis*, *S. Dublin*, *S. Panama*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Virchow* (Cox, 2000^a; Bezirtzoglou *et al*, 2000).

A salmonelose é uma infecção zoonótica com disseminação global, pois a maioria dos contágios em seres humanos é proveniente de animais infectados, sendo os roedores, insectos, animais domésticos e o próprio Homem os principais reservatórios de bactérias do género *Salmonella* spp.. A transmissão ocorre pela via fecal-oral quase sempre através de água ou alimentos contaminados (Bezirtzoglou *et al*, 2000; Soares, 2003; Almeida, 2008).

Além dos reservatórios animais *Salmonella* spp. pode ainda estabelecer-se e multiplicar-se no ambiente sempre que se verificarem condições que lhes são favoráveis, à semelhança do que pode acontecer com os vários equipamentos utilizados pela indústria no processamento de alimentos (ICMSF, 1996; Vieira-Pinto, 2008).

Embora exista uma larga variedade de alimentos frequentemente relacionados com a salmonelose, a maioria das vezes esta resulta do consumo de carne, produtos cárneos, aves, ovos, leite e produtos lácteos, mas também se tem verificado um aumento de surtos relacionados com o consumo de frutos e vegetais frescos muitas vezes contaminados pelo ambiente e água de rega (Young, 1991, Thong *et al.*, 2002; Almeida, 2008).

Para os alimentos refrigerados são especialmente importante conhecer a temperatura mínima de crescimento de *Salmonella* spp.. A temperaturas inferiores a 15°C o crescimento torna-se muito lento, cessando na maioria dos serótipos abaixo dos 7°C, porém, já foi reportado o crescimento deste microrganismo a temperaturas inferiores a 5°C, facto que pode ser preocupante em alimentos armazenados por longos períodos de tempo (ICMSF, 1996; Cox, 2000^a; Hammack & Andrews, 2000).

As baixas temperaturas favorecem a morte de *Salmonella* spp. principalmente durante o processo de congelação, comparativamente ao que acontece posteriormente durante o tempo de armazenamento. A taxa de mortalidade é maior a temperaturas entre 0 e -10°C do que entre -17 e os -20°C, porém, apesar do efeito adverso e impeditivo do seu desenvolvimento, as baixas temperaturas não garantem a completa destruição da

Salmonella spp. no alimento, que em alguns casos, devido ao seu efeito protector, pode viabilizar a sua permanência ao longo de vários anos em congelação (ICMSF, 1996; Cox, 2000^{a,b}).

Acima da temperatura máxima de crescimento de *Salmonella* spp. ocorre a morte destas bactérias (49,5 °C), com uma taxa que será tanto maior quanto mais elevada for a temperatura, sendo a temperatura máxima de crescimento especialmente importante nos produtos alimentares conservados pelo calor. Quando se pretende impedir o desenvolvimento destes microrganismos, e embora a temperatura de 55 °C seja suficiente, é geralmente aconselhado a utilização de uma temperatura, no mínimo, de 63°C (Nicholas, 1995; ICMSF, 1996; Cox, 2000; Hammack & Andrews, 2000).

São raras as biovariedades de *Salmonella* spp. resistentes às elevadas temperaturas, como por exemplo a estirpe 775W de *S. Seftenberg* que é considerada a mais resistente ao calor. Este tipo de resistência depende do a_w , natureza dos solutos e pH do meio, aumentando de forma inversa ao a_w e diminuindo de forma directa com os valores de pH, e em condições de a_w idênticas verifica-se uma maior resistência quando na presença de sacarose do que em presença de cloreto de sódio (ICMSF, 1996; Cox, 2000^a).

Relativamente ao a_w como factor limitante do seu desenvolvimento, *Salmonella* spp. têm por limite mínimo de crescimento o valor de 0,940, porém, são capazes de sobreviver por um ou mais anos em alimento com baixo a_w como por exemplo o chocolate, gelatina, manteiga de amendoim e a pimenta preta (ICMSF, 1996; Cox, 2000^a).

Já o valor de pH 3,8 é considerado o limite mínimo de crescimento de *Salmonella* spp., diminuindo a sua taxa de crescimento a valores superiores ou inferiores ao valor de pH óptimo (6,5-7,5), podendo morrer a valores extremos, sendo o valor de pH mínimo a partir do qual as *Salmonella* spp. se desenvolvem função da natureza dos ácidos orgânicos envolvidos (ICMSF, 1996; Cox, 2000; Theron & Lues, 2007).

A tolerância das *Salmonella* spp. à irradiação dos alimentos depende muito das características do substrato em que se encontram as células, da presença de oxigénio, que aumenta o efeito letal do tratamento, e a morte é mais rápida a temperaturas altas subletais compreendidas no intervalo de 45-55°C; a baixas temperaturas as bactérias

tornam-se menos sensíveis aos efeitos da radiação sendo dificilmente eliminadas em alimentos congelados (Ingram & Roberts, 1980; ICMSF, 1996).

Como bactérias tipicamente Gram-negativas, as *Salmonella* spp. mostram-se frequentemente resistentes aos conservantes vulgarmente utilizados nos alimentos, sendo a sua inibição conseguida muitas vezes com o recurso a combinações de vários conservantes em simultâneo com baixos valores de pH e baixas temperaturas de conservação (ICMSF, 1996; Leistner & Gould, 2002).

As *Salmonella* spp. também sobrevivem bem em superfícies cerâmicas, vidro, aço inoxidável e na pele humana, podendo estabelecer-se e multiplicar-se, tornando-se um foco de contaminação. Porém, são rapidamente eliminadas pela maioria dos desinfetantes disponíveis comercialmente, sendo conveniente estabelecer e aplicar com eficiência um plano adequado de limpeza e higienização das instalações, superfícies de equipamentos e pessoal em contacto com os alimentos (ICMSF, 1996; Wirtanen & Salo, 2005; Vieira-Pinto, 2008).

Como a *Salmonella* spp. pode causar doença com um número reduzido de células, é importante garantir a sua ausência em alimentos prontos a comer, passando o seu controlo pela aplicação de um processo que elimine o microrganismo, e pela prevenção de contaminações posteriores, associada à conservação do alimento a temperaturas superiores ou inferiores às que permitem o normal desenvolvimento da *Salmonella* spp. (Nicholas, 1995; Hubbert *et al.*, 1996; Dennis *et al.*, 2002).

2.1.2.4.6 - *Listeria monocytogenes*

A primeira descrição completa deste microrganismo data de 1926, quando Murray e seus colaboradores isolaram uma bactéria Gram-positiva em forma de bastonete, não esporulante, causadora de doença em coelhos e cobaias, que designaram por *Bacterium monocytogenes* por esta infectar os monócitos, e que passou mais tarde a designa-se por *Listeria monocytogenes* (ICMSF, 1996; Martin & Fisher, 2000; Guerra & Bernardo, 2004).

Listeria monocytogenes tem sido ao longo dos últimos anos o agente bacteriano mais estudado, consequência dos graves surtos de listeriose humana associados ao consumo de alimentos contaminados que ocorreram nas últimas décadas e que tornaram a listeriose numa saproozoonose de grande impacto económico e social (Batt, 2000^c; Guerra & Bernardo, 2004; Almeida *et al.*, 2006).

O género *Listeria* spp. é constituído por bastonetes curtos Gram-positivos, não esporulantes, catalase positivos e anaeróbios facultativos, que apresentam motilidade característica através de flagelos peritricos, “às cambalhotas”, quando incubado a temperaturas entre 20 - 25°C (ICMSF, 1996; Ferreira, 2000; Azevedo *et al.*, 2005).

Actualmente este género contempla 7 espécies, três não patogénicas, *L. innocua*, *L. murrayi* e *L. grayi*, outras três que raramente são patogénicas para o Homem, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri*, e a mais preocupante de todas a *L. monocytogenes* (Batt, 2000^b; Ferreira, 2000; Azevedo *et al.*, 2005).

A *L. monocytogenes* é uma bactéria patogénica oportunista capaz de sobreviver e multiplicar-se fora de um hospedeiro animal, em meios nutritivos simples sem nenhum requisito nutricional em especial, a temperaturas inferiores a 5°C e que além do Homem tem sido também apontada como agente infeccioso para variadas espécies de animais como os bovinos, pequenos ruminantes, aves, peixes e roedores (Bezirtzoglou *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2001; Mena *et al.*, 2004).

Trata-se de um microrganismo ubíquo, que existe globalmente disperso pelo ambiente, tendo já sido isolada a partir do solo, pó, lama, vegetação, silagem e diversos tipos de efluentes, e também está presente no intestino de humanos e de animais saudáveis (Young, 1991; Marth, 1998; Martin & Fisher, 2000; Goulet *et al.*, 2008).

Nos animais a doença pode manifestar-se de duas formas, ou através de meningoencefalites em ruminantes adultos, ou de doença visceral responsável pela ocorrência de nados mortos, abortos e de septicemia em animais jovens, ruminantes ou monogástricos (Bezirtzoglou *et al.*, 2000; Martin & Fisher, 2000).

Todos os animais portadores de *L. monocytogenes* são susceptíveis de contaminar os produtos alimentares a que dão origem, sendo os alimentos, apesar da baixa incidência desta infecção, a principal causa de ocorrência de listeriose em seres humanos (Young, 1991; Salvat *et al.*, 1995; Mena *et al.*, 2004; Goulet *et al.*, 2008).

Existem ainda poucas certezas no que diz respeito à sua dose infectante mas crê-se que será relativamente alta, superior a 100 células viáveis. Trata-se de um microrganismo patogénico intracelular facultativo que pode sobreviver e multiplicar-se nas células do sistema monócito/macrófago. Numa primeira fase este microrganismo é adsorvido à membrana das células do intestino induzindo a sua endocitose, e uma vez no interior do vacúolo do fagócito, produz, elevados níveis de enzimas que lhe vão permitir sobreviver, anulando o efeito dos aniões tóxicos, escapando-se finalmente para o citoplasma (Nørrung, 2000; McLauchlin, 1996; Bezirtzoglou *et al*, 2000).

A infecção invasiva está fortemente associada com a supressão da imunidade mediada pelas células T, e ocorre apenas em indivíduos susceptíveis como por exemplo indivíduos imunocomprometidos, indivíduos sujeitos a prolongados tratamentos com antibióticos ou corticoesteróides, pessoas com cirrose, diabéticos, cancerosos, seropositivos e mulheres grávidas, contabilizando estas por si só cerca de um terço dos casos de listeriose humana (ICMSF, 1996; Goulet *et al.*, 2008).

Os primeiros sintomas da doença surgem entre o primeiro e nonagésimo dia após a infecção. Manifestando-se de forma semelhante a uma gripe, evolui para meningite ou meningoencefalites; nas grávidas a doença provoca febre, dores de cabeça e sintomas de gastroenterite, podendo originar processos abortivos, partos prematuros e complicações infecciosas para os recém-nascidos (McLauchlin, 1996; Bezirtzoglou *et al*, 2000).

Cerca de 5% ou mais da população humana saudável é hoje portadora de *L. monocytogenes* sem manifestar qualquer sintoma de listeriose mas podendo constituir-se como fonte de contaminação, o que, eventualmente, será possível alterar mediante o recurso a boas práticas agrícolas e preparação higiénica dos alimentos (Young, 1991; Nørrung, 2000; Goulet *et al.*, 2008).

As superfícies húmidas em instalações agro-industriais são frequentemente abrigo deste tipo de bactérias, o que associado à sua capacidade de desenvolvimento a baixa temperatura se reflecte na sua frequente presença em frigoríficos e unidades de refrigeração (ICMSF, 1996; Azevedo *et al.*, 2005).

A temperatura de armazenamento constitui, assim, o principal factor de risco de multiplicação de *L. monocytogenes* em muitos alimentos perecíveis, conseguindo-se com o armazenamento a temperaturas iguais ou menores a 5°C atrasar mas não impedir

completamente o desenvolvimento e a multiplicação deste microrganismo em muitos destes produtos (Nørrung, 2000; Guerra *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2005).

Em variados tipos de alimentos a *L. monocytogenes* apresenta capacidade para sobreviver durante várias semanas a -18°C com baixa mortalidade em condições de congelação, mas por outro lado é pouco resistente a ambientes ácidos e de difícil manutenção em meios de cultura laboratoriais (ICMSF, 1996; Batt, 2000^c; Nørrung, 2000).

Em alimentos estéreis, de pH neutro e ricos em nutrientes, a temperatura mínima de crescimento da *L. monocytogenes* é de 0°C, temperatura a que o crescimento é muito lento, com um tempo de geração que pode variar entre as 62 e as 131 horas. A duração da fase lag é afectada pela temperatura a que incubou o inóculo, que pode desenvolver-se num largo intervalo de valores de pH que vai de 4,6 a 9,2 (Nørrung, 2000; Mena *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2005).

Nos alimentos naturalmente contaminados, em condições de competição com outros microrganismos e valores de pH baixos, a *L. monocytogenes* pode sobreviver sem contudo se desenvolver, mas cresce com facilidade a baixas temperaturas na ausência de competidores. O seu crescimento é afectado por factores como o teor em sal, pH e presença de bactérias ácido lácticas, especialmente as capazes de produzir bacteriocinas, enquanto a temperaturas mais altas, mesmo na presença de outros microrganismos, diminui a sua fase lag e o tempo de geração (Yokoyama *et al.*, 1998; Martin & Fisher, 2000; Fraqueza *et al.*, 2006).

A não ser que o teor inicial seja relativamente elevado (10^5 - 10^6 ufc/g), contrariamente ao que geralmente se verifica com as outras formas vegetativas de bactérias Gram-positivas, a *L. monocytogenes* não é muito resistente ao processamento térmico dos alimentos, sucumbindo facilmente à pasteurização comercial do leite e das natas, enquanto na carne e nos produtos cárneos apresenta maiores valores de D, o que se deve eventualmente à gordura presente nestes produtos (Martin & Fisher, 2000; Mena *et al.*, 2004).

As temperaturas a que se desenvolve inicialmente o inóculo têm influência na futura resistência da *L. monocytogenes* ao processamento térmico; quando o inóculo se desenvolve a baixas temperaturas as células produzidas são pouco resistentes ao calor, porém, a sua resistência pode aumentar pela acção de um choque de calor

imediatamente antes do processamento térmico ou pelo desenvolvimento prévio de *L. monocytogenes* a temperaturas relativamente elevadas. Como seria de prever também a presença de elevadas concentrações de solutos aumenta a sua resistência ao calor e a valores de pH inferiores ao óptimo a sua resistência diminui (ICMSF, 1996; Martin & Fisher, 2000).

A sua resistência aos efeitos da radiação γ é da mesma ordem que a apresentada pelas restantes formas vegetativas das bactérias Gram-positivas, dependendo os seus valores D do substrato em que se encontra o microrganismo, sendo a *L. innocua* a que é menos resistente à radiação não devendo por isso ser usada como indicador da eficiência do tratamento na eliminação da *L. monocytogenes* (ICMSF, 1996).

Em termos de reacção à radiação UV, a *L. monocytogenes* apresenta menor resistência do que qualquer uma das outras formas vegetativas de bactérias Gram-positivas, notando-se porém que nas células desidratadas a sua resistência é 2,5 a 4 vezes superior comparativamente às células em condições normais de hidratação (ICMSF, 1996).

Relativamente ao a_w , quando este é controlado mediante a adição de glicerol a *L. monocytogenes* tem um limite mínimo de crescimento a 30°C de 0,900, e de 0,920 e 0,930 nos casos do cloreto de sódio e da sacarose. Já em sistemas cárneos sem adição de solutos, o limite de crescimento a 20°C é de 0,930, semelhante ao verificado com as outras formas vegetativas de bactérias Gram-positivas, conseguindo-se um maior efeito bacteriostático através da conjugação de baixos valores de a_w com baixas temperaturas (< 4 °C), e ocorrendo uma maior tolerância ao efeito dos solutos quando as temperaturas estão compreendidas entre os 15 e os 30°C (ICMSF, 1996; Nørrung, 2000).

Na ausência de matéria orgânica, são vários os desinfectantes capazes de *in vitro* ser eficientes no controlo da *L. monocytogenes*, incluindo o hipoclorito de sódio, iodo, peróxidos e compostos de amónio quaternário, mostrando-se esta bactéria mais resistente em superfícies secas do que em superfícies húmidas (ICMSF, 1996).

O tipo de atmosfera tem pouca importância no desenvolvimento da *L. monocytogenes*, tendo-se verificado tempos de geração semelhantes em condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose, sem que ocorra um efeito inibidor causado por elevadas concentrações de CO₂, excepto quando a baixas temperaturas (ICMSF, 1996; Murphy *et al.*, 2005; Fraqueza *et al.*, 2006).

A *L. monocytogenes* é, então, uma bactéria extremamente resistente, capaz de sobreviver a processamentos térmicos ligeiros e de se desenvolver nas condições que ocorrem na grande maioria dos alimentos, cujo controlo, se torna frequentemente mais eficiente com o recurso e combinação de variados factores (Guerra *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2005; Goulet *et al.*, 2008).

A prevenção da listeriose deve iniciar-se na exploração agrícola e continuar até ao processamento, selecção e manipulação dos alimentos pelo consumidor, pois o carácter ubíquo da *L. monocytogenes* torna impossível a sua exclusão completa da cadeia alimentar. Porém, o seu controlo pode diminuir o risco de listeriose de origem alimentar, sendo este um clássico exemplo onde a metodologia HACCP deve ser aplicada desde o prado ao prato no intuito de minimizar o risco de doença (Salvat *et al.*, 1995; Nørrung, 2000; Goulet *et al.*, 2008).

Para um efectivo controlo, três objectivos devem ser cumpridos, minimizar o crescimento da *L. monocytogenes* nas matérias-primas, recorrer a um processamento térmico eficiente capaz de a eliminar e impedir a recontaminação dos alimentos prontos a comer (ICMSF, 1996; Murphy *et al.*, 2005).

Relativamente à probabilidade de ocorrência de *L. monocytogenes*, de acordo com a OMS, os alimentos podem dividir-se em quatro categorias: alimentos crus, alimentos crus termicamente não processados o suficiente para a eliminar, alimentos processados termicamente mas com forte possibilidade de recontaminação pós processamento, alimentos processados termicamente já embalados ou que são embalados de forma asséptica após o processamento (ICMSF, 1996).

Devido à prevalência da *L. monocytogenes* nos produtos crus e à sua capacidade de se multiplicar no ambiente de muitas indústrias alimentares, os métodos tradicionais de limpeza e desinfecção, o desenho dos equipamentos e as práticas de fabrico podem mostrar-se frequentemente inadequadas ou mesmo prejudiciais a um eficiente controlo deste microrganismo (Nørrung, 2000; Mena *et al.*, 2004).

O consumo de produtos tradicionais tem estado algumas vezes envolvido em surtos de listeriose, sendo pois importante que os retalhistas apliquem algumas regras básicas de higiene como separar alimentos crus de alimentos processados, manter a temperatura de armazenamento abaixo dos 5°C, aplicar planos de limpeza e desinfecção adequados às instalações e em especial aos equipamentos de corte, além da vantagem

em obter este tipo de produtos junto de produtores que apliquem o HACCP no controlo da *L. monocytogenes* (Salvat *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 2005).

Relativamente aos consumidores, especialmente os que fazem parte do grupos de risco, devem evitar o consumo de alimentos de origem animal crus ou mal processados, evitar contaminações cruzadas entre alimentos durante o processamento e armazenamento, aquecer convenientemente os alimentos e, no caso do recurso a microondas, certificar-se de que o alimento está quente por inteiro, evitar alimentos considerados de risco, lavar bem frutos e vegetais, respeitar as validades, respeitar as instruções, manter o frigorífico limpo, e evitar conservar alimentos perecíveis por mais de 3 dias mesmo nas zonas mais frias do frigorífico (Salvat *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 2005; Goulet *et al.*, 2008).

Ainda assim, apesar da investigação realizada, que permitiu alcançar progressos no que respeita à avaliação do risco que *L. monocytogenes* constitui, existem ainda muitas lacunas no conhecimento dos múltiplos factores intervenientes o que seguramente contribui para que o problema da listeriose continue a prevalecer na actualidade (McLauchlin, 1996; Guerra & Bernardo, 2004; Goulet *et al.*, 2008).

2.2 - Conservação de alimentos

O Homem só conseguiu garantir a sua sobrevivência quando após ter aprendido a produzir os alimentos frescos que recolhia directamente da natureza, passou a ser capaz de os conservar, passando assim a superar períodos de escassez causados pela sazonalidade das produções, más colheitas e catástrofes naturais (Wilson, 1991; Henry, 1997; Hulse, 2004).

Já na Antiguidade eram conhecidos diversos métodos para a conservação dos alimentos de origem animal, utilizados então com a dupla finalidade de disponibilizar esses produtos em alturas em que escasseavam e facilitar a sua distribuição; passou, então, a produzir-se carne e peixe secos, salgados, fermentados ou fumados (Branen, 1993; Casp & Abril, 1999; Zeuthen, 2007).

Actualmente, de entre as metodologias que geralmente são utilizadas para conservar um produto alimentar e aumentar a sua validade, desidratação, adição de químicos, calor, frio e irradiação, só as duas primeiras remontam à Antiguidade, continuando ainda hoje a ser desenvolvidos novos processos de conservação como os que assentam na utilização de altas pressões hidrostáticas ou hidrodinâmicas (Wilson, 1991; Hubbert *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006; Zeuthen, 2007).

A evolução registada nas tecnologias de conservação dos alimentos permite que o consumidor de hoje usufrua e armazene os produtos em sua casa por maiores períodos de tempo, o que não estará dissociado de uma certa diminuição da qualidade dos produtos alimentares e de um aumento dos perigos a eles associados (Zink, 1997; Notermans & Barendsz, 2002; Hulse, 2004).

A elevada perecibilidade das carnes continua hoje a obrigar à utilização de múltiplas tecnologias de conservação onde intervém o frio, o calor, os processos fermentativos, a secagem, a salga, a fumagem e a conservação química com recurso a aditivos, algumas das quais utilizadas desde há muito por civilizações primitivas que já então recorriam à seca, salga, cura, fumagem e a processamentos térmicos como a cocção, fritura e assado (Oliveira, 1996; Zbigniew, 1999; Leistner & Gould, 2002; Zeuthen, 2007).

Todos estes tratamentos visam a conservação dos alimentos e têm objectivos benéficos, mas podem, sobretudo quando mal conduzidos, produzir resíduos e produtos nutricionalmente menos desejáveis, que a par das substâncias de valor nutricional e sápidas dos alimentos podem gerar outras substâncias menos interessantes do ponto de vista toxicológico (Oliveira, 1996; Parent-Massin & Blanquat, 2002; Toldrá & Reig, 2007).

A conservação dos alimentos, incluindo a da carne e dos produtos cárneos, é conseguida através do fomento de condições desfavoráveis ao desenvolvimento de organismos saprófitas como bactérias, leveduras, bolores e parasitas, procurando atrasar ou eliminar as alterações responsáveis pela deterioração dos alimentos, que lhes retiram qualidade ou inviabilizam mesmo o seu consumo (Gould, 1996; Leistner, 2000; Aymerich *et al.*, 2008).

Para além disso, as tecnologias que visam a conservação da carne e dos produtos cárneos devem também ter em consideração o controlo da acção de determinadas

enzimas existentes naturalmente nos tecidos, e a prevenção da oxidação lipídica que conduz à rancificação dos produtos e compromete seriamente as suas características (Skibsted, 1996; Zbigniew, 1999; Toldrá & Reig, 2007).

Os procedimentos tradicionais de conservação de alimentos assentam geralmente na utilização de condições extremas como as altas ou baixas temperaturas, acidificação, desidratação e outras. Neste contexto, consegue-se parar o crescimento microbiano, mas as propriedades organolépticas do produto ficam irremediavelmente danificadas (Zbigniew, 1999; Leistner & Gould, 2002).

São de isso exemplo algumas limitações dos métodos convencionais de conservação de alimentos apontados por Chirife (Quadro 1), referido por Zbigniew (1999).

Quadro 1 - Algumas limitações das formas tradicionais de conservação de alimentos baseadas na aplicação de uma barreira.

Método	Barreira	Limitações
Seca	a_w	Perdas de sabor, forma e cor. Textura. Rehidratação lenta/incompleta.
Liofilização	a_w	Custo
Enlatamento	Inactivação térmica	Perda de qualidade. Custo da lata. Custo da energia.
Salga	a_w	Teor em sal muito alto. Textura pobre em carnes.
Acidificação (natural/artificial)	pH	Alterações de sabor devido à elevada acidez.
Conservantes	Acção antimicrobiana	Problemas legais e de saúde pública.
Refrigeração/Congelação	Baixa temperatura e a_w na congelação	Custo da energia. Obriga à existência de cadeias de frio.

Assim, procurando atenuar os efeitos negativos sobre as características dos alimentos, desenvolveu-se um conceito com base na combinação de diferentes metodologias de conservação, e é hoje conhecido como tecnologia de barreiras. De acordo com este conceito, cada processo de conservação é baseado na aplicação de uma ou duas barreiras principais, que juntamente com a acção adicional de outras barreira secundárias vão proporcionar a esperada estabilidade microbiana e ou enzimática do alimento (Leistner & Gorris, 1995; Gorris, 2000; Morris *et al.*, 2007).

Assumindo que os diferentes processos de deterioração devem estar sob permanente controlo para que possa ser garantida a manutenção da qualidade da carne, é sem dúvida a putrefacção de origem microbiana, aquela que mais preocupações acarreta sob os pontos de vista da segurança dos consumidores e económico (Zbigniew, 1999; Guerrero & Chabela, 2000; Mano *et al.*, 2002).

A carne, em virtude da sua composição físico-química, é considerada um produto facilmente perecível, no qual os microrganismos proliferam rapidamente tornando-a imprópria para consumo caso não sejam tomadas de imediato medidas que visem a sua conservação (Mano *et al.*, 2002; Kandeepan & Biswas, 2007; Aymerich *et al.*, 2008).

É por isso importante que sejam tomadas desde o início medidas que limitem ou minimizem o número de microrganismos que contaminam a carne, seus derivados e produtos cárneos, já que estes cuidados aliados à melhoria e incremento das tecnologias tradicionalmente usadas pela indústria na conservação deste tipo de produtos permitem a extensão do seu prazo de validade, justificando todos os esforços que visem minimizar os níveis de contaminação inicial da carne quer esta se destine a ser processada industrialmente ou a simples utilização culinária, (Gill, 1996; Bell *et al.*, 1996; Rybka-Rodgers, 2001; Kandeepan & Biswas, 2007; Aymerich *et al.*, 2008).

A bioconservação da carne e dos produtos cárneos visa prolongar o prazo de validade e aumentar o nível segurança destes alimentos, recorrendo para isso à microflora que naturalmente neles existe e se desenvolve e/ou aos seus metabolitos com acção antibacteriana. As bactérias ácido lácticas são, neste caso consideradas as que maior potencial apresentam, constituindo também as bacteriocinas como a nisina excelentes conservantes quando utilizadas só ou em misturas (Holzapfel *et al.*, 1995; Rybka-Rodgers, 2001; Greer & Dilts, 2004; Vignolo & Fadda, 2007).

Na prática, a eficiência da utilização dos métodos e técnicas de conservação de alimentos, depende em grande parte do tipo e da composição química das matérias-primas utilizadas (Leistner & Gorris, 1995; Gould, 1996; Leistner, 2000; Leistner & Gould, 2002). Consequentemente, a eficiência da aplicação desses métodos vai depender entre outros de uma série de factores relevantes, de que são exemplo a quantidade de água biologicamente disponível, a contaminação microbiológica inicial, os padrões de higiene no manuseamento e processamento, as circunstâncias de aplicação dos métodos de conservação e o tempo e condições de armazenamento (Marth, 1998; Leistner & Gould, 2002; Aymerich *et al.*, 2008).

Assim, a existência de teores elevados de contaminação inicial nas matérias-primas utilizadas, diminui muito a probabilidade de se atingir um nível suficiente de destruição das formas vegetativas da microflora existente, particularmente no caso das bactérias (Legarreta, 2006; Stahnke & Tjener, 2007; Aymerich *et al.*, 2008).

Deste modo, a higiene do processo de fabrico, através da aplicação do código de boas práticas de fabrico e a implementação e observação do conceito de HACCP no manuseamento das matérias-primas de origem animal, carne e produtos cárneos, é considerada de primordial importância para a eficiência dos métodos e técnicas de conservação destes produtos (Cross, 2006; Toldrá *et al.*, 2007, Fraqueza *et al.*, 2007).

É pois previsível que num futuro próximo o prazo de validade das várias formas de comercialização da carne e produtos cárneos seja substancialmente alargado através da aplicação de novos métodos físicos e técnicas de conservação, que garantam o fornecimento de alimentos seguros, nutritivos e apetecíveis (Coma, 2006; Morris, *et al.*, 2007; Aymerich *et al.*, 2008).

No entanto deverá reforçar-se a ideia de que mesmo os métodos de conservação mais ligeiros devem, sempre que possível, ser substituídos por outros cujos efeitos sejam negligenciáveis ou que não acarretem consequências negativas, devendo simultaneamente ser fiáveis e economicamente viáveis (Leistner & Gorris, 1995; Zink, 1997; Leistner, 2000; Leistner & Gould, 2002).

Os produtos refrigerados processados com vista ao alargamento do seu prazo de validade, são produtos geralmente sujeitos a um processamento mínimo ou pré-cozinhados, que apresentam uma vida útil alargada mas ainda assim limitada, em que o frio é a principal chave da sua conservação (Marth, 1998; Gould, 1999; James, 2006).

Neste tipo de alimentos podem incluir-se as tradicionais carnes curadas mas também uma nova geração de produtos alimentares parcialmente processados e refrigerados, tais como saladas de carne, peixe, marisco, ovos e vegetais, massas frescas, molhos, sopas e pratos pré-cozinhados (ECFF, 1996; Shaw, 1996; Rybka-Rodgers, 2001).

Previsivelmente, simultaneamente à utilização do frio na conservação dos alimentos, irá verificar-se uma evolução das embalagens utilizadas, já que cada vez mais os consumidores procuram alimentos minimamente processados, de elevada qualidade, nutricionalmente superiores, apetecíveis, económicos e fáceis de preparar (Zink, 1997; Rooney & Yam, 2004; Alzamora & Salvatori, 2006; Coma, 2006).

A eficiência da refrigeração como meio de conservação da carne e dos produtos cárneos crus ou cozinhados está actualmente associada à aplicação de outros métodos complementares de conservação, como por exemplo a embalagem a vácuo, em atmosfera controlada ou modificada e com recurso sempre que possível a materiais constituídos por polímeros edíveis e ou biodegradáveis (O'Mahony *et al.*, 2004; Coma, 2006, 2008).

Também a utilização de compostos com capacidade para remover o oxigénio e os radicais livres, sequestrar os iões metálicos, com acção conservante, antioxidante, bacteriocinas, altas pressões, irradiação e outros, são considerados como futuros complementos à conservação de produtos alimentares pelo frio, sendo muitos deles já utilizados actualmente (Zbigniew, 1999; Rybka-Rodgers, 2001; O'Mahony *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2007).

Dentro deste conceito encontram-se também os alimentos “*sous-vide*”, alimentos cozinhados após embalagem a vácuo e hermeticamente selados; sendo o tratamento térmico a que são sujeitos este tipo de alimentos bastante inferior ao necessário para assegurar uma esterilização comercial, consideram-se uma categoria de alimentos distinta das conservas enlatadas (ACMSF, 1993; Nissen *et al.*, 2002; Fagan & Gormley, 2005).

A carne e os produtos cárneos podem ser conservados por acção do frio, uma vez que alcançada a temperatura de 4,4°C muitos dos microrganismos presentes cessam o seu crescimento, no entanto a maioria não morre pelo efeito das baixas temperaturas e quando conservamos um produto no frio estamos também a seleccionar potenciais

agentes patogénicos com por exemplo a *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* (Hubbert *et al.*, 1996; Marth, 1998; James, 2006).

A conservação dos produtos cárneos será mais bem conseguida a temperaturas compreendidas entre 0 e 1,7 °C, como foi demonstrado em estudos realizados a várias temperaturas, nos quais em carne de bovino conservada a 0 °C poderia esperar-se uma validade de até 15 dias sem que as suas características fossem alteradas, mas por cada 5°C de incremento na temperatura de conservação essa validade diminuía para sensivelmente metade do tempo, e em salsichas do tipo Frankfurt conservadas 0°C a sua durabilidade quadruplicava comparativamente com as mesmas salsichas conservadas a 10°C (Hubbert *et al.*, 1996; James, 1996, 2006; Mano *et al.*, 2002).

Na utilização do frio como forma de conservação dos alimentos, especialmente no caso da refrigeração, deverá ser dada especial atenção à manutenção da temperatura durante todo o tempo de vida do produto, devendo evitar-se a ocorrência de temperaturas abusivas, superiores a 10°C, a partir das quais se verifica o desenvolvimento embora lento de muitas bactérias psicrófilas e de bactérias potencialmente patogénicas não proteolíticas como a *Listeria monocytogenes* e o *Clostridium botulinum* (Marth, 1998; Zbigniew, 1999; James, 2006).

Para a conservação da carne e dos vários tipos de alimentos à base de carne recorre-se à utilização de técnicas e tecnologias rápidas de congelação, como a congelação em leiteo fluidificado, salmoura, congelação criogénica e de choque, em túneis ou espirais de congelação e ou congeladores criogénicos evitando a formação de cristais de dimensões capazes de danificar as células e provocar perdas de água e alterações na textura (Zbigniew, 1999; Camou-Arriola *et al.*, 2006; Chabela & Mateo-Oyague, 2006).

É também de salientar que a evolução verificada na construção dos equipamentos de controlo e produção de frio, permite a manutenção das temperaturas requeridas nas câmaras, podendo a carne ser armazenada a temperaturas de -1,5 a -2,5 °C sem que ocorra a formação de cristais de gelo nos tecido, e assim conservar-se a temperatura crioscópica até 4 semanas e posteriormente apresentar-se tão fresca como a que é comercializada refrigerada a 4 °C (Zbigniew, 1999; Camou-Arriola *et al.*, 2006).

Os tratamentos térmicos nas suas diferentes formas de aplicação continuam a ser um modo de conservação de alimentos muito frequente, sendo todos os processos de

aplicação de tratamentos térmicos à carne e aos produtos cárneos, como a cozedura, escaldão, fritura, assado, pasteurização, tindalização e em especial a esterilização considerados métodos de conservação bastante fiáveis, apesar de a sua eficiência depender em muito da quantidade de energia térmica absorvida (Stiebing, 1992^a; Zbigniew, 1999; Legarreta, 2006).

A esterilização utilizada pela indústria de conservas em lata permite o armazenamento à temperatura ambiente por longos períodos de tempo, possibilitando dessa forma a constituição de reservas estratégicas de produtos a utilizar em situações de emergência (Stiebing, 1992^b; Vicente & Cenzano, 2001; Marks, 2006).

Também a desidratação utilizada conjuntamente com a fermentação, utilizada pelas indústrias do sector da carne, visa a manufactura de produtos cárneos fermentados de maturação prolongada, como o chouriço, paio, salame, presunto e muitos outros (Flores, 1997; Leistner & Gould, 2002; Andrés *et al.*, 2007).

E se bem que a cura e a fumagem há muito tenham perdido o seu significado como conservantes da carne e dos produtos cárneos, é opinião generalizada que a utilização destas tecnologias, não será justificada pela sua importância como conservante e antioxidante, mas antes pelo seu contributo na obtenção de cor, aroma e sabor nos típicos produtos cárneos curados (Flores, 1997; Zbigniew, 1999; Ockerman & Basu, 2007).

A conservação de produtos perecíveis como a carne e os produtos cárneos continua hoje a ser uma tarefa aliciante, porém em muitas regiões do globo os custos energéticos e tecnológicos da aplicação comercial das actuais e emergentes formas de conservação não são facilmente suportados, casos em que os métodos tradicionais de conservação e processamento da carne adquirem outra importância, com reflexos nas preferências e nas diferenças observadas nas dietas das diferentes comunidades mundiais (Flores, 1997; Mintz & Du Bois, 2002; Leistner & Gould, 2002).

Já nos países desenvolvidos a aplicação das tecnologias actuais e o desenvolvimento de novas tecnologias de conservação de alimentos será uma constante, sendo unânime a opinião sobre as grandes potencialidades de aplicação salvo raras excepções de tecnologias de conservação não térmicas como: radiação ionizante, altas pressões hidrostáticas, ultra-sons, pascalização, campos eléctricos de alta voltagem,

microondas, campos magnéticos oscilatórios, impulsos luminosos de alta densidade e bacteriocinas (Alzamora & Salvatori, 2006; Morris *et al.*, 2007; Aymerich *et al.*, 2008).

2.2.1 - Processamento térmico

O processamento térmico de alimentos é um dos principais métodos de conservação conhecidos, tendo sido desenvolvido inicialmente por Nicholas Appert em 1810 quando este submeteu alimentos à base de carne e vegetais à acção de água fervente depois de os ter previamente embalado em recipientes estanques, preconizando o que seria mais tarde a indústria de conservas alimentares (Mossel *et al.*, 1995; Noronha, 1996; Liu, 2006).

Podem englobar-se no processamento térmico de alimentos todos os procedimentos que entre outros objectivos visam a destruição dos microrganismos pelo calor, como a pasteurização e a esterilização cuja principal finalidade é a destruição da flora microbiana. Mas também o são o escaldão e a cocção, processos que apesar de reduzirem a flora microbiana têm como objectivo principal actuar noutras componentes de ordem físico-química do alimento (Vicente & Cenzano, 2001; Legarreta, 2006; Marks, 2006).

No caso dos produtos cárneos já preparados o processamento térmico visa não só a destruição dos microrganismos presentes, capazes de deteriorar o produto ou causar doença nos consumidores, mas também simultaneamente melhorar o sabor e a textura do produto via desnaturação das proteínas por acção do calor (Stiebing, 1992^a; Bratt, 1995; Legarreta, 2006).

A complexidade da acção do processamento térmico sobre os alimentos obriga à sua optimização caso a caso para se atingirem os resultados pretendidos, e ainda que o principal objectivo seja a destruição dos microrganismos outros fenómenos ocorrem em simultâneo, alguns desejáveis como a desactivação enzimática, amolecimento de tecidos e melhoria da digestibilidade e outros que não sendo desejáveis são inevitáveis como a destruição de nutrientes e a perda de qualidades organolépticas (Noronha, 1996; Beales & Smith, 2004; Marks, 2006).

Os primeiros trabalhos acerca da destruição dos microrganismos pelo calor foram realizados em meados dos anos 20 do século passado por, Bigelow e por Ball que desenvolveram uma teoria de avaliação do processamento térmico relativamente à morte e desactivação dos microrganismos, tendo mais tarde autores como Gillespy em 1946, Jakobsen em 1954 e Stumbo em 1973, determinado que a destruição térmica dos microrganismos podia explicar-se com base num processo estatístico (Noronha, 1996; Casp & Abril, 1999).

O conceito básico desta teoria assenta no facto de que os microrganismos e os seus esporos morrem a qualquer temperatura, porém, quanto maior for a temperatura a que são expostos maior será a probabilidade da sua morte acontecer (Mossel *et al.*, 1995; Casp & Abril, 1999; Azizi, 2000).

Assim, sendo P a probabilidade de sobrevivência por unidade de tempo de um microrganismo exposto a uma determinada temperatura, resulta que para t unidades de tempo essa probabilidade será de P^t (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

Se inicialmente existirem N esporos com idêntica resistência térmica, então o número de sobreviventes a um tratamento térmico que se prolongue por um período de tempo t , pode expressar-se pela equação $S = N \times P^t$ ou na sua forma logarítmica $\log S = \log N + t \log P$ (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

A destruição dos microrganismos pode assim ser representada por uma equação logarítmica, e estabelecendo para ordenadas o número de sobreviventes ($\log S$) e o tempo para abcissas (t), obtém-se uma recta pendente de declive igual a $\frac{d(\log S)}{dt} = \log P$ (Gráfico 1), que como o valor da probabilidade (P) varia entre 0 e 1 será sempre negativo (Stiebing, 1992^a; Casp & Abril, 1999; Stoforos & Taoukis, 2006).

Considerando que $\log P = -\frac{1}{D}$, é o mesmo que denominar D pelo tempo necessário para que a recta percorra uma unidade em ordenadas correspondente a um ciclo logarítmico, então $\log S = \log N - \frac{t}{D}$ que na forma exponencial ficará $S = N \times 10^{\frac{-t}{D}}$, sendo D reconhecido como o tempo de redução decimal e expresso

geralmente em minutos (Stiebing, 1992^a; Casp & Abril, 1999; Stoforos & Taoukis, 2006).

E como o valor de D corresponde a um tempo, poderá ser expresso através dele o tempo total de um processamento $t = n \times D$, sendo n o número de reduções decimais que ocorrem no tempo que dura um determinado processamento térmico (Stiebing, 1992^a; Bratt, 1995; Liu, 2006).

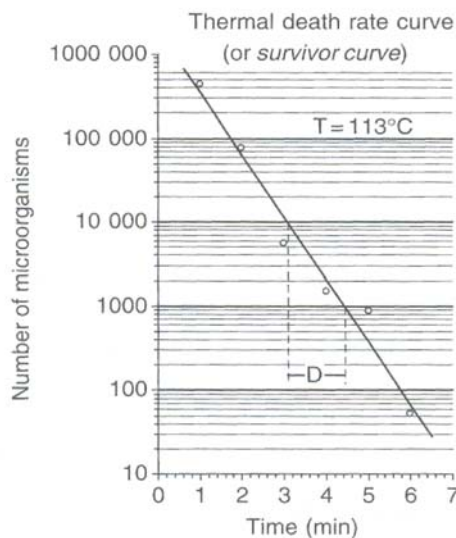


Gráfico 1 – Representação gráfica de uma curva de morte térmica e do respectivo tempo de redução decimal (D). (Stoforos & Taoukis, 2006).

E como o valor de D corresponde a um tempo, poderá ser expresso através dele o tempo total de um processamento $t = n \times D$, sendo n o número de reduções decimais que ocorrem no tempo que dura um determinado processamento térmico (Stiebing, 1992^a; Bratt, 1995; Liu, 2006).

Das equações anteriores resulta que $P^t = 10^{\frac{-t}{D}}$, desta forma quando se aplica uma redução decimal ($n=1$) então $t=D$ e $P^t = P^D = 10^{\frac{-D}{D}} = 10^{-1} = 0,1$, significando que após este tratamento se pode esperar que sobrevivam apenas 10% dos microrganismos iniciais enquanto se ($n=2$) essa probabilidade será de 1% (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

O tempo de redução decimal (D) indica assim a termoresistência de um determinado tipo de microrganismo definida a uma determinada temperatura, significando na prática que quando se mantém uma suspensão de células a uma temperatura constante durante um tempo de D minutos, se destroem 90% da população inicial e prolongando o tratamento por mais D minutos vão-se destruir 90% da população remanescente e assim sucessivamente (Bratt, 1995; Azizi, 2000; Liu, 2006).

Conhecendo então o tempo de redução decimal de um microrganismo a uma determinada temperatura, e o número de reduções decimais desejadas com um determinado processamento térmico, poderá facilmente calcular-se qual a duração do tratamento a aplicar utilizando essa temperatura (Stiebing, 1992^a; Azizi, 2000; Earle & Earle, 2004).

Por sua vez, o facto de existir uma relação logarítmica entre o número de sobreviventes e o tempo de tratamento impede que se garanta a total destruição dos microrganismos inicialmente presentes no alimento, pois a curva representada em coordenadas decimais é assintótica com o eixo representativo do tempo, tendente para 0 em $+\infty$ mas nunca cruzando o eixo das abcissas (Bratt, 1995; Noronha, 1996; Azizi, 2000).

Deste modo para produzir alimentos que não comprometam a saúde pública será necessário que a probabilidade de sobrevivência aceite para os microrganismos patogénicos seja muito baixa, recomendando-se para o caso dos alimentos pouco ácidos uma probabilidade menor ou igual a 10^{-12} , o que corresponde a um tempo mínimo de processamento de $12D$, o que garante a destruição de 99,9999999999% dos microrganismos iniciais (Stiebing, 1992^a; Bratt, 1995; Azizi, 2000).

Deste modo o sucesso do tratamento para além da temperatura utilizada e do tempo de processamento, depende muito da carga microbiana inicial do alimento, já que quanto maior for o seu número, maior será o número de microrganismos sobreviventes para valores constantes de t e D (Bratt, 1995; Vicente & Cenzano, 2001; Stoforos & Taoukis, 2006).

Constituindo, para um determinado microrganismo, curvas de morte térmica a diferentes temperaturas, torna-se evidentemente que quanto maior for a temperatura experimentada menor será o tempo de redução decimal, acentuando-se o declive da curva e sendo necessário menos tempo para diminuir em 90% os microrganismos

inicialmente presentes no produto (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

A representação destes valores em função das temperaturas a que foram obtidos numa folha de papel semi-logarítmico também se ajusta a uma recta (Gráfico 2), e da mesma forma que se obteve o parâmetro D poderá então neste caso determinar-se um outro parâmetro z , cujo valor corresponde igualmente à diminuição de um ciclo logarítmico no tempo de redução decimal (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

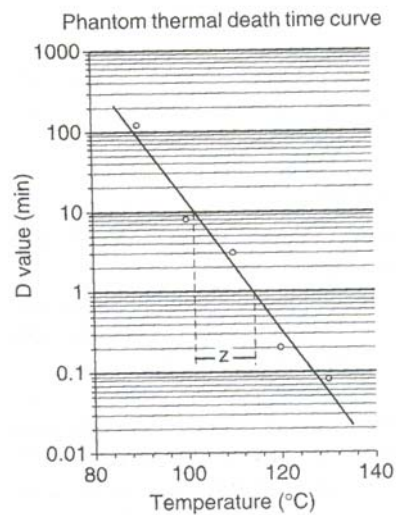


Gráfico 2 – Representação gráfica da obtenção do valor da taxa de morte térmica (z) a partir do tempo de redução decimal (D). (Stoforos & Taoukis, 2006).

A termoresistência característica de cada espécie de microrganismo num meio de composição definida designa-se então por z e é expressa em graus centígrados, significando que para um aumento de temperatura de z graus, o período de tempo requerido para conseguir a mesma destruição térmica é 10 vezes menor (Stiebing, 1992^a; Bratt, 1995; Earle & Earle, 2004).

Torna-se assim evidente que é possível alcançar resultados de letalidade idêntica com processamentos térmicos que empreguem relações de tempo (t) e temperatura (T) distintas, sendo infinitas as possibilidades de tratamentos com acção equivalente sobre determinado tipo de microrganismo que podem ser facilmente determinados a partir de

valores de referência conhecidos (t^*, T^*) empregando para isso as expressões $t = t^* \times 10^{\frac{-(T-T^*)}{z}}$ ou $D = D^* \times 10^{\frac{-(T-T^*)}{z}}$ (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

Assim, para avaliar a eficácia de um processamento térmico, o sistema que se emprega é o de estabelecer uma comparação com outro tratamento de eficácia reconhecida, devendo em primeiro lugar eleger-se um microrganismo e uma temperatura de referência, que uma vez escolhidos nos vão permitir determinar a intensidade do processamento em causa (Stiebing, 1992^a; Azizi, 2000; Liu, 2006).

A relação da letalidade entre os tratamentos pode assim obter-se pelo quociente entre os seus valores de tempo de redução decimal $L_T = \frac{D^*}{D}$, que pode calcular-se a partir da equação $L_T = 10^{\frac{T-T^*}{z}}$. Estabelece-se assim a relação da letalidade entre os dois tratamentos sobre um microrganismo cujo parâmetro de termoresistência é z , em que um foi realizado a uma temperatura de referência (T^*) e outro a uma temperatura (T) durante uma unidade de tempo (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

Então, para um tratamento com um tempo de duração (t) superior a 1, $F_{T^*} = L_T \times t = t \times 10^{\frac{T-T^*}{z}}$, denominando-se a relação de letalidade quando a temperatura de referência é 121,1 °C e o microrganismo é o *C. botulinum* com um valor de $z=10^\circ\text{C}$ por $F_o = F_{121,1}^{10}$ (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

Tudo isto será válido considerando que os tratamentos são realizados a temperatura constante, com aquecimento e arrefecimento instantâneos, o que na prática não é possível já que em qualquer processamento existem períodos de tempo a temperaturas distintas, cada um dos quais com a sua letalidade (L_T) diferente. Sendo nesse caso o valor de F calculado somando os produtos das letalidade a cada temperatura pelo tempo que se aplicou cada uma delas $F_{T^*} = \sum L_{T_i} \times \Delta t_i$, o que para uma variação contínua da temperatura se converterá em $F_{T^*} = \int_0^t L(T) dt$ (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

Desta feita, caso se esteja a considerar um tratamento de esterilização a expressão anterior tomará a forma $F_0 = \int_0^t 10^{\frac{T-121,1}{10}} dt$, mas se o que se estuda é o efeito de cocção provocado pelo tratamento então estabelece-se um valor $C = \int_0^t 10^{\frac{T-100}{z}} dt$, tomando como temperatura de referência 100°C e um valor de z adequado (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

Quando se trabalha com alimentos pouco ácidos, de pH <4,5, nos quais o *C. botulinum* não consegue germinar, deixa de fazer sentido tomar este microrganismo como referência, já que o processo se dirige então para a destruição de outros microrganismos que exigem processamentos térmicos menos severos, que originariam valores de F_0 tão pequenos que se tornariam difíceis de interpretar. Nestes casos é mais lógico empregar para quantificar a letalidade do processo o valor de pasteurização P , obtido de forma idêntica aos anteriores, por exemplo para uma temperatura de referência de 65°C e um microrganismo de referência com $Z=10^\circ\text{C}$ pela expressão $P_{65}^{10} = \int_0^t 10^{\frac{T-65}{10}} dt$ (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Stoforos & Taoukis, 2006).

Uma vez estabelecida a ferramenta é então necessário avaliar e decidir se o valor da letalidade do processamento é ou não adequado às necessidades.

Do que tem vindo a ser exposto assume-se que a relação entre o log S e o tempo de processamento é linear obedecendo a uma cinética de reação de primeiro grau. Na realidade tal nem sempre acontece e as curvas podem afastar-se ligeiramente da relação desejada, apesar de na maioria das vezes o seu ajuste a uma recta ser suficiente para garantir resultados considerados satisfatórios a nível industrial (Casp & Abril, 1999).

Para além da carga microbiana inicial, influenciam o bom desenvolvimento e o sucesso do processamento térmico de um género alimentício as condições prévias de vida dos microrganismos presentes, a estrutura e a composição dos substratos que compõe o produto, sendo mais resistentes os microrganismos e ou seus esporos desenvolvidos em condições ideais e a temperaturas próximas do máximo de crescimento, e apresentando as células e esporos mais jovens uma maior sensibilidade ao calor (Mossel *et al.*, 1995; Noronha, 1996; Liu, 2006).

Já relativamente ao efeito da composição do alimento sobre o efeito do processamento térmico, observa-se uma maior resistência quando os valores de a_w são mais baixos e quando o pH é neutro ou próximo da neutralidade, sendo esta uma das razões porque os alimentos devem ser classificados relativamente ao pH antes de se determinar o tratamento térmico que devem receber (Mossel *et al.*, 1995; Noronha, 1996; Azizi, 2000).

São variadas as formas como pode alcançar-se o aumento da temperatura nos alimentos, pela aplicação de calor seco ou de calor húmido, sendo este último geralmente mais eficiente devido à sua acção penetrante e podendo aplicar-se na forma de vapor ou de água quente. Excepção deverá ser feita para os alimentos gordos, já que a gordura actua como isolante, reprimindo o efeito penetrante do vapor e da água quente (Hubbert *et al.*, 1996; Vicente & Cenzano, 2001; Legarreta, 2006).

Os alimentos sujeitos a processamento térmico vêm pois reduzida a sua carga microbiana de forma significativa, dependendo o grau de redução conseguido da magnitude do tratamento efectuado que é caracterizado pelo binómio tempo/temperatura, podendo optar-se por tratamentos de pasteurização que apenas destroem as formas vegetativas dos microrganismos ou recorrer à esterilização a fim de obter também a destruição das formas esporuladas (Marth, 1998; Azizi, 2000; Liu, 2006).

Como os microrganismos diferem entre si na sua susceptibilidade ao efeito da temperatura é importante, considerar a constituição da flora microbiana presente num determinado alimento, sendo a temperatura óptima para o processamento térmico da carne e dos produtos cárneos estabelecida de modo a, simultaneamente, eliminar a flora saprófita e patogénica, que na maioria dos casos não resiste a temperaturas superiores a 75°C (Hubbert *et al.*, 1996; Legarreta, 2006).

Assim, ao estabelecer a severidade de um processamento térmico tem que se considerar os objectivos específicos que se pretendem alcançar e procurar tratamentos ligeiros que não superem o estritamente necessário para garantir segurança e longevidade aceitáveis, devendo fazer-se uma abordagem integrada que também contemple os efeitos positivos das restantes barreiras existentes no produto (Leistner & Gould, 2002; Beales & Smith, 2004; Legarreta, 2006).

Finalmente, uma vez realizado o tratamento térmico devem ser tomadas medidas estritas de higiene com o intuito de evitar a recontaminação dos alimentos, especialmente por microrganismos saprófitas psicrófilos e microrganismos patogénicos que podem posteriormente desenvolver-se e comprometer todos os esforços anteriormente realizados (Marth, 1998; Rybka-Rodgers, 2001; Peck & Stringer, 2005).

2.2.1.1 - Cocção

Para além do escaldão, pasteurização e esterilização, a cocção é uma das quatro formas de processamento térmico aplicáveis aos alimentos, que tem como principal objectivo melhorar as suas características sensoriais e, acaba por simultaneamente reduzir a carga microbiana presente no alimento e neutralizar a actividade enzimática que nele ocorre (Casp & Abril, 1999; Ranken, 2000; Legarreta, 2006).

Este tipo de processamento pode ser aplicado à escala doméstica como à escala industrial, com a finalidade de produzir uma série de alterações na textura, cor, composição, sabor, digestibilidade e qualidade nutricional dos alimentos de modo a torná-los mais agradáveis, mais bem aceites pelo consumidor, mais seguros e fáceis de conservar (Nicholas, 1995; Varnam & Sutherland, 1995; Ranken, 2000).

A forma como o calor é aplicado aos alimentos no decorrer da sua cocção varia consoante a metodologia utilizada, ao assar, cozer sem água e grelhar aplica-se calor seco, enquanto para cozer ao vapor ou em banho de água é aplicado calor húmido rondando num caso ou noutro, a temperatura de 100°C; já na fritura em banho de óleo as temperaturas empregues são superiores e rondam já os 200°C (Nicholas, 1995; Casp & Abril, 1999; Legarreta, 2006).

Existem hoje diversos equipamentos destinados à cocção de alimentos adequados a diferentes finalidades, como os vários tipos de fornos de ambiente húmido ou seco, que evitam a ocorrência de perdas de substâncias aromáticas e hidrossolúveis que acontecem quando a cocção se realiza directamente por imersão em água quente (Goddard, 1996; Martens, 1996; Legarreta, 2006).

Os primeiros factores a determinarem a aceitação de um produto pelo consumidor, por serem aqueles que mais facilmente são percebidos, são possivelmente a aparência, textura, sabor e aroma, apesar de existir uma tendência actual para um crescente e manifesto interesse por outros atributos menos evidentes como o valor nutricional, a qualidade microbiológica e o modo de produção do alimento (Bauer, 1995; Warriss, 1996; Guerrero & Chabela, 2000).

O facto das reacções de modificação dos factores de qualidade dos alimentos serem muito menos termodependentes do que a destruição dos microrganismos e seus esporos pelo calor, faz com que as temperaturas de cocção sejam mais moderadas e ocorram por períodos de tempo mais alargados, já que o processamento a altas temperaturas por curtos espaços de tempo têm efeitos muito limitados sobre os atributos dos alimentos que se pretendem modificar por acção da cocção (Martens, 1996; Casp & Abril, 1999; Legarreta, 2006).

Como a cor e o sabor dos alimentos são atributos cuja dependência do calor é semelhante à das vitaminas, os processos que preservem estas características respeitam geralmente também a sua integridade, enquanto a textura resulta de um processo bem mais complexo (Nicholas, 1995; Casp & Abril, 1999).

A evolução da textura neste tipo processamento depende em primeiro lugar do facto de este ocorrer em meio húmido ou seco. A cocção de legumes e cereais secos num meio húmido provoca simultaneamente uma migração de humidade e um amolecimento que afecta a textura devido à hidrólise dos constituintes das paredes celulares, dilatação devida à expansão dos gases e alterações na capacidade de retenção de água devidas à gelatinização do amido (Casp & Abril, 1999; Vicente & Cenzano, 2001).

Nos tecidos musculares a influência da temperatura nas alterações da textura é ainda mais complexa devido às reacções de transformação e contracção do colagénio, a que se juntam as alterações que ocorrerem nas próprias proteínas que constituem o músculo (Varnam & Sutherland, 1995; Honikel, 1996; Ranken, 2000).

Se bem aplicado e com o cuidado de prevenir a recontaminação após a confecção culinária, este processamento pode ser visto como uma eficiente forma de conservação da carne, que para além de melhorar a sua digestibilidade inactiva os sistemas enzimáticos, reduz a carga microbiana inicial e destrói toxinas termolábeis que

eventualmente estejam presentes, apesar de eventuais efeitos adversos como a perda de nutrientes e formação de compostos tóxicos resultantes da acção das altas temperaturas sobre os alimentos (Goddard, 1996; Shaw, 1996; Legarreta, 2006).

2.2.2 - Temperaturas baixas

O recurso a baixas temperaturas para a conservação dos alimentos, tem como objectivo principal minimizar as reacções de degradação dos produtos e limitar o desenvolvimento microbiano que neles ocorre (Varnam & Sutherland, 1995; Ranken, 2000; James, 2006).

A constatação de que a diminuição de 10°C na temperatura de armazenamento dos produtos, reduz para metade a velocidade de reacção de uma série de fenómenos e processos fisiológicos, químicos e bioquímicos nos alimentos, e vice-versa, leva naturalmente à dedução de que largos períodos de tempo de conservação são proporcionalmente obtidos mediante a aplicação de cada vez mais baixas temperaturas aos alimentos (Casp & Abril, 1999; James, 1996; Lim *et al.*, 2006).

Por sua vez, a passagem ao estado sólido da água disponível nos alimentos contraria o desenvolvimento dos microrganismos e a ocorrência de reacções químicas, já que ao transformar-se em gelo por acção das baixas temperaturas favorece a estabilidade, apesar de inevitavelmente diminuir sempre, mesmo que pouco, a condição e qualidade original dos alimentos (James, 1996; Reid, 1998; Blond *et al.*, 2006).

Deste modo, a conservação de alimentos a temperaturas suficientemente baixas mas ligeiramente superiores ao seu ponto de congelação, constitui uma eficiente forma de conservação de produtos alimentares detentores de actividade fisiológica como as frutas e os legumes, que naturalmente respiram e transpiram mas também de produtos sem actividade fisiológica como a carne, leite e pratos cozinhados que assim prolongam o seu prazo de validade sem alteração significativa das suas características originais (Reid, 1998; Casp & Abril, 1999; James, 2006).

Ao diminuir a temperatura de conservação limita-se não só o crescimento mas também a composição do microbiota; e como durante a fase lag não se verifica aumento

ou ocorre mesmo uma diminuição no número de microrganismos e como o tempo de geração aumenta de forma proporcional à diminuição da temperatura de refrigeração, é portanto uma boa opção conservar os alimentos a temperaturas ligeiramente superiores à sua temperatura de congelação (Borch *et al.*, 1996; Marth, 1998; Kandeepan & Biswas, 2007).

Já para a conservação de alimentos por períodos de tempo mais alargados a congelação constitui um método muito satisfatório. As baixas temperaturas, geralmente inferiores a -18°C , inibem a actividade microbiana e reduzem a velocidade das reacções ao mesmo tempo que diminuem o a_w devido à transformação da água em gelo, permitindo aos alimentos manter a sua qualidade e valor nutritivo que relativamente aos produtos frescos normalmente apenas se diferencia por alteração na textura (Reid, 1998; Ranken, 2000; Lim *et al.*, 2006).

Tal como se verifica com o resto dos alimentos a velocidade de congelação da carne é importante para garantir a sua qualidade. Se for demasiado lenta vai permitir a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula que vão romper a membrana celular e, posteriormente no processo de descongelação, ocorrem maiores perdas por exsudação; a carne é geralmente, congelada a temperatura inferior ou igual a -30°C e posteriormente armazenada a -18°C (Hubbert *et al.*, 1996; Camou-Arriola *et al.*, 2006; Chabela & Mateo-Oyague, 2006).

Comparativamente a outros sistemas de conservação de alimentos, a conservação a baixas temperaturas obriga à existência de uma cadeia de frio que acompanha obrigatoriamente o produto desde a sua origem ao consumidor final, não ficando asseguradas nem a estabilização química nem a estabilização microbiológica do alimento, pois o efeito do frio é efectivo apenas enquanto o produto se encontra correctamente refrigerado ou congelado (Symons, 1996; Spiess *et al.*, 1998; James, 2006).

A cadeia de frio quando eficientemente montada garante que a todo o momento o produto se encontra correctamente armazenado a temperaturas adequadas, desde imediatamente após a sua produção, durante o armazenamento grossista, distribuição incluindo cargas e descargas e exposição no retalho, constituindo o elo mais fraco desta cadeia o momento que decorre entre a aquisição do produto pelo consumidor, sua

posterior conservação doméstica até ao consumo final que deve ser o mais breve possível (Spiess *et al.*, 1998; Nissen *et al.*, 2002; James, 2006).

A utilização do frio para a conservação de alimentos só é passível de ser considerada em pleno eficiente, quando se possa garantir que a cadeia de frio previamente projectada e desenvolvida de acordo com as necessidades específicas de um determinado produto não é quebrada, algo que só países com determinado nível de desenvolvimento podem garantir permitindo-se recorrer à utilização destas técnicas de conservação de alimentos (Spiess *et al.*, 1998; Wright & Taub, 1998; James, 2006).

Ainda assim, a atribuição de um prazo de validade aceitável para um determinado produto a uma determinada temperatura de refrigeração, deve ser estabelecido e monitorizado de forma a ser garantida a qualidade e a segurança do alimento ao longo de toda a cadeia que vai da produção ao consumo (Symons, 1996; Marth, 1998; Spiess *et al.*; 1998).

Em virtude dos riscos potencialmente existentes de ocorrência de abusos de temperatura no decorrer da manipulação e armazenamento de alimentos refrigerados, a utilização de indicadores ou integradores de tempo-temperatura pode ser uma importante ferramenta para a detecção de situações de abuso comprometedoras da qualidade do produto (Marth, 1998; Wright & Taub, 1998; Blond *et al.*, 2006).

Reconhecendo os próprios produtores a possibilidade de ocorrência de temperaturas abusivas durante a distribuição e armazenamento de produtos conservados pelo frio, muitas vezes já ao nível doméstico, frequentemente inscrevem na embalagem avisos para a necessidade de frio, alertando assim o consumidor (Symons, 1996; Spiess *et al.*; 1998 James, 2006).

2.2.2.1 - Refrigeração

Inicialmente a conservação dos alimentos por refrigeração encontrava-se restringida a zonas onde havia gelo, algo que na maioria dos casos era sazonal a não ser que este fosse convenientemente armazenado em locais apropriados. Só no século passado as metodologias de refrigeração mecânica passaram a ser utilizadas permitindo

a rápida expansão desta forma de conservação de alimentos, tendo a massificação da utilização do frigorífico doméstico para a conservação de produtos frescos sido possível após a electrificação de cidades e vilas (Thevenot, 1979; Hubbert *et al.*, 1996).

A refrigeração dos alimentos tem por finalidade aumentar as suas possibilidades de conservação, podendo apontar-se uma série de outros objectivos particulares directamente relacionados com as características de cada um. Deste ponto de vista é interessante distinguir os alimentos de acordo com a organização da sua estrutura em alimentos sem estrutura organizada como os sumos e o leite, e em alimentos com estrutura organizada como os tecidos animais e vegetais nos quais a refrigeração terá de contemplar objectivos mais específicos (Reid, 1998; Casp & Abril, 1999; James, 2006).

Por exemplo, as frutas e os legumes são organismos vivos e assim devem manter-se durante o seu armazenamento. Nestes casos, a refrigeração procura a diminuição drástica de factores como a intensidade respiratória, perda de peso por transpiração, produção de etileno e o desenvolvimento de microrganismos que deterioram este tipo de alimentos (Spiess *et al.*, 1998; Casp & Abril, 1999; Man, 2002).

Já com arrefecimento das carcaças após o abate do animal influencia-se toda uma série de transformações *post mortem*, responsáveis pela transformação do músculo em carne e com inevitáveis consequências na sua qualidade final (Varnam & Sutherland, 1995; Ranken, 2000; Kandeepan & Biswas, 2007).

Na ausência de refrigeração após o abate, a diminuição do pH pode ocorrer muito rapidamente e trazer consequências para a cor, textura, suculência e crescimento microbiano, proporcionando então condições para a ocorrência não desejada de carnes pálidas, moles e exsudativas (PSE), especialmente em suínos (James, 1996; Reid, 1998; Ranken, 2000).

Mas também um arrefecimento demasiado rápido das carcaças leva a que o músculo entre em *rigor mortis* já contraído resultando em carnes mais duras, como acontece algumas vezes nos músculos superficiais das carcaças de bovinos e de pequenos ruminantes que por serem músculos de menores dimensões e se encontrarem mais expostos arrefecem mais rapidamente, este fenómeno é porém susceptível de ser evitado mediante a estimulação eléctrica das carcaças (Dransfield, 1992, 1996; Taylor, 1996^a).

Após a matança a superfície das carcaças encontram-se em geral húmidas e ainda quentes, condições ideais para a proliferação dos microrganismos que entretanto contaminaram a superfície das carnes; o arrefecimento torna-se então necessário para a sua conservação por períodos de tempo mais alargados (Reid, 1998; Nychas & Drosinos, 2000; Kandeepan & Biswas, 2007).

O arrefecimento das carcaças reduz para além das contagens totais de microrganismos a diversidade da flora microbiana inicialmente presente, favorecendo as baixas temperaturas o predomínio de microrganismos psicotróficos e por sua vez, a desidratação superficial vai diminuir o a_w seleccionando os microrganismos mais tolerantes a baixos valores deste parâmetro que juntamente com o pH baixo, levam a que a flora microbiana seja predominantemente constituída por bactérias psicotróficas, bolores e leveduras que apesar de lentamente se desenvolvem a temperaturas próximas dos 0°C (Nychas & Drosinos, 2000; Zeuthen & Mead, 1996; Ranken, 2000).

Assim sendo, o desenvolvimento microbiano na carne é condicionado principalmente pelo pH, a_w e temperatura, e se ao refrigerar estamos por um lado a diminuir a temperatura já o a_w será influenciado pela humidade relativa a que se processa a refrigeração, torna-se então necessário considerar particularmente cada caso a fim de atrasar o desenvolvimento microbiano e simultaneamente diminuir as perdas de vapor de água (Zbigniew, 1999; Guerrero & Chabela, 2000; James, 2006).

Também o tipo de carne limita a sua capacidade de conservação a baixas temperaturas, é disso exemplo a carne e os produtos à base de suíno que contrariamente à carne de bovino são menos susceptíveis de permanecer, longos períodos em armazenamento, devido ao seu superior teor em lípidos insaturados que oxidam mais facilmente (Reid, 1998; Hubbert *et al.*, 1996; Chabela & Mateo-Oyague, 2006).

No decorrer do processo de refrigeração as carnes transferem para o meio envolvente calor e vapor de água, fenómenos que se não controlados podem trazer prejuízos como a perda de peso com consequências económicas imediatas e a desidratação superficial dos tecidos que para além de prejudicar o aspecto altera a cor da carne, problemas que podem ser obviados mediante uma refrigeração adequada e o controlo simultâneo da humidade relativa (Zbigniew, 1999; Nychas & Drosinos, 2000; Kandeepan & Biswas, 2007).

No arrefecimento de um produto sólido intervêm basicamente dois mecanismos de transferência de calor, no interior do produto a transferência efectua-se principalmente por condução e por convecção da superfície do produto para o meio ambiente refrigerado, sendo certo que durante o seu arrefecimento o calor cedido pelo sólido deverá igualar a variação da sua entalpia (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Camou-Arriola *et al.*, 2006).

Assim, o tempo de arrefecimento de um produto depende em maior ou menor grau dos factores intrínsecos desse produto, geralmente difíceis de alterar significativamente, e dos factores extrínsecos característicos do meio, que dentro de certos limites permitem regular o tempo de arrefecimento mediante a escolha e aplicação da tecnologia adequada (Man, 2002; Earle & Earle, 2004; Camou-Arriola *et al.*, 2006).

Entre os factores intrínsecos dum produto estão a sua forma e a relação entre as suas dimensões, que definem o seu comportamento aerodinâmico e conseqüentemente o valor de distribuição do coeficiente de transmissão de calor superficial ou coeficiente de película, e os parâmetros termofísicos do produto nomeadamente a sua condutibilidade térmica e calor específico que dependem da sua composição e estrutura (Earle & Earle, 2004; Camou-Arriola *et al.*, 2006; James, 2006).

Os factores extrínsecos mais importantes correspondem às características dos próprios sistemas de refrigeração escolhidos. Em primeiro lugar a natureza do agente refrigerante deve ter uma acção exclusivamente térmica e não interferir quimicamente nos atributos qualitativos do produto. Uma vez escolhido o agente refrigerante poderá então actuar-se sobre o coeficiente de película e na temperatura do meio, aumentando o primeiro e diminuindo a segunda a fim de conseguir tempos de arrefecimento curtos (Reid, 1998; Earle & Earle, 2004; James, 2006).

O coeficiente de película depende das características do agente refrigerante seleccionado, é directamente proporcional à sua condutibilidade e inércia térmica, inversamente proporcional à sua viscosidade e aumenta de forma exponencial até determinado limite com a velocidade do fluido refrigerante. Também é influenciado pela direcção do fluxo refrigerante que deve ser tal, que a menor dimensão do produto deve estar perpendicular às linhas de corrente do fluxo (Reid, 1998; Casp & Abril, 1999; Camou-Arriola *et al.*, 2006).

Relativamente à influência da temperatura do meio refrigerante é sabido que a velocidade de arrefecimento dum produto é tanto maior quanto menor forem as temperaturas usadas, porém, este valor encontra-se limitado pelo facto de abaixo de determinados valores de temperatura ocorrer a congelação, que pode provocar danos no alimento com prejuízo directo da sua qualidade (Reid, 1998; Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004).

O recurso ao ar como agente refrigerante é universalmente usado e empregue na quase totalidade dos alimentos sem contudo ser a melhor solução em todos os casos. O arrefecimento dá-se por convecção de calor da superfície do produto através da película de ar que o envolve até uma corrente de ar frio, ao mesmo tempo que no interior do produto a transferência de calor para a superfície se faz por condução. Consegue-se deste modo a máxima velocidade de dissipação do calor aumentando a superfície de exposição e o coeficiente global de transmissão, que depende do coeficiente de película, da espessura e condutibilidade térmica do produto (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Camou-Arriola *et al.*, 2006; James, 2006).

Já no arrefecimento com recurso a água a dissipação do calor é conseguida por convecção forçada através de uma película de água que cobre a superfície do produto. A água tem uma excelente capacidade refrigerante e quando uma corrente de água fria circula rápida e uniformemente pela superfície de um produto quente a temperatura na superfície deste atinge quase instantaneamente a da água, resultado de uma transmissão de calor óptima e de um coeficiente de película elevado devido a uma superfície de exposição máxima (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Camou-Arriola *et al.*, 2006; James, 2006).

Se a velocidade de circulação da água for suficiente, então a resistência térmica da superfície do produto passa a ser desprezível e a dissipação do calor tão rápida quanto a sua chegada à superfície (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Camou-Arriola *et al.*, 2006; James, 2006).

O arrefecimento por imersão ou aspensão de água fria é o que consegue maiores coeficientes de película e portanto a mais rápida forma de arrefecimento para a maioria dos produtos, simultaneamente evita as perdas de peso características dos demais métodos de arrefecimento. Porém, não pode ser universalmente empregue em todos os tipos de alimento e de embalagem, pode tornar-se uma fonte de contaminação

microbiana e exige por isso o cumprimento de normas estritas de higiene, estabelecimento de planos de limpeza de equipamentos frequentes e a necessária renovação da água (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; Camou-Arriola *et al.*, 2006; James, 2006).

Outra forma de arrefecimento possível recorre ao vazio, e consiste em colocar o produto numa câmara onde se reduz posteriormente a pressão a valores suficientemente baixos para que parte da sua água de constituição se vaporize, sendo neste caso o próprio produto quem fornece o calor necessário à mudança de estado, conseguindo-se assim uma diminuição da temperatura (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; James, 2006).

Uma vez conseguido o arrefecimento homogéneo do produto alcançando-se os valores de temperatura pretendidos, inicia-se o processo de armazenamento em refrigeração, recorrendo-se a recintos isolados que facultem as condições necessárias para o prolongamento máximo da vida útil do produto, cabendo ao técnico controlar e ajustar os factores que condicionam o armazenamento (Reid, 1998; Wells & Singh, 1998; Blond *et al.*, 2006).

Deste modo a temperatura de refrigeração deve ser definida em função da natureza dos produtos, do tempo de armazenamento pretendido e permanecer o mais constante possível. Para o efeito, contribuem a projecção racional e a eficiente construção dos equipamentos de frio, não descuidando o seu dimensionamento, isolamento térmico, potência frigorífica associada a mecanismos de regulação da temperatura e uma estiva adequada das mercadorias (Wells & Singh, 1998; Man, 2002; Blond *et al.*, 2006).

A humidade relativa adequada a cada tipo de alimento é variável mas geralmente é definida entre os 85 e os 95%, tendo em consideração que os valores elevados favorecem o desenvolvimento de fungos e a humidade relativa baixa aumenta as perdas de peso na mercadoria. Tal como se faz com a temperatura também se deve zelar pela estabilidade do valor de humidade relativa predefinido, e como é sabido, dependendo a humidade relativa da temperatura, geralmente mantendo a primeira consegue também manter-se a segunda (Man, 2002; Earle & Earle, 2004; James, 2006).

A adequada circulação de ar no interior da câmara frigorífica é também essencial para garantir uma boa transmissão do calor e uma eficiente homogeneização da

temperatura e da humidade relativa no interior do recinto frigorífico, já que o ar constitui o agente de transmissão de calor entre a carga e o evaporador frigorífico montado na câmara, devendo o seu caudal garantir um eficiente intercâmbio térmico (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; James, 2006).

A diferença entre a temperatura máxima na câmara e a temperatura do ar à saída do evaporador corresponde ao designado salto térmico, quanto maior for menor será o caudal de ar necessário mas maior será a variação na temperatura e humidade relativa no interior da câmara, ao que se aconselha no caso dos produtos perecíveis um salto térmico não superior a 3°C (Casp & Abril, 1999; Earle & Earle, 2004; James, 2006).

Note-se finalmente que na prática nem sempre é possível completar a carga de um equipamento frigorífico com um só produto, normalmente por questões económicas torna-se necessário juntar mais do que um tipo de produto, sobretudo nos escalões da distribuição e do consumo. Nestes casos, deve estar presente que nem sempre é viável armazenarem-se todos os tipos de produtos no mesmo recinto pois podem ocorrer incompatibilidades quanto à temperatura, humidade relativa, composição da atmosfera de armazenamento e emissão de compostos voláteis (Spiess *et al.*, 1998; Wells & Singh, 1998; Blond *et al.*, 2006).

2.2.3 - Embalagem

Para chegar até ao consumidor final a grande maioria dos produtos alimentares, independentemente do tipo de processamento que sofrem, passam por uma rede de armazenamento, distribuição e retalho, na qual a embalagem desempenha um importante papel na manutenção da quantidade e qualidade inicial do produto, contribuindo para o alargamento da sua vida útil (Cleland, 1996; Mondry, 1996; Coma, 2008).

As embalagens devem cumprir vários objectivos. Por um lado, devem conferir protecção ao produto, servir de suporte a todas as informações legais e de orientação para o consumidor, por outro serem neutras e não reagirem com o produto, permitirem um manuseamento adequado durante a distribuição, facilitarem a automatização, serem de fácil abertura e nalguns casos também fáceis de voltar a fechar, serem apelativas,

serem capazes de quando necessário resistirem ao processamento térmico, terem um custo adequado às necessidades e serem facilmente recicláveis (Cleland, 1996; Brody, 2000; Ahn & Min, 2007).

Geralmente os produtos cárneos cozinhados são conservados a baixas temperaturas, embalados a vácuo ou em atmosfera modificada. Porém, também podem ser distribuídos não embalados, e além disso, nos estabelecimentos de retalho a divisão do produto em porções menores ou em fatias realiza-se após a abertura da embalagem com a subsequente manutenção do produto restante em atmosfera aeróbia (Varnam & Sutherland, 1995; Hubbert *et al.*, 1996; Ranken, 2000).

Uma vez em aerobiose os produtos cárneos processados e fatiados começam a alterar-se em poucas horas, desidratando-se inicialmente, mudando de cor e perdendo o aroma característico, ao mesmo tempo que simultaneamente se desenvolve uma flora microbiana predominantemente composta pelos géneros *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., mas também por *Pseudomonas* spp. que podem desenvolver-se até valores na ordem dos 5 log ufc/g. Já nos produtos cárneos crus curados, conjuntamente com o desenvolvimento de leveduras, desenvolvem-se também *B. thermosphacta*, *Moraxella* spp., *Psychrobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. (Borch *et al.*, 1996; Guerrero & Chabela, 2000; Ranken, 2000).

O recurso à embalagem a vácuo dos produtos cárneos cozinhados e refrigerados, combinando condições de microaerofilia com a presença de sais de cura e nitritos favorece principalmente o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas psicrotróficas, mas também pode verificar-se um aumento da população de *B. thermosphacta*, especialmente quando a permeabilidade do material de embalagem é elevada (Borch *et al.*, 1996; Brody, 2000; Guerrero & Chabela, 2000).

Introduzida na Europa por volta dos anos 50 do século passado, a embalagem a vácuo tem sido uma das técnicas aplicadas com mais sucesso na conservação, protecção e distribuição de carne e produtos cárneos frescos e processados, sucesso que resultará do facto de se tratar de um método económico, tecnologicamente simples, fácil de aplicar e que permite ao operador avaliar imediatamente a sua boa aplicação (ACMSF, 1993; Humphreys, 1996; Ranken, 2000).

Este tipo de embalagem foi a primeira forma de embalar em atmosfera modificada, porém a sua utilização não é aconselhável em produtos de textura pouco

frime, já que nesses produtos o processo poderá causar deformações irreversíveis com inevitáveis prejuízos de apresentação, sendo nestes casos melhor solução utilizar embalagens termo moldáveis (Blakistone, 1999; Fraqueza, 2006; Ahn & Min, 2007).

O processo de embalagem a vácuo consiste em colocar o produto no interior de uma embalagem com baixa permeabilidade ao oxigénio, da qual é posteriormente retirado todo ar e com isso os 21% de oxigénio nele contido, reduzindo-o em boas condições para um nível inferior a 1%. Simultaneamente procede-se à selagem hermética da embalagem, a fim de prevenir o retorno do ar ao seu interior quando no final desta operação ela é devolvida a condições de pressão atmosférica normais (Humphreys, 1996; Blakistone, 1999; Ahn & Min, 2007).

Os materiais de embalagem mais frequentemente usados pela indústria de carne para esta finalidade são os filmes plásticos flexíveis multilaminares, com os quais se procura condensar num único filme plástico as características específicas de cada uma das suas telas, como sejam resistência física, resistência térmica, permeabilidade específica a gases e capacidade de termo selagem mediante a aplicação de uma combinação de tempo, pressão e temperatura (Stöllman, *et al.*, 1996; Brody, 2000; Komolprasert, 2006).

Posteriormente à selagem, pode proceder-se a uma operação de retracção do material de embalagem pela breve exposição do produto embalado à acção térmica o que permite remover o excesso de material de embalagem e aumentar a sua espessura, tornando-a assim uma barreira mais efectiva, resistente e atraente (Mondry, 1996; Stöllman, *et al.*, 1996; Komolprasert, 2006).

Na carne a aplicação mais frequente desta técnica de embalagem é feita em cortes primários, onde a combinação da acção dos materiais de embalagem impermeáveis com a extracção do ar inicialmente presente limita a quantidade de oxigénio disponível para reagir com a superfície bioquimicamente activa da carne, limitando o desenvolvimento de microrganismos mas alterando também de forma reversível a sua cor, facto que compromete a sua utilização nos cortes mais pequenos praticados no retalho (Humphreys, 1996; Taylor, 1996^b; Ranken, 2000).

A ausência de oxigénio juntamente com a acumulação de CO₂ resultante de alguns processos respiratórios que ocorrem na superfície da carne, consumindo algum oxigénio residual, dão origem a uma atmosfera anaeróbia que se por um lado limita o

desenvolvimento de microrganismos aeróbios como as *Pseudomonas* spp. por outro lado, favorece o desenvolvimento de bactérias anaeróbias ácido lácticas que embora se desenvolvam lentamente vão também deteriorar o produto e originar defeitos organolépticos (Varnam & Sutherland, 1995; Taylor, 1996^b; Ranken, 2000).

Já no que toca aos produtos cárneos processados o problema da cor não se coloca, podendo assim retirar-se maior proveito deste tipo de embalagem a todos os níveis, que vão desde a prevenção do desenvolvimento de microrganismos à prevenção de descolorações, perda de peso por desidratação, oxidação lipídica e manutenção do sabor e do aroma (Blakistone, 1999; Coma, 2006; Ahn & Min, 2007).

Relativamente à utilização em produtos cárneos de outras embalagens com atmosfera modificada, geralmente misturas de CO₂ com N₂ ou outros gases como oxigénio, monóxido de carbono, óxido nitroso e árgon, têm-se obtido comparativamente ao uso da embalagem a vácuo resultados distintos, porquanto alguns autores não reportam diferenças significativas entre os dois métodos, enquanto outros relatam aumentos do prazo de validade na ordem dos 75% (Borch *et al.*, 1996; Taylor, 1996^b).

A este respeito é de notar o facto das altas concentrações de CO₂ poderem causar defeitos na cor, no odor e no sabor, colapso da embalagem, para além de também aumentarem a libertação de exsudados. Por exemplo, a quantidade de exsudado libertado por salsichas tipo Frankfurt embaladas a vácuo ou em atmosfera modificada decresce na seguinte ordem: 100% CO₂> vácuo> 70% N₂ + 30% CO₂> 100% N₂ (Borch *et al.*, 1996; Mondry, 1996; Ahn & Min, 2007).

O recurso a embalagens com atmosfera modificada aumenta o prazo de validade dos alimentos, pois reduz a concentração de oxigénio e ou aumenta a concentração de outros gases como o dióxido de carbono no meio envolvente ao produto. Desta forma inibe o crescimento dos microrganismos saprófitas aeróbios como as *Pseudomonas* spp. mas permite o desenvolvimento de anaeróbios facultativos como as BAL, em que ao contrário do que acontece com os microrganismos saprófitas aeróbios o seu desenvolvimento pode não ser acompanhado por sinais perceptíveis de deterioração do alimento (Taylor, 1996^b; Marth, 1998; Fraqueza, 2006).

O desenvolvimento das BAL é favorecido pelas atmosferas constituídas por CO₂ e N₂ contrariamente ao que se verifica com as Enterobacteriaceae, *B. thermosphacta* e leveduras cujo desenvolvimento é inibido neste tipo de atmosfera, porém, é a

diminuição que ocorre na taxa de crescimento de algumas BAL em atmosfera com maior concentração de CO₂ comparativamente ao verificado em atmosfera aeróbia, o factor que permite alargar a validade de muitos produtos (Borch *et al.*, 1996; Brody, 2000).

A flora ácido láctica de produtos cárneos processados curados embalados a vácuo ou em atmosfera modificada é composta predominantemente por *Lactobacillus* spp. geralmente *L. sake* e *L. curvatus*, e *Leuconostoc* spp. tais como *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum* e *Leuconostoc mesenteroides*, mas também outras BAL têm sido isoladas como por exemplo a *Weissella* [*Lactobacillus*] *viridescens*, *Carnobacterium divergens*, *C. maltaromicus* [*piscicola*] e *B. thermosphacta* (Borch *et al.*, 1996; Guerrero & Chabela, 2000).

Finalmente é de notar que o maior sucesso da conservação de um produto embalado a vácuo ou em atmosfera modificada depende em muito da sua qualidade higiénica e das boas práticas aplicadas ao seu processamento, que propiciem uma carga microbiana inicial tão baixa quanto possível e a permanente manutenção de toda a cadeia de frio a níveis considerados necessários (Stöllman, *et al.*, 1996; Humphreys, 1996; Fraqueza, 2006).

Integrada conjuntamente com métodos assépticos de embalagem, o recurso a atmosfera modificada tem conhecido um grande incremento no sector dos produtos minimamente processados conservados pelo frio, mas ainda assim não garante a completa ausência de perigos, alguns microrganismos patogénicos psicrófilos anaeróbios facultativos ou anaeróbios como o *C. botulinum* tipo E e *Y. Enterocolitica*, podem ser capazes de se desenvolver (Stöllman, *et al.*, 1996; Marth, 1998; Chung *et al.*, 2006).

Este problema agrava-se no caso dos produtos embalados em atmosfera modificada que não sofrem um tratamento esterilizante, em que qualquer esporo de *C. botulinum* que sobreviva pode vir a desenvolver-se em condições de abuso de temperatura e produzir toxinas sem que se notem quaisquer alterações organolépticas que o denunciem (Rybka-Rodegrs, 2001; Nissen *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2006).

2.2.4 - Alimentos processados refrigerados de vida útil prolongada

Os alimentos processados refrigerados de vida útil prolongada, tradução de *Refrigerated Processed Foods of Extended Durability* (REPFEDs), têm vindo a aumentar de popularidade junto dos consumidores ao longo dos últimos anos, respondendo a uma procura crescente de produtos de conveniência, refrigerados, com validade alargada, pouco processados e de elevada qualidade organoléptica (Carlin *et al.*, 2004; Del Torre *et al.*, 2004; Membré *et al.*, 2008).

O estilo de vida actual nos países considerados desenvolvidos reflectiu-se também nos hábitos alimentares, com a crescente procura de alimentos preparados por um cada vez maior número de pessoas sem capacidade nem disponibilidade de tempo para preparar uma refeição a partir dos seus ingredientes básicos no estado natural (Gibney *et al.*, 1989; Hartman *et al.*, 1990; Henry, 1997; Mintz & Du Bois, 2002).

Consequência disso, existe hoje disponível uma grande variedade de produtos que podem classificar-se como REPFEDs, em que a aplicação de um código de boas práticas de fabrico associada à aplicação de um plano pró-activo de segurança alimentar assente nos princípios do HACCP, proporciona uma cada vez maior qualidade e um menor risco para a saúde do consumidor (Cleland, 1996; Rybka-Rodgers, 2001; Nauta *et al.*, 2003).

Para a produção deste tipo de alimentos é usada uma larga variedade de matérias-primas, distintos sistemas de processamento e de embalagem, e como tal é expectável que os produtos apresentem diferentes perfis físico-químicos e microbiológicos após a sua manufactura e durante o seu armazenamento, o que condiciona a sua vida útil durante a qual deve em todos os casos estar garantida a segurança do produto no ponto final de consumo (Betts & Gaze, 1995; ECFF, 1996; Day, 2000).

Assim, os produtos obtidos a partir de ingredientes que são processados termicamente no interior de uma embalagem ou a partir de ingredientes processados termicamente e posteriormente embalados sob condições especiais de higiene definidas como de alto risco, são concebidos para serem isentos de formas vegetativas de microrganismos patogénicos mas não permitem garantir a eliminação total dos esporos não sendo por isso produtos comercialmente estéreis (ACMSF, 1993; ECFF, 1996; Nissen *et al.*, 2002; Peck & Stringer, 2005).

A segurança e a qualidade microbiológica dos REPFEDs assenta geralmente na combinação de um processamento térmico ligeiro, 90°C durante 10 minutos ou outro de letalidade equivalente a uma redução de 6D nas estirpes não proteolíticas de *C. botulinum* tipo B e E, e na subsequente manutenção do produto embalado a temperaturas de refrigeração compreendidas entre os 4°C e os 7°C, combinando algumas vezes a utilização de outros agentes inibitórios a fim de prolongar a fase *lag* de crescimento dos microrganismos por um período de tempo que pode ir de alguns dias até 3 meses (Day, 2000; Rybka-Rodgers, 2001; Rajkovic *et al.*, 2006; Membré *et al.*, 2008).

Havendo o cuidado de evitar recontaminações após o processamento térmico, garante-se a eliminação de microrganismos patogénicos não esporulantes como a *L. monocytigenes*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *C. jejuni* e *Salmonella* spp., e o facto dos produtos estarem embalados a vácuo ou em atmosfera modificada restringe o potencial desenvolvimento de outros microrganismos aeróbios como os fungos cujos esporos também têm capacidade para sobreviver ao processamento térmico (Gould *et al.*, 1995; Franz & von Holy, 1996; Peck & Stringer, 2005).

Por outro lado, favorece-se o desenvolvimento de microrganismos como as bactérias pertencentes aos géneros *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. que constituem o principal perigo microbiológico neste tipo de alimentos, pois são bactérias amplamente disseminadas no ambiente e por isso potenciais contaminantes da maioria das matérias primas, com esporos capazes de resistir ao processamento térmico e cujas características respiratórias lhes permitem posteriormente desenvolverem-se, na ausência de competição com outros microrganismos, nos produtos embalados em condições anaeróbias (ACMSF, 1993; Nissen *et al.*, 2002; Peck & Stringer, 2005).

Sendo bem conhecida a sua actividade como microrganismo saprófita em leite e produtos lácteos, as toxinfecções alimentares provocadas por *B. cereus* são frequentemente colocadas em segundo plano devido à sua pouca expressão, mas não deixa por isso de se tratar de um perigo bem identificado para produtos REPFEDs, agravado pelo facto do seu carácter ubíquo tornar frequente a presença dos seus esporos hidrofóbicos e difíceis de eliminar nas mais variadas superfícies industriais (Gould *et al.*, 1995; Rajkovic *et al.*, 2006; Membré *et al.*, 2008).

Neste contexto o seu controlo passa pela prevenção da recontaminação dos produtos processados e da germinação dos esporos sobreviventes ao processamento térmico, o que se consegue pela manutenção de baixas temperaturas ao longo de toda a cadeia de frio ($< 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou, preferencialmente, $< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), conjugando eventualmente a utilização de conservantes e adequados valores pH e a_w , já que algumas estirpes psicrotróficas desta espécie são capazes de crescer a temperaturas inferiores a 7°C comprometendo o armazenamento prolongado destes produtos (Del Torre *et al.*, 2001; Nauta *et al.*, 2003; Rajkovic *et al.*, 2006)

Já a maior mortalidade associada aos surtos de botulismo faz da presença de *C. botulinum* uma grande preocupação neste tipo de produtos, que não são comercialmente estéreis e portanto capazes de conter esporos deste microrganismo que podem facilmente desenvolver-se especialmente em condições de abuso de temperatura (Gould, 1999; Hyytiä-Trees *et al.*, 2000; Carlin *et al.*, 2004).

Considerando a combinação de factores que caracterizam o processamento e posterior conservação de REPFEDs, verifica-se que embora o desenvolvimento das estirpes proteolíticas de *C. botulinum* esteja limitado pela conservação em refrigeração abaixo dos 10°C , o desenvolvimento das estirpes menos frequentes não proteolíticas e psicrotróficas pode acontecer a temperaturas tão baixas como $3,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ sem que o consumidor se aperceba de alterações no produto que o levem a rejeitá-lo (Betts & Gaze, 1995; Carlin *et al.*, 2004; Del Torre *et al.*, 2004).

Um arrefecimento rápido após o processamento térmico é pois de fundamental importância para a prevenção da germinação dos esporos sobreviventes, o que se consegue diminuindo a temperatura do produto para 10°C em 1 hora ou para 2°C em 3 horas, não deixando porém de ser uma importante preocupação a manutenção das baixas temperaturas ao longo do armazenamento e distribuição, e especialmente já em posse do consumidor final (ECFF, 1996; Hyytiä-Trees *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 2002).

Assim, o “*Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food*”, recomenda um conjunto de procedimentos para garantir a segurança de alimentos tipo REPFEDs relativamente ao potencial desenvolvimento e produção de toxinas por estirpes não proteolíticas de *C. botulinum*, que estão sintetizados no Quadro 2 (ACMSF, 1992; Peck & Stringer, 2005).

De igual forma é aconselhada a avaliação da segurança deste tipo de produtos com base na metodologia HACCP, estabelecendo como pontos críticos de controlo (PCC): Qualidade das matérias-primas; Processamento térmico; Controlo da estanquicidade da embalagem; Controlo da cadeia de frio desde a produção ao consumidor. Nos três primeiros PCCs, podem estabelecer-se medidas de controlo mediante a contagem de microrganismos totais na matéria-prima, controlo do registo dos tempos e temperaturas de processamento térmico, controlo visual da estanquicidade da embalagem; o registo e o controlo das temperaturas ao longo da cadeia de frio até ao consumo final são pouco exequíveis, pelo que deverão ensaiar-se situações extremas e realizar contagens no produto final a fim de prever eventuais problemas (Nissen *et al.*, 2002).

Quadro 2 – Lista de procedimentos recomendados para impedir o potencial desenvolvimento e produção de toxinas por estirpes não proteolíticas de *C. botulinum* em REPFEDs.

1	Armazenar a temperatura $<3\text{ }^{\circ}\text{C}$
2	Armazenar a temperatura $\leq 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e prazo de validade ≤ 10 dias
3	Armazenar a temperatura $\leq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e prazo de validade ≤ 5 dias
4	Armazenar a temperatura de refrigeração $<8\text{ }^{\circ}\text{C}$ combinando processamento térmico de $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos ou letalidade equivalente
5	Armazenar a temperatura de refrigeração $<8\text{ }^{\circ}\text{C}$ combinando pH <5 na totalidade do alimento
6	Armazenar a temperatura de refrigeração $<8\text{ }^{\circ}\text{C}$ combinando com um teor em sal $\geq 3,5\%$ na totalidade do alimento
7	Armazenar a temperatura de refrigeração $<8\text{ }^{\circ}\text{C}$ combinando com $a_w \leq 0,970$ na totalidade do alimento
8	Armazenar a temperatura de refrigeração $<8\text{ }^{\circ}\text{C}$ combinando com o processamento térmico outros factores conservantes que demonstrem consistentemente que previnem o desenvolvimento e produção de toxinas pelo <i>C. botulinum</i>

A segurança microbiológica neste tipo de produtos depende essencialmente da combinação de um processamento térmico mínimo, armazenamento em refrigeração e restrição do prazo de validade, devendo o prazo de validade ser determinado e estabelecido com base na sua formulação e parâmetros de processamento, para condições predefinidas de conservação, reconhecendo-se a vital importância de assegurar a integridade de toda a cadeia de frio a fim de preservar a segurança e qualidade dos REPFEDs (ECFF, 1996; Rybka-Rodgers, 2001; Peck & Stringer, 2005).

As tecnologias a que a indústria pode hoje recorrer permitem já uma larga variedade de REPFEDs disponíveis no mercado. A possibilidade de escolha e a combinação de diferentes tipos de barreira determinam o prazo de validade e as condições de utilização destes produtos. Selecionando e combinando factores como a qualidade das matérias-primas, higiene do processamento, temperatura, a_w , pH, tipo de embalagem, entre outras irão continuar a desenvolver-se novos produtos tipo REPFEDs que quase sempre estarão associados a um elevado grau de inovação (Rybka-Rodgers, 2001; Nissen *et al.*, 2002; Peck & Stringer, 2005).

2.3 - Aditivos e auxiliares tecnológicos

2.3.1 - Importância dos aditivos e dos auxiliares tecnológicos

No Paleolítico o Homem alimentava-se do que caçava ou do que recolhia directamente na Natureza, as fontes de alimentos naturais eram então suficientes para cobrir as necessidades da população (Bellwood, 2001).

Com o progressivo aumento da densidade populacional e a consequente escassez de recursos, o Homem teve necessidade de iniciar o cultivo da terra e a criação de animais. Desde então, verificou-se um formidável progresso científico e tecnológico nestas áreas do conhecimento, que se reflectiu na extrema importância que a indústria de produção de alimentos detém na actualidade (Nickerson & Ronsivalli, 1978).

Na segunda metade do século XX os hábitos alimentares da população mundial sofreram profundas alterações, que foram mais evidentes nos países industrializados

onde passou a haver disponível uma enorme gama de géneros alimentícios já processados (Mintz & Du Bois, 2002).

Da produção de alimentos preparados à escala familiar e distribuídos localmente, evoluiu-se para a produção industrial e distribuição a nível global, tendo-se recorrido a novas tecnologias de processamento e conservação dos alimentos para satisfazer necessidades da vida moderna, como a preparação simplificada de refeições e a permanente disponibilidade de alimentos sazonais (Branen, 1993; Vicente & Cenzano, 2001).

Os alimentos de hoje em dia serão, então, menos naturais, constituindo os aditivos e os auxiliares tecnológicos importantes e imprescindíveis ferramentas necessárias à moderna indústria agro-alimentar, cuja utilização é fonte de inúmeras controvérsias mas sem os quais dificilmente seria possível, embora de forma marginal, controlar o problema alimentar mundial (Hoellinger, 2002).

A massificação da produção e distribuição de alimentos com recurso a aditivos e auxiliares tecnológicos, dos simples vegetais pré-preparados aos complexos pratos pré-cozinhados, implica o recurso a processos tecnológicos que têm de simultaneamente satisfazer os desejos do consumidor, garantir elevados padrões de qualidade e custos económicos compatíveis (Jorgensen, 1982).

O recurso pouco criterioso a estes novos modos de produção de alimentos, indiscriminado, eventualmente abusivo na senda do lucro fácil, originou algumas situações indesejáveis como acidentes tóxicos, consumo inadvertido de produtos oncogénicos e teratogénicos e desequilíbrios ecológicos que algumas vezes atingiram proporções verdadeiramente catastróficas (Oliveira & Guimarães, 1991; Diehl, 2002).

Com a importância que os meios de comunicação social dispensam às implicações sanitárias do consumo de produtos alimentares, gerou-se no consumidor uma atitude crítica de discussão sobre esta problemática, que se reflecte numa preocupação colectiva acerca dos perigos associados ao consumo de alimentos (Chambolle, 2002^a).

Assim, foi-se generalizando a opinião, assente na distinção dicotómica aditivo-alimento, que associa o artificial ao aditivo e o natural ao alimento, implicando esta apreciação que, em oposição ao natural, o artificial é detentor de um carácter de

nocividade prejudicial à saúde do consumidor (Dias, 1989; Parent-Massin & Blanquat, 2002).

Criaram-se assim razões de ordem afectiva mas também política que se têm instalado em diversos sectores da sociedade, e que se reflectem num estado de guerra permanente contra tudo o que é artificial, particularmente se tem a conotação de produto químico, e em defesa do chamado natural sobretudo se for de origem vegetal, esquecendo a verdade insofismável de que muitos dos mais poderosos venenos são de origem estritamente natural e que muitos compostos químicos artificiais, representam verdadeiras conquistas para a Humanidade (Oliveira & Guimarães, 1991).

A autorização legal que permite empregar um determinado aditivo num determinado alimento assenta na evidência da sua inocuidade, que deverá ser testada ao longo de três etapas (Parent-Massin & Blanquat, 2002; Lich & Blanquat, 2002): determinação da dose diária admissível a partir de estudos toxicológicos; avaliação da exposição do consumidor através de estudos de consumo; e avaliação do risco.

No que respeita às doenças transmitidas ao Homem pelos alimentos, os produtos químicos, toxinas naturais dos alimentos, contaminantes químicos, aditivos legais e ilegais, podem causar intoxicações agudas ou crónicas (Soares, 2003).

Muitos aditivos podem ter efeitos verdadeiramente indesejáveis, em doses elevadas alguns são tóxicos, teratogénicos ou oncogénicos e, se bem que as doses empregues nos alimentos estejam muito longe das doses consideradas perigosas fica sempre o receio do efeito cumulativo ou possíveis reacções idiossincráticas notáveis causadoras de efeitos significativos em determinados indivíduos sensíveis (Oliveira & Guimarães, 1991; Parent-Massin & Blanquat, 2002).

Hoje, a dieta da chamada sociedade ocidental contém uma quantidade não desprezível de componentes químicos não nutritivos com diferentes proveniências. Alguns são contaminantes, resíduos de pesticidas ou antibióticos que em qualquer altura foram empregues na produção ou preparação dos alimentos, outros, como as micotoxinas resultam da actividade metabólica de certos microrganismos que se desenvolvem nos alimentos, outros ainda, sob a designação genérica de aditivos alimentares são deliberadamente adicionados aos alimentos com o intuito de melhorar a sua qualidade geral (Chambolle, 2002^b; Hoellinger, 2002).

A utilização judiciousa de aditivos que melhorem o aspecto dos alimentos pode transformar um produto dificilmente aceitável para o consumo humano num alimento agradável, saudável e eventualmente barato. Assim, a indústria alimentar, dadas as solicitações a que está sujeita, não pode dispensar o recurso a este tipo de adjuvantes, ainda que no interesse estrito do consumidor como vem sublinhado nas directivas europeias sobre aditivos alimentares (Parent-Massin & Blanquat, 2002; Escargueil, 2002^b).

Em todo o caso, a utilização de aditivos e auxiliares tecnológicos permite hoje dispor de alimentos mais seguros, contribuindo para toda uma panóplia de produtos alimentares disponíveis no mercado, detentores de melhores qualidades organolépticas e nutricionais (Branen, 1993; Hoellinger, 2002).

São pois, inegáveis as virtudes dos aditivos na preservação dos alimentos tornando-os mais seguros e aumentando-lhes o prazo de validade, período de tempo durante o qual podem estar em exposição e venda com a sua conservação garantida, permitindo diminuir o seu preço (Oliveira & Guimarães, 1991; Mélédié, 2002).

É assim, pouco provável que a Humanidade possa optar mesmo no longo prazo, por produtos alimentares obtidos de forma completamente isenta de produtos químicos artificiais, onde se incluem muitos dos medicamentos, pesticidas, aditivos e auxiliares tecnológicos alimentares vulgarmente utilizados (Oliveira & Guimarães, 1991; Hoellinger, 2002).

De facto, a utilização de muitos dos aditivos alimentares não é uma questão de opção, mas antes uma necessidade mais ou menos premente que nas quantidades em que são empregues, parecem ser de modo geral inofensivos (Oliveira & Guimarães, 1991; Branen, 1993).

Existe hoje por parte de uma larga franja de consumidores modernos e informados, a consciência dos benefícios e da inevitável necessidade de recorrer aos aditivos e auxiliares tecnológicos, sendo condescendentes com a sua utilização desde que devidamente informados e dadas as garantias da sua racional utilização (Chambolle, 2002^a).

2.3.2 - Definição de aditivos alimentares e auxiliares tecnológicos

Os desenvolvimentos verificados nas tecnologias de produção de alimentos têm minorado o recurso à utilização de aditivos alimentares, porém, em determinados alimentos e suas formas de apresentação, continuam a existir vantagens decorrentes da sua correcta utilização (Branen, 1993; Smith & Hong-Shum, 2003).

A utilização consciente dos aditivos alimentares aprovados, continua pois a desempenhar um importante papel na indústria alimentar, providenciando alimentos de conveniência, seguros, com qualidade e prazos de validade adequados às exigências dos produtores, distribuidores e consumidores actuais (Chambolle, 2002^a; Smith & Hong-Shum, 2003).

Os aditivos são substâncias adicionadas aos alimentos em pequenas quantidades no decorrer da sua preparação, com um objectivo preciso de ordem tecnológica, como são os conservantes, edulcorantes, corantes e emulsionantes, ou de ordem nutricional como acontece com as vitaminas, sais minerais e aminoácidos usados em alimentos de regime ou dietéticos (Lindsay, 1993; Escargueil, 2002^a).

Por sua vez, os auxiliares tecnológicos são igualmente substâncias adicionadas aos alimentos em pequenas quantidades no decurso da sua preparação, mas que, ao contrário dos aditivos, não permanecem no produto final, podendo eventualmente persistir de forma residual tecnicamente inevitável, mas não sendo por isso considerados constituintes do produto final (Escargueil, 2002^a).

Os aditivos alimentares têm desta forma um efeito funcional permanente no alimento, enquanto os auxiliares tecnológicos são simples intervenientes no processo de fabrico, cujo efeito é transitório (Escargueil, 2002^a).

Quer os aditivos quer os auxiliares tecnológicos são objecto de regulamentações distintas mas que assentam num mesmo princípio, o da autorização prévia de utilização, vulgarmente designado como princípio da listagem positiva, sendo ilícito utilizar na preparação de géneros alimentícios outros compostos para além dos que constam dessa lista (Branen, 1993; Escargueil, 2002^b; Lich & Blanquat, 2002).

Porém, se um profissional decidir recorrer a uma nova substância, ou empregar uma substância cuja utilização já se encontra autorizada para um determinado género alimentício noutra no qual a sua utilização não está prevista, poderá requerer a sua

utilização às autoridades competentes, mediante a submissão de um dossier que sustente as suas pretensões e demonstre que está garantida a protecção da saúde pública, o interesse dos consumidores e os benefícios para a comercialização (Escargueil, 2002^a; Lich & Blanquat, 2002).

A utilização de aditivos alimentares só se justifica quando um ou vários dos seguintes objectivos não se conseguem atingir por meios práticos e economicamente viáveis, desde que dessa utilização não advenha qualquer perigo para a saúde do consumidor (Dias, 1989):

- Conservar qualidades nutritivas dos alimentos;
- Fornecer ingredientes ou constituintes necessários aos produtos alimentares destinados a fins especiais (dietéticos);
- Aumentar a conservação ou estabilidade dos alimentos sob o ponto de vista higiénico;
- Auxiliar ou melhorar o fabrico, transformação, preparação, embalagem, transporte ou armazenagem dos alimentos desde que a utilização dos aditivos, não seja para disfarçar a incorporação de matérias-primas defeituosas ou práticas indesejáveis, nomeadamente de carácter higiénico.

Nestes 4 grupos de objectivos está praticamente implícita a definição de aditivo alimentar que consta nas Normas Portuguesas NP-1735 (1986) e NP-1736 (1986), e define aditivo alimentar como: *«Toda a substância, tenha ou não valor nutritivo, que por si só não é normalmente género alimentício nem ingrediente característico de um género alimentício, mas cuja adição intencional, com finalidade tecnológica ou organoléptica, em qualquer fase de obtenção, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenagem de um género alimentício, tem como consequência, quer a sua incorporação nele ou a presença de um seu derivado quer a modificação de características desse género»*.

Esta definição não abrange os nutrientes adicionados aos géneros alimentícios com a finalidade de lhes melhorar as propriedades nutritivas, sendo praticamente idêntica à do “*Codex Alimentarius*” e à que consta na Directiva CE referente ao enquadramento geral dos aditivos alimentares (Dias, 1989; Escargueil, 2002^b).

Em conformidade com a Directiva 89/107/CEE, de 21 de Dezembro, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos aditivos que podem ser utilizados nos géneros alimentícios destinados à alimentação humana, por aditivo alimentar entende-se: *«qualquer substância não consumida habitualmente como alimento em si mesmo e habitualmente não utilizada como ingrediente característico na alimentação, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos géneros alimentícios, com um objectivo tecnológico, na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem directa ou indirectamente um componente desses géneros alimentícios»*.

Porém, sobre a inocuidade do recurso a um aditivo alimentar não devem permanecer dúvidas, devendo este obedecer a normas de identificação e de pureza, e estabelecer-se com base em critérios técnicos e toxicológicos fundamentos que permitam decretar qual a quantidade máxima admissível para cada situação (Dias, 1989; Escargueil, 2002^a).

2.3.3 - Enquadramento legal para a utilização de aditivos alimentares

As disposições legislativas relativas aos aditivos alimentares baseiam-se no princípio de que apenas se podem usar os aditivos explicitamente autorizados e nas quantidades permitidas ou, na ausência destas, de acordo com as boas práticas de produção, isto é, a quantidade necessária para conseguir o efeito tecnológico desejado (Branen, 1993; Oliveira, 1996; Parent-Massin & Blanquat, 2002).

A legislação comunitária relativa à autorização e emprego de aditivos alimentares consiste de uma directiva quadro e três directivas específicas, relativas respectivamente aos corantes, edulcorantes e outros aditivos com excepção de corantes e edulcorantes, estando a legislação em matéria de aditivos alimentares completamente harmonizada no âmbito da União Europeia desde o ano de 1995 (Comissão das Comunidades Europeias, 2001).

A Directiva 89/107/CEE do Conselho, de 21 de Dezembro de 1988, visou a aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos aditivos que podem ser utilizados nos géneros destinados à alimentação humana, procurando estabelecer regras comuns que respeitassem o princípio da livre circulação dos géneros alimentícios, através da elaboração de listas de categorias de aditivos alimentares autorizados com base em critérios científicos e tecnológicos admitidos, e o estabelecimento de critérios gerais para a sua utilização.

Esta directiva foi posteriormente alterada pela Directiva 94/34/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de Junho de 1994 e pelo Regulamento (CE) n.º 1882/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Setembro de 2003.

Com base nesta directiva quadro foram adoptadas três directivas específicas pelo Conselho e pelo Parlamento Europeu, requerendo que cada Estado-Membro controle o consumo e a utilização de aditivos alimentares, tendo em consideração o respeito pelo princípio da livre circulação de mercadorias e bens e a protecção e informação do consumidor.

Na União Europeia, de acordo com as Directivas Comunitárias 94/35/CE de 30 de Junho, relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentares; 94/36/CE de 30 de Junho, relativa aos corantes para utilização nos géneros alimentícios e 95/2/CE de 20 de Fevereiro, relativa aos aditivos alimentares com excepção dos corantes e dos edulcorantes, a classificação dos aditivos alimentares é feita por categorias, de acordo com as suas características funcionais tendo em consideração a sua principal propriedade de utilização.

A Directiva 94/35/CE de 30 de Junho, relativa aos edulcorantes, tem como objectivos o estabelecimento de regras comuns de utilização dos edulcorantes nos géneros alimentícios, considerando que a utilização dos edulcorantes em substituição do açúcar permite a produção de alimentos de baixo valor energético, de alimentos que não provoquem cáries ou de alimentos sem açúcares acrescentados, que prolonga o período de conservação dos alimentos através da substituição do açúcar e permite a produção de produtos dietéticos.

Esta directiva foi posteriormente alterada pelas Directivas 96/83/CE de 19 de Dezembro, 2003/115/CE de 22 de Dezembro, 2006/52/CE de 5 de Julho do Parlamento

Europeu e do Conselho e pelo Regulamento (CE) n.º 1882/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Setembro de 2003.

A Directiva 94/36/CE de 30 de Junho, relativa aos corantes para utilização nos géneros alimentícios considera que este tipo de aditivo alimentar é utilizado para tornar mais atractivos e restituir a aparência original aos alimentos cuja coloração foi afectada pelo processamento, armazenamento, embalagem e distribuição, circunstâncias que podem ter prejudicado a sua aceitação visual, ou ainda, para ajudar a identificar sabores associados a determinado género alimentício bem como para dar cor a géneros alimentícios de outro modo incolores.

Esta directiva permanece sem alterações.

A Directiva 95/2/CE de 20 de Fevereiro relativa aos aditivos alimentares com excepção dos corantes e edulcorantes, considerou a necessidade de harmonizar as legislações nacionais no que respeita aos conservantes, antioxidantes e outros aditivos e suas condições de utilização nos géneros alimentícios, e que a razão primeira da existência de regras relativas a estes aditivos alimentares e respectivas condições de utilização deve ser a necessidade de proteger o consumidor, e que tendo em atenção as informações científicas mais recentes sobre essas substâncias, devem algumas delas ser admitidas apenas em determinados géneros alimentícios e sob certas condições de utilização estabelecendo regras estritas para a sua utilização.

Esta directiva foi posteriormente alterada pelas Directivas 96/85/CE de 19 de Dezembro, 98/72/CE de 15 de Outubro, 2001/5/CE de 12 de Fevereiro, 2003/52/CE de 18 de Junho, 2003/114/CE de 22 de Dezembro, 2006/52/CE de 5 de Julho e pelo Regulamento (CE) n.º 1882/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Setembro de 2003.

O controlo da ingestão de aditivos deve concentrar-se em descobrir se a exposição dos consumidores a quaisquer aditivos alimentares excede regularmente a DDA (**D**ose **D**iária **A**dmissível), devendo essa informação ser utilizada no sentido de determinar eventuais medidas necessárias para assegurar que o aconselhamento em termos de segurança está a ser respeitado (Comissão das Comunidades Europeias, 2001).

Assim, sempre que um aditivo não apresente alguma toxicidade estabelece-se uma DDA não especificada, ficando a sua utilização apenas limitada pelas boas práticas

de fabrico dos produtos em que se aplica considerando-se como teor máximo *Quantum satis* (Oliveira, 1996; Parent-Massin & Blanquat, 2002).

Nos casos em que o aditivo apresenta alguma toxicidade e que seja possível estabelecer uma relação dose/resposta, desde que a toxicidade revelada não seja do tipo genotóxico nem teratológico, pode estabelecer-se uma DDA específica, dependendo assim a utilização de um aditivo do seu respectivo tipo e grau de toxicidade (Oliveira, 1996; Parent-Massin & Blanquat, 2002).

Se os aditivos têm uma DDA, significa que os estudos realizados permitiram reconhecer alguma toxicidade, sendo a DDAs estabelecidas de forma inversamente proporcional à toxicidade reconhecida ao aditivo, limitando conseqüentemente a quantidade de aditivo que se pode utilizar e o número de alimentos nos quais é autorizada a sua aplicação (Oliveira, 1996; Parent-Massin & Blanquat, 2002).

Por fim, a utilização de um aditivo que não tenha sido bem estudado do ponto de vista toxicológico não é permitida, a menos que o seu uso generalizado o tenha já consagrado como seguro (Oliveira, 1996; Parent-Massin & Blanquat, 2002).

Deve ser dada especial atenção à ingestão de aditivos alimentares por crianças, pois há dados que sugerem que os seus hábitos alimentares podem traduzir-se numa ingestão de determinados aditivos expressa em termos de peso corporal, marcadamente superior à dos adultos, devendo por isso a avaliação da ingestão de aditivos ser feita separadamente (Comissão das Comunidades Europeias, 2001).

A utilização de aditivos alimentares deve constar sempre da informação contida na rotulagem aposta na embalagem dos alimentos, em conformidade com a sua categoria e menção do nome ou do E-número (Escargueil, 2002^b).

As regras específicas sobre a rotulagem de aditivos nos géneros alimentícios constam na Directiva 2000/13/CE de 20 de Março relativa à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios, e do Regulamento (CE) n.º 50/2000 de 10 de Janeiro, relativo à rotulagem dos géneros alimentícios e ingredientes alimentares que contêm aditivos e aromas geneticamente modificados ou produzidos a partir de organismos geneticamente modificados.

Todos os aditivos autorizados têm de preencher os requisitos estabelecidos no que respeita a critérios de pureza (Lich & Blanquat, 2002).

A determinação desses critérios, bem como a elaboração de métodos de análise e de amostragem são questões técnicas confiadas à Comissão, que nesse sentido adoptou as seguintes Directivas:

Directiva 95/31/CE, de 5 de Julho, que estabelece os critérios de pureza específicos dos edulcorantes que podem ser utilizados nos géneros alimentícios, alterada pelas Directivas 98/66/CE de 4 de Setembro, 2000/51/CE de 26 de Julho, 2001/52/CE de 3 de Julho, 2004/46/CE de 16 de Abril e 2006/128/CE de 8 de Dezembro.

Directiva 95/45/CE, 26 de Julho, que estabelece os critérios de pureza específicos dos corantes que podem ser utilizados nos géneros alimentícios, alterada pelas Directivas 99/75/CE de 22 de Julho, 2001/50/CE de 3 de Julho, 2004/47/CE de 16 de Abril e 2006/33/CE de 20 de Março.

Directiva 96/77/CE, de 2 de Dezembro, que estabelece os critérios de pureza específicos dos aditivos alimentares com excepção dos corantes e dos edulcorantes, alterada pelas Directivas 98/86/CE de 11 de Novembro, 2000/63/CE de 5 de Outubro, 2001/30/CE de 2 de Maio, 2002/82/CE de 15 de Outubro, 2003/95/CE de 27 de Outubro, 2004/45/CE de 16 de Abril e 2006/129/CE de 8 de Dezembro.

A primeira tentativa no sentido da obtenção de uma perspectiva global da ingestão de aditivos alimentares no âmbito do regime alimentar na União Europeia, ainda que com resultados que devem ser encarados apenas como uma indicação muito preliminar, evidenciou que a ingestão da maioria dos aditivos alimentares actualmente permitida no âmbito da União Europeia se encontra abaixo da dose diária admissível (DDA) estabelecida pelo Comité Científico da Alimentação Humana (Comissão das Comunidades Europeias, 2001).

Também de acordo com dados de proveniência Norte Americana (Food and Drug Administration) os aditivos alimentares sendo a área mais controlada, aparecem em último lugar entre as cinco principais causas de risco associadas ao consumo de alimentos, depois das toxinfecções alimentares, malnutrição, contaminantes ambientais e resíduos de pesticidas (Dias, 1989).

A legislação comunitária referida neste ponto pode eventualmente já ter sido alterada.

2.3.3.1 - Utilização de aditivos alimentares em produtos cárneos

Para o processamento tecnológico dos mais variados tipos de produtos cárneos, sempre se recorreu para além das matérias-primas, à adição de condimentos e aos aditivos alimentares (Colaço do Rosário, 1989; Hammer, 1992; Hultin, 1993; Lindsay, 1993)

Nestes últimos, estima-se que o nitrato de potássio (KNO₃) é usado há mais de 4.000 anos, por existir naturalmente como contaminante no sal proveniente dos desertos (Durand, 2002).

Actualmente, são em número elevado os condimentos e aditivos utilizados na indústria transformadora de carnes, desempenhando funções no âmbito da conservação, transformação pigmentar, melhoria das qualidades organolépticas e aumento de rendimento (Colaço do Rosário, 1989; Hultin, 1993).

Da súmula de aditivos permitidos na generalidade dos produtos alimentares destinados ao consumo humano, que pode ser extraída da legislação comunitária actualmente em vigor, apenas um número restrito é especificamente utilizado na preparação dos produtos cárneos (Quadro 3).

Porém, a utilidade destes aditivos depende da natureza e qualidade das matérias-primas, dos processos tecnológicos utilizados e do produto final, não podendo servir para mascarar defeitos, processos tecnológicos inadequados ou falta de higiene, que se aplicados correctamente diminuem muito a necessidade do recurso a aditivos, como acontece com os nitritos e os fosfatos (Durand, 2002).

A carne e os produtos cárneos são susceptíveis de sofrer alterações na sua qualidade por efeito quer dos microrganismos quer da oxidação, sendo desejável a utilização de aditivos alimentares, se possível de origem natural, que contrariem simultaneamente a acção negativa destes dois efeitos (Kanatt *et al.*, 2008).

A utilização de conservantes nos produtos cárneos, contraria o desenvolvimento de microrganismos em consequência do ambiente desfavorável criado no alimento, modificando frequentemente o pH ou a pressão osmótica, exercendo uma acção bactericida ou bacteriostática (Hubbert *et al.*, 1996).

Quadro 3 - Aditivos permitidos na carne e produtos cárneos excepto corantes e edulcorantes*.

Nome	Género alimentício	Condições de utilização
Antioxidantes		
E 300 – Ácido ascórbico**	Preparados de pré-embalados de carne fresca picada, <i>foie gras</i> , carne salgada, enchidos curados, produtos em peça curados, enchidos de sangue, produtos cozidos, torresmos, banha, gordura de porco fundida e sebo.	<i>Quantum satis</i>
E 301 – Ascorbato de sódio**		
E 302 – Ascorbato de cálcio**		
E 330 – Ácido cítrico		
E 331 – Citratos de sódio		
E 332 – Citratos de potássio		
E 333 – Citratos de cálcio		
Conservantes		
E 200 – Ácido sórbico (a)	Carnes curadas ou enchidos curados, produtos cozidos. Recheios de <i>ravioli</i> e produtos similares, revestimentos gelatinosos de produtos cárneos (cozinhados, curados ou secos), pastas de carne.	<i>Quantum satis</i> (a) e (b) apenas em tratamentos de superfície
E 202 – Sorbato de potássio (b)		
E 203 – Sorbato de cálcio		
E 249 – Nitrito de potássio**	Carne salgada, enchidos curados e produtos em peça curados.	Máx. 75 mg/kg, estemes ou em mistura expresso em NaNO ₂ desde que veiculados com sal.
E 250 – Nitrito de sódio**	Não admissíveis em farinheira ou alheira.	Máx. 150 mg/kg, estemes ou em mistura expresso em KNO ₃
E 251 – Nitrato de sódio**		
E 252 – Nitrato de potássio**		
E 235 – Natamicina	Enchidos curados e produtos em peça curados.	Máx. 1,2 mg/dm ² de superfície dos invólucros ou peça.
E 220 – Dióxido de enxofre	<i>Breackfast sausage Burger-meat</i> com um teor mínimo de 4% de cereais e ou outros vegetais, <i>Longaniza</i> fresca e <i>Butifarra</i> fresca, salsicha fresca.	Máx. 450 mg SO ₂ /kg e referem-se às quantidades totais, de todas as origens.
E 221 – Sulfito de sódio		Um teor de SO ₂ não superior a 10 mg/kg ou 10 mg/l é considerado inexistente
E 222 – Hidrogenossulfito de sódio (bissulfito de sódio)		
E 223 – Metabissulfito de sódio		
E 224 – Metabissulfito de potássio		
E 226 – Sulfito de cálcio		
E 227 – Hidrogenossulfito de cálcio (bissulfito de cálcio)		
E 228 – Hidrogenossulfito de potássio (bissulfito de potássio)		

Nome	Género alimentício	Condições de utilização
Emulsionantes, Estabilizadores e Reguladores de Acidez		
E 270 – Ácido láctico	Carne picada fresca ou congelada, salsichas frescas, enchidos curados, produtos curados em peça e produtos cozidos.	<i>Quantum satis</i>
E 325 – Lactato de sódio		
E 326 – Lactato de potássio		
E 327 – Lactato de cálcio		
E 339 – Ortofosfato de sódio	Enchidos curados, produtos curados, produtos cozidos, enchidos de sangue.	Máx. 6,5 g/kg estremes ou em mistura expresso em P ₂ O ₅
E 340 – Ortofosfato de potássio		Máx. 6,5 g/kg estremes ou em mistura expresso em P ₂ O ₅
E 450 – Difosfatos (dissódico, trissódico, tetrapotássico)		<i>Quantum satis</i>
E 451 – Trifosfato de sódio, de potássio		<i>Quantum satis</i>
E 452 – Polifosfato de sódio, de potássio		Máx. 6,5 g/kg estremes ou em mistura expresso em P ₂ O ₅
E 575 – Glucono -delta-lactona		<i>Quantum satis</i>
E 260 – Ácido acético		<i>Quantum satis</i>
Intensificadores de sabor		
E 621 – Glutamato monossódico	Carnes picadas, salsichas frescas, carne salgada, enchidos curados, produtos em peça curados, enchidos de sangue, produtos cozidos	<i>Quantum satis</i>
E 626 – Ácido guanílico		
E 627 – Guanilato dissódico		
E 628 – Guanilato dipotássico		
E 629 – Guanilato de cálcio		
E 630 – Ácido inosínico		
E 631 – Inosinato dissódico		
E 633 – Inosinato de cálcio		

*Adaptado da Directiva 95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Fevereiro de 1995.

Também os antioxidantes desempenham um importante papel na indústria transformadora de carne, por permitirem contrariar a baixa estabilidade oxidativa deste tipo de produtos, controlando ou minimizando a rancificação ao longo do seu processamento e armazenamento (Gray *et al.* 1996; Nissen *et al.* 2004).

Por fim, independentemente das designações dadas aos alimentos (artesanal, à antiga, indicação de proveniência, etc.), o recurso criterioso à utilização de aditivos

alimentares tanto poderá ser feito pelo pequeno artesão como pela grande indústria transformadora de carne (Durand, 2002).

2.3.3.1.1 - Nitratos e nitritos

Juntamente com o sal, os nitratos e os nitritos são fundamentais para a cura dos produtos cárneos e usados empiricamente desde tempos ancestrais, inicialmente pelos povos da Ásia Central (Tompkin, 1993; Durand, 2002; Honikel, 2007).

Na Idade Média o recurso à cura como técnica de conservação expandiu-se, mas só Polenski em 1891 demonstrou que na carne os nitratos eram reduzidos a nitritos. Lehman e também Kisskalt em 1899 atribuíram aos nitritos a responsabilidade pela característica cor rosada dos produtos curados, depois explicada por Haldane em 1901. Posteriormente, em 1910, Hoagland demonstrou que não era o anião de nitrito a reagir com a mioglobina, mas antes o ácido nitroso (HNO_2) ou um metabolito tipo NO (Shahide *et al.*, 1994; Durand, 2002; Honikel, 2007, 2008).

Os nitratos e nitritos de sódio e de potássio, pertencem ao grupo dos aditivos azotados permitidos nos produtos cárneos, de acordo com as especificações da legislação portuguesa, e que englobam também o corante vermelho de beterraba, o conservante natamicina e os intensificadores de sabor glutamato monossódico, ácidos guanílico e inosínico e os seu respectivos sais dissódicos, dipotássicos e de cálcio (Ferreira *et al.*, 1994; Oliveira, 1996).

O azoto gasoso tal como existente na atmosfera é uma molécula inerte à temperatura ambiente, porém, o átomo de azoto é um dos elementos químicos que mais pode variar o seu estado de oxidação, sendo os compostos de azoto/oxigénio especialmente importantes para os processos de cura da carne (Honikel, 2008).

Devido à sua camada externa composta por 5 electrões (s^2p^3), o átomo de azoto tanto pode receber 3 electrões adicionais passando à forma oxidada N^{3-} como acontece na amónia (NH_3) ou nas aminas, como pode libertar 5 electrões passando à forma reduzida N^{5+} como acontece no nitrato (NO_3^-) (Honikel, 2008).

Por si só, os nitratos de sódio ou de potássio não influenciam a cor da carne, tornando-se apenas eficientes após serem reduzidos a nitrito, fenómeno que apenas acontece em produtos que não têm processamento térmico imediatamente após a sua manufactura, justificando-se assim a sua não utilização em produtos cárneos processados termicamente (Hubbert *et al.*, 1996; Tarté & Amundson, 2006; Honikel, 2007).

Os iões de nitrato funcionam como precursores dos iões nitrito, dissociam-se facilmente em meios ricos em água de constituição e o nitrato reduz-se a nitrito por acção enzimática das nitrato-reductases, produzidas pelos microrganismos naturalmente existentes na carne ou adicionados intencionalmente sob a forma de fermentos, o que torna a sua utilização distinta da forma de utilização dos nitritos, como acontece em muitos produtos cárneos curados crus (Hubbert *et al.*, 1996; Durand, 2002).

O nitrato ou salitre teve uma enorme preponderância na indústria de carnes, que actualmente é ocupada pelo nitrito por ser este que realmente intervém no processo de cura. Porém, o facto de o nitrato poder passar a nitrito por via enzimática e microbiana, faz com que ainda seja usado em mistura com o nitrito, constituindo assim uma reserva adicional que permite a posterior formação de nitritos (Ferreira *et al.*, 1994).

O ião nitrito é relativamente estável e pouco reactivo, mas por sua vez o ácido nitroso é extremamente reactivo e instável, reagindo consigo mesmo e com outros compostos para formar poderosos agentes nitrosantes (Barnett & Hie-Joon, 1998).

Da observação da Figura 2, constata-se que em meio ácido, a partir do nitrito pode originar-se ácido nitroso na forma anídrica, que vai permanecer em equilíbrio com os óxidos NO e NO₂ (Honikel, 2008).

Será o óxido nítrico (NO) que vai reagir com a mioglobina ou com os aminoácidos detentores de grupos sulfidrílo (SH), em geral a cisteína ou o glutatião, enquanto o óxido nitroso (NO₂) reage com a água dando origem a uma nova molécula de ácido nítrico e outra de ácido nitroso (Tarté & Amundson, 2006; Honikel, 2007, 2008).

Mediante esta sequência de reacções o nitrito ou o ácido nitroso, estado de oxidação N³⁺ é oxidado para ácido nítrico com estado de oxidação N⁵⁺, enquanto o NO bem como os restantes intervenientes na reacção tendo-se reduzido passaram ao estado de oxidação N²⁺ (Honikel, 2008).

Quando a pressão de O₂ é baixa a mioglobina mantém o ião de ferro no estado ferroso (Fe²⁺), o que confere uma cor vermelho escura ou púrpura à carne, mas se exposta a níveis mais elevados de oxigénio a mioglobina passa por oxigenação à forma de oximioglobina, detentora de uma cor desejável vermelho brilhante. A mais baixos níveis de oxigénio verifica-se a oxidação da mioglobina, espontaneamente por autoxidação ou por via enzimática, passando a metamioglobina com o ião de ferro no estado férrico (Fe³⁺) e cor castanho ou cinzento acastanhada (Osawa, 1995; Eburne & Prentice, 1996).

A mioglobina pode assim ocorrer no músculo em três estados distintos, conforme no seu cofactor heme, o ferro se encontre no estado ferroso ou férrico e se apresente ligado a diferentes ligandos (Honikel, 2008).

Enquanto o oxigénio se liga apenas ao ferro no seu estado ferroso, outros como o cloro (Cl⁻) e a água ligam-se apenas ao ferro no seu estado férrico devido à baixa carga do ferro hémico. Porém, muitos outros compostos reactivos como o cianeto (CN⁻), o monóxido de carbono (CO), a amónia (NH₃) e o óxido nítrico (NO) ligam-se independentemente da forma em que se encontra o estado de oxidação do ião de ferro, resultando nas diferentes cores que esta cromoproteína pode exibir (Fraqueza, 2006).

A cor rosada característica das carnes curadas é um dos importantes efeitos dos nitritos nos produtos cárneos, que resulta de uma série de complicadas reacções que no final levam à formação do pigmento nitrosil-hemocromogénio no seio da nitrosomioglobina (NO-mioglobina) (Shahide *et al.*, 1994; Borch *et al.*, 1996; Tarté & Amundson, 2006; Honikel, 2007, 2008).

Esta cor tão desejável provem da reacção entre a mioglobina e o nitrito, já que a mioglobina de cor vermelha é oxidada com o auxílio do nitrito em metamioglobina de cor castanha. Por sua vez, a metamioglobina forma posteriormente um complexo com o nitrito que depois é reduzido a NO-mioglobina de cor vermelha (Barnett & Hie-Joon, 1998; Tarté & Amundson, 2006;).

Mediante a acção de enzimas redutoras ou através de reacções químicas com agentes redutores como o ascorbato e o eritorbato, o ião de ferro passa do seu estado férrico ao estado ferroso, possibilitando ao NO formado a partir do N₂O₃, ligar-se à mioglobina e formar uma NO-mioglobina termicamente estável, contrariamente ao que

se verifica com a oximioglobina que não sendo termicamente estável se dissocia e atribui à carne uma cor parda, castanho acinzentada (Barnett & Hie-Joon, 1998; Honikel, 2008).

Quando a carne é cozida, a globina desnatura a um nível que depende da temperatura final e do pH do tecido muscular, resultando a cor final do pigmento hémico quer do estado de oxidação do ião de ferro e quer da molécula do ligando presente (Brewer, 2004; Fraqueza, 2006).

A globina nativa poderá manter o ferro na sua forma reduzida quando no cozimento a sua desnaturação permite a conversão de Fe^{2+} a Fe^{3+} , o que acontece caso um ligando com grande afinidade para o grupo heme não esteja presente e conjugado a uma forte acção redutora e estabilizadora (Brewer, 2004).

É a acção do calor que desnatura a parte proteica da molécula NO-mioglobina, mas o anel de NO-porfirina denominado de nitrosil-hemocromogénio forma um pigmento rosa estável que contém duas ligações óxido nítricas, que persiste e que pode ser encontrado em produtos processados até aos 120°C (Shahide *et al.*, 1994; Barnett & Hie-Joon, 1998; Honikel, 2008).

Porém, a coloração do nitrosil-hemocromogénio é susceptível de ser alterada por acção microbiana e também se esbate sob acção da luz UV, acontecimento interessante, visto que serve de alerta para o consumidor quanto ao grau de frescura do produto em causa (Honikel, 2008).

O nitrito detém assim de uma enorme importância no seio dos aditivos alimentares empregues na indústria transformadora de carnes, desempenhando funções várias, ao nível da fixação da cor nos produtos cárneos curados, como agente antimicrobiano selectivo, como antioxidante e no desenvolvimento do sabor e aromas típicos dos produtos curados (Colaço do Rosário, 1989; Fonseca, 1991; Ferreira *et al.*, 1994; Honikel, 2007).

É sabido que o nitrato é detentor de uma menor toxicidade relativamente ao nitrito, constituindo perigo apenas se ingerido em dose excessiva ou quando se transforma em nitrito, por acção das nitrato-redutases, que embora ausentes nas células animais são produzidas pela flora microbiana presente nas carnes em processo de cura e também em várias porções do tubo digestivo (Ferreira *et al.*, 1994).

No que diz respeito aos nitritos, o efeito tóxico é bem mais visível, podendo da sua ingestão resultar um quadro de metahemoglobinemia, situação em que a hemoglobina perde a sua capacidade transportadora do oxigénio (Ferreira *et al.*, 1994).

Em regra é aceite que o nitrito é 10 vezes mais tóxico do que o nitrato, sendo a dose letal estabelecida para os humanos de 33-250 mg/kg de peso corporal, quantidade consideravelmente inferior aos 80-800 mg/kg de peso corporal atribuídos ao nitrato (Schuddeboom, 1993).

Por este facto, após a ocorrência de alguns casos letais nos anos 30 do século XX, a Alemanha cedo estabeleceu legislação que impedia a aplicação de nitritos directamente na carne, devendo obrigatoriamente ser aplicados em mistura com o sal em percentagem não superior a 0,6%, contrariamente aos nitratos que continuaram a poder ser aplicados directamente na carne (Honikel, 2007).

Actualmente na Europa a utilização de nitritos e nitratos está limitada a cerca de 150 mg/kg, sendo a utilização de nitratos apenas permitida em produtos não processados termicamente, à semelhança do que se verifica em outros países do mundo em que as legislações têm em consideração que o nitrito é uma substância tóxica e que ao contrário dos outros aditivos, os nitritos não permanecem inalterados no seio do produto ao longo do seu processamento (Honikel, 2007).

A forma mais simples de empregar um agente de cura consiste em cobrir as peças de carne inteiras com o sal de cura que depois lentamente vai penetrando na peça ao longo de várias semanas. Mas, para acelerar o processo, pode-se também recorrer a salmouras em que as peças de carne são submersas ou com as quais são injectadas, sendo ainda mais rápida a cura, quando se adiciona directamente os agentes de cura às massas de carne picada ou cortada em pequenas porções usadas para o fabrico dos enchidos (Honikel, 2007).

Como responsável pela fixação da cor, o nitrito é normalmente utilizado na concentração de 0,6% sob a forma de sal nitritado, dose considerada excessiva por alguns autores que consideram valores entre as 20 de 40 ppm suficientes para uma adequada formação e estabilidade da cor, enquanto outros que consideram tais valores insuficientes contrapondo valores duplos dos citados (Fonseca, 1991).

De notar porém, que nos produtos cárneos curados ou processados termicamente em presença de nitrito, caso este seja empregue em quantidades excessivas, resulta uma mudança de cor para um não desejado esverdeado (Lawrie, 1998).

Como agente antimicrobiano, sempre que por razões tecnológicas ou organolépticas não for possível baixar o pH ou elevar o teor em sal de forma a não comprometer a segurança do alimento relativamente ao *Clostridium botulinum* as opiniões divergem (Jouve *et al.*, 1980). Para alguns autores é garantida a segurança do alimento com o recurso a doses entre as 80 e 100 ppm, outros propõem valores não inferiores a 150 ppm e ainda outros propõem valores nunca inferiores a 250 ppm (Fonseca, 1991; Schuddeboom, 1993; Hubbert *et al.*, 1996).

Contrariamente ao nitrato que pode inclusivamente estimular o desenvolvimento de microrganismos do género *Salmonella*, o nitrito apresenta uma capacidade inibitória do crescimento das Enterobacteriaceae e de *B. thermosphacta*, além de outros microrganismos patogénicos, deixando incólume a flora considerada útil, nomeadamente a flora produtora de ácido láctico que tão importante é nos produtos cárneos fermentados (Fonseca, 1991; Borch *et al.*, 1996).

A cura dos produtos cárneos não processados pelo calor é uma excelente ajuda para a sua posterior conservação pelo frio, pois o emprego de sais de cura inibe o crescimento dos microrganismos psicotróficos tornando os produtos mais estáveis. Porém, como não inibem toda a flora contaminante devem estes produtos ser posteriormente apenas refrigerados e não congelados, sob o risco de se promover a rancificação das gorduras (Hubbert *et al.*, 1996).

Tal como se verifica no caso dos sulfitos com a hemoglobina e a mioglobina, o excesso de nitritos pode conduzir a produtos cárneos com aparência fresca mas não seguros em termos microbiológicos, como demonstrado nos trabalhos de Barnett & Hie-Joon em 1998, que verificaram elevadas contagens totais em salsichas do tipo chinês adquiridas em mercados tradicionais, fortemente coradas e com elevado teor em nitritos, contrariamente ao observado nas que foram adquiridas em supermercados, menos coradas com menos resíduos de nitritos mas, também menos contaminadas.

Como interveniente no desenvolvimento de sabores e aromas, existem também numerosos trabalhos que demonstram através de análise sensorial, a preferência dos

consumidores por produtos curados aos quais foi adicionado o nitrito, ficando por esclarecer qual a dose óptima para produzir esse efeito (Fonseca, 1991).

Esta diversidade de funções juntamente com os potenciais riscos associados ao seu consumo, torna bastante controverso o uso destes aditivos alimentares. Mesmo assim, a sua utilização é ainda bastante frequente quer por não haver sucedâneos adequados, quer por não se encontrarem devidamente esclarecidas as desvantagens associadas à sua utilização (Fonseca, 1991; Schuddeboom, 1993).

Para além da sua toxicidade, outra preocupação com os nitritos, e indirectamente com os nitratos, é o efeito mutagénico e carcinogénico dos nitroso-compostos que resultam das reacções dos nitritos com as amins secundárias, amidas e aminoácidos contidos nos alimentos (Ferreira *et al.*, 1994; Diehl, 2002).

A utilização dos nitritos pode, assim, promover a formação de nitrosaminas, amins consideradas cancerígenas, que segundo alguns autores se formam mediante o contacto do nitrito com amins secundárias em meio ácido, que por serem raras na natureza circunscrevem este fenómeno a casos esporádicos que ocorrerem em produtos próprios para o consumo (Fonseca, 1991).

Porém, em determinadas condições, os nitratos podem também interagir com as amins presentes na carne formando nitrosopirrolidinas, que actuam como precursores de nitrosaminas (Hubbert *et al.*, 1996).

Embora sem rigorosa comprovação epidemiológica, há autores que conotam a ingestão de certos produtos com nitroso-compostos, especialmente as nitrosaminas, com a incidência observada em determinadas regiões de casos de carcinoma do estômago (Oliveira, 1996; Diehl, 2002).

Outros autores referem que nem todas as nitrosaminas possuem efeito cancerígeno parecendo existir algumas com efeito cerostático, facto que permitiria afirmar que a existência de nitrosaminas num determinado produto, não é sinónimo de que ele seja efectivamente cancerígeno (Fonseca, 1991).

As nitrosaminas poderão também formar-se como resultado da reacção de produtos de degradação das proteínas com os nitritos, que podem ser provenientes de produtos alimentares de origem vegetal ou animal a que não foram intencionalmente adicionados, mediante a ocorrência de determinadas condições favoráveis e em que

todos os compostos intervenientes são produtos azotados (Schuddeboom, 1993; Oliveira, 1996).

Na verdade o nível de nitritos permitido para as carnes curadas não deixa mais do que vestígios que não acarretam risco para a saúde do consumidor, além disso o ascorbato e eritorbato, que são geralmente incluídos nas fórmulas de cura, inibem a formação de compostos N-nitroso, pois a N-nitrosação das ligações peptídicas que ocorrem resultam instáveis sendo incapazes de persistir no produto final (Barnett & Hie-Joon, 1998).

Conclui-se assim que, os efeitos positivos resultantes da utilização de nitritos e nitratos nos produtos cárneos sobrepõe-se à reduzida probabilidade de formação de nitrosaminas nestes alimentos, sendo o contributo negativo dado pelo consumo de agentes de cura comparativamente mais baixo em relação ao que acontece com outros géneros alimentícios (Honikel, 2008).

Embora continue a existir controvérsia na utilização de nitritos e nitratos, parece ser muito menos perigoso continuar a utilizá-los do que assumir o risco de toxiinfecções por deterioração dos produtos cárneos caso se abdicasse da sua utilização (Oliveira & Guimarães, 1991).

Do exposto resulta fácil entender que sendo o nitrito uma substância extremamente reactiva, responsável por muitos tipos de reacções que ocorrem nos produtos cárneos, deve necessariamente ser controlada de forma eficaz a sua utilização (Honikel, 2008).

2.3.3.1.2 - Ácido ascórbico e ascorbatos

Os aditivos alimentares ácido ascórbico, ascorbato de sódio e os seus isómeros ópticos ácido isoascórbico e o isoascorbato de sódio, são poderosos agentes redutores usados frequentemente devido à sua acção antioxidante (Figura 4). Dentro destes, os que mais vezes são utilizados pela indústria alimentar são o ácido ascórbico e o ácido isoascórbico que pode também ser designado por ácido eritórbico. (Ash & Ash, 1995;

Durand, 2002; Cuvelier & Martel 2002; Houben & van Dijk, 2002; Serdaroglu & Yildiz-Turp, 2004).

No caso da indústria transformadora de carne estes aditivos são utilizados como coadjuvantes no processo de formação e fixação da cor em produtos cárneos curados, mas também são interessantes no plano da segurança alimentar por contribuírem para uma diminuição da produção de nitrosaminas (Visier, 1980; Barnett & Hie-Joon, 1998; Durand, 2002; Roncalés, 2007; Honikel, 2008).

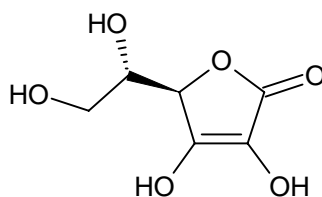


Figura 4 – Fórmula da estrutura da molécula de ácido ascórbico.

Tratando-se de um ácido forte o ácido ascórbico apresenta um pH compreendido entre 2 e 3, é hidrossolúvel e tem pouca estabilidade térmica, sendo susceptível de se degradar e passar a deter acção pró-oxidante na presença de sais de ferro e de outros metais. É pois frequente o recurso ao citrato de sódio e ao ácido cítrico com a finalidade de bloquear a acção antagónica dos metais e assegurar a desejada acção antioxidante (Visier, 1980; Cuvelier & Martel, 2002).

Como agente redutor que é, o ácido ascórbico mesmo não sendo solúvel em corpos gordos proporciona um meio fortemente reduzido que atrasa a formação de peróxidos, favorece a formação da cor nos produtos cárneos e contraria o seu esmorecimento, protegendo a nitrosomioglobina, a nitrosohemoglobina ou simplesmente a mioglobina, oxidando-se preferencialmente a estes pigmentos (Hubbert *et al.*, 1996, Durand, 2002; Houben & van Dijk, 2002; Roncalés, 2007).

Em virtude da sua grande instabilidade, o ácido ascórbico oxida-se facilmente e com frequência origina ácido diacetoglucónico e 2-aceto-1-gulónico, ambos detentores de forte acção oxidante sobre a mioglobina que transformam em metamioglobina. Porém, esta situação pode e deve evitar-se recorrendo-se para isso à utilização dos antioxidantes vitamina E e galato de propilo, que se empregues juntamente com o ácido ascórbico asseguram a estabilidade na cor da carne (Visier, 1980).

No caso dos produtos cárneos curados é de salientar a reacção do ascorbato com o oxigénio para formar dehidroascorbato, que contribui para diminuir a quantidade de nitrito que pode oxidar-se em nitrato (Skibsted *et al.*, 1994).

Mas o ascorbato também parece reagir com o nitrito (ácido nítrico ou NO), ligando-se ao NO remanescente, que por sua vez parece ser capaz de reagir com a carne de forma idêntica à que se verifica com o NO no seu estado livre (Honikel, 2008).

Na verdade, o ascorbato é adicionado com o intuito de reduzir a formação de nitrosaminas, não se encontrando ainda bem esclarecida a sequência de reacções que justificam este facto, mas que pode ficar a dever-se à fixação dos iões NO_2^- e NO livres retardando posteriormente a sua libertação, com a consequente redução nos nitritos residuais nos produtos cárneos (Diehl, 2002; Durand, 2002; EFSA, 2003; Honikel, 2008).

Juntamente com o sal e o nitrito, o ascorbato também se mostra capaz de diminuir na carne e nos produtos cárneos a produção de toxinas pelas estirpes proteolíticas de *Clostridium botulinum* Tipo A (Robinson *et al.*, 1982).

Igualmente é detentor de pequena acção bacteriostática sobre as bactérias saprófitas e os bolores, porém, as quantidades necessárias para que desempenhasse um efectivo papel no controlo dos microrganismos são de tal modo elevadas que conduziriam à adulteração das características do produto (Hubbert *et al.*, 1996).

O ácido ascórbico faz parte da lista de aditivos alimentares com DDA não especificada, considerados aceitáveis para utilizações específicas em quantidades entendidas como sendo as necessárias para se conseguirem os feitos desejados no género alimentício (Comissão das Comunidades Europeias, 2001).

Por fim deve notar-se que, apesar de desempenharem nos produtos alimentares funções tecnológicas idênticas às do ácido ascórbico ou do ascorbato, o ácido eritórbico e o eritorbato não são detentores de idênticas propriedades vitamínicas, sendo por isso interdita qualquer referência à vitamina C na rotulagem dos produtos alimentares em que se recorre à utilização destes aditivos (Cuvelier & Martel, 2002; Durand, 2002).

2.3.3.1.3 - Ácido sórbico e sorbatos

Além de boa viabilidade económica, a sua conhecida e bem compreendida eficiência torna os ácidos orgânicos como o ácido sórbico e os seus sais, sorbatos, os conservantes que mais frequentemente são utilizados na busca de soluções para a conservação de géneros alimentícios (Doores, 1993; Theron & Lues, 2007; Coma, 2008).

O ácido sórbico é um composto natural que foi pela primeira vez isolado em Londres pelo químico alemão por A. W. von Hofmann em 1859, a partir das bagas verdes da Sorveira Brava (*Sorbus aucuparia*), mas só no século seguinte nos finais da década de 30 e início da de 40 se descobriram as suas propriedades antimicrobianas e as suas potencialidades como conservante alimentar (Sofos & Busta, 1993).

Trata-se de um ácido gordo polinsaturado de cadeia curta (Figura 5), que na sua forma pura se apresenta como um pó branco e cristalino, estável e que não se degrada ao longo do tempo, tem um sabor específico e é ligeiramente aromático, sendo muito solúvel em fases gordas e pouco solúvel em água à temperatura ambiente (Visier, 1980; Sofos & Busta, 1993).

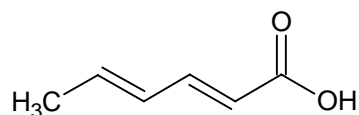


Figura 5 – Fórmula da estrutura da molécula de ácido sórbico.

Trata-se de um dos conservantes mais largamente utilizados na sua forma pura ou de sais, os sorbatos, utilizado principalmente como inibidor do crescimento de bolores e leveduras nos mais variados tipos de produtos alimentares, tais como queijos, produtos de padaria e pastelaria, sumos de fruta, vinho e produtos cárneos (Lindsay, 1993; Sofos & Busta, 1993; Ash & Ash, 1995; Al-Shuibi & Al-Abdullah, 2002).

De entre os sorbatos, destaca-se pela sua boa solubilidade, estabilidade e facilidade de utilização o sorbato de potássio que é a forma mais usada para adicionar ácido sórbico aos alimentos. Porém, esta escolha obriga às respectivas correcções ponderais empregando-se doses 10 a 20% superiores às doses de efeito equivalente em

ácido sórbico (Visier, 1980; Oliveira & Guimarães, 1991; Barreto, 1992; Sofos & Busta, 1993; Thakur *et al.*, 1994; Coma, 2008).

Tal como nos restantes ácidos orgânicos, a acção conservante do ácido sórbico resulta de um equilíbrio dependente do pH, entre a sua forma indissociável neutra e a sua forma dissociada, sendo a primeira aquela que prevalece a pH baixo e que detém maior acção inibitória sobre os microrganismos (Lindsay, 1993; Theron & Lues, 2007).

O pH influencia a capacidade conservante do ácido sórbico, condicionando a quantidade de ácido activo na sua forma não dissociada, que varia entre os 98% a pH 3 e os 0,6% a pH neutro, sendo-lhe reconhecida eficiência de acção conservante até um pH 6,5, valor consideravelmente superior às margens efectivas de pH para os ácidos propiónico e benzóico (Visier, 1980; Sofos & Busta, 1993; Lindsay, 1993).

Verifica-se também que o efeito do ácido sórbico aumenta quando juntamente com este é adicionado sal comum ou açúcar. De facto, em muitos alimentos é prática vulgar adicionar sal juntamente com os ácidos orgânicos, continuando a este respeito aberta uma janela de investigação relativamente ao uso destas misturas e sua acção sinérgica no controlo de microrganismos potencialmente patogénicos (Visier, 1980; Theron & Lues, 2007).

Na realidade são vários os factores que interagem com a capacidade conservante dos sorbatos que é influenciada pela sua formulação, processamento, factores ambientais como os ingredientes, pH, concentração, a_w , temperatura, composição gasosa da atmosfera, embalagem, flora microbiana, e presenças de outros aditivos (Sofos & Busta, 1993).

Geralmente é aceite que a acção inibitória dos ácidos orgânicos reside no facto de estes, na sua forma indissociável, terem a capacidade de atravessar a membrana citoplasmática, e uma vez no interior da célula em condições de pH mais alto se dissociarem, libertando aniões e protões que se tornam tóxicos e inibem as reacções metabólicas dos microrganismos (Theron & Lues, 2007).

Outros mecanismos como o rompimento da membrana citoplasmática e perturbações ao nível da manutenção do pH no interior da célula, têm sido apontados como causas dos efeitos bactericidas e bacteriostático dos ácidos orgânicos, predominando no caso dos sais dos ácidos láctico e sórbico o efeito bacteriostático (Doores, 1993; Theron & Lues, 2007).

O recurso ao ácido sórbico ou aos seus sais em produtos concebidos em boas condições sanitárias e respeitando as boas práticas de fabrico, impede ou atrasa o desenvolvimento de leveduras, bolores e bactérias, mas é susceptível de variar de caso para caso, de acordo com as diferenças verificadas entre os tipos, espécies e estirpes de microrganismos presentes além dos factores ambientais existentes (Sofos & Busta, 1993).

Na realidade o ácido sórbico e os seus sais são principalmente usados pelo seu forte poder antimicótico sendo menos eficientes no controlo de bactérias, caso em que se torna necessária a sua utilização juntamente com outros ácidos orgânicos para se conseguir alargar o espectro de acção do tratamento (Visier, 1980; Coma, 2008).

Porém, a capacidade inibitória da germinação de esporos, levou muitos trabalhos de investigação a abordarem a potencial utilização do ácido sórbico e dos seus sais como agentes antibióticos em produtos cárneos, tendo sido dada especial atenção à sua combinação com baixos níveis de nitritos a fim de também diminuir a formação de nitrosaminas nestes produtos (Sofos & Busta, 1993; Al-Shuibi & Al-Abdullah, 2002)

A acção do ácido sórbico sobre os fungos reside no facto de aparentemente a maioria destes não conseguir metabolizar o sistema dieno α -insaturado da sua cadeia alifática, facto que vai interferir na actividade das desidrogenases celulares responsáveis pela primeira etapa do processo de oxidação lipídica (Lindsay, 1993; Sofos & Busta, 1993).

Este facto não se verifica em relação aos animais superiores que metabolizam o ácido sórbico de forma idêntica à que metabolizam os restantes ácidos gordos, o que justifica a sua baixa toxicidade para o ser humano nas pequenas doses em que habitualmente é utilizado, mas ser eventualmente capaz de desencadear reacções alérgicas e de intolerância em indivíduos sensíveis (Lindsay, 1993; Choi & Chin, 2003; Bourrier, 2006).

De qualquer forma, contrariamente ao verificado com os nitritos e sulfitos, os sorbatos estão dentro do grupo de aditivos alimentares que, considerando a sua ingestão teórica baseada em suposições conservadoras em matéria de consumo alimentar e utilização de aditivos, não excedeu a DDA, tornando desnecessárias preocupações de maior relativamente à utilização deste aditivo (Comissão das Comunidades Europeias, 2001).

O facto de o ácido sórbico se tornar instável em soluções ou incorporado em géneros alimentícios, autoxidando-se, e de os compostos resultantes desta degradação estarem associados a fenómenos de escurecimento não enzimático, sugere a utilização conjunta de aditivos antioxidantes e de embalagens opacas e impermeáveis, a vácuo ou em anaerobiose para acondicionamento de alimentos aos quais se adicionou ácido sórbico (Sofos & Busta, 1993; Thakur *et al.*, 1994; Scotter & Castle, 2004).

É a capacidade inibitória do desenvolvimento de bolores e leveduras que representa a principal mais-valia do ácido sórbico, que pode ser adicionado aos alimentos de variadas formas e que em concentrações entre 0,05 a 0,3% consegue obter os efeitos desejados, na inibição do crescimento de fungos e consequente produção de micotoxinas em alimentos de humidade intermédia e baixo pH (Sofos & Busta, 1993).

Nos produtos cárneos, apesar de não impedir o desenvolvimento dos lactobacilos necessários para a correcta maturação dos enchidos crús, interfere no crescimento dos actinomicetas, microrganismos micelares que desempenham um papel fundamental nesse mesmo processo, não sendo por isso aconselhável a sua adição às massas deste tipo de enchidos (Visier, 1980; Sofos & Busta, 1993).

Contrariamente, no caso do bacon e enchidos cozidos, devido sobretudo à sua acção fungicida e fungiestática é recomendável a impregnação da superfície destes produtos com ácido sórbico; de igual forma se antevê que a sua utilização seja bastante interessante no desenvolvimento de novas tecnologias de embalagem bioactivas (Choi & Chin, 2003; Choi *et al.*, 2005; Coma, 2008).

2.3.3.1.4 - Dióxido de enxofre e sulfitos

Já na Grécia antiga Homero queimava enxofre para desinfectar a sua casa. Desde então, ou talvez ainda antes disso, o dióxido de enxofre (SO₂), tem sido pelas suas propriedades anti-sépticas usado como conservante em diferentes géneros alimentícios, podendo ser aplicado na sua forma gasosa pura ou por intermédio dos seus diferentes sais após dissolução em água (Wedzicha, 1984; Taylor *et al.*, 1986; Machado *et al.*, 2006).

O enxofre é um elemento não metálico que ocorre naturalmente no seu estado livre na forma de rocha em algumas regiões do globo terrestre, sendo o seu dióxido uma

presença constante nas zonas de actividade vulcânica, mas também os sulfitos e os sulfatos podem ocorrer naturalmente (Ough, 1993).

A obtenção de dióxido de enxofre pode conseguir-se entre outras formas através da queima de enxofre elementar, aquecimento de pirites ou redução de gesso, originando um gás incolor de odor sulfuroso e sufocante (Wedzicha, 1984; Ough, 1993).

Devido ao intenso odor que pode ser aparente em alimentos, os sulfitos são em geral empregues como conservantes temporários sendo adicionados primeiramente aos produtos crus ou semi-prontos e removidos durante o processamento pela acção do calor ou do vácuo (Machado *et al.*, 2006).

Por serem mais fáceis de armazenar e de utilizar do que o dióxido de enxofre na sua forma gasosa ou líquida, é preferível trabalhar com os seus sais anidros de sódio ou de potássio, que são extremamente higroscópios, muito hidrossolúveis e que apresentam uma estabilidade crescente quando expostos ao ar na ordem: sulfito > bissulfito > metabissulfito (Ough, 1993).

Entendem-se por agentes sulfitantes ou sulfitos, o SO₂ molecular, os iões sulfito e os sais de sódio, de potássio e de cálcio do sulfito de hidrogénio ou do dissulfito, respectivamente bissulfito e metabissulfito (Knodel, 1997; Machado *et al.*, 2006).

Os agentes sulfitantes são usados como conservantes em géneros alimentícios ácidos, mas também agem como agentes branqueadores inibindo as reacções de escurecimento enzimático e não enzimático e também actuam como agentes antioxidantes e redutores, facto que os torna interessantes para a indústria alimentar comparativamente a outros aditivos (Taylor *et al.*, 1986; Leclercq *et al.*, 2000; Ribera *et al.*, 2001).

Após a incorporação no alimento os agentes sulfitantes são quimicamente equivalentes, por serem todos convertidos às mesmas espécies iónicas ou não iónicas a determinados valores de pH, de força iónica, de concentração não-electrolítica e de temperatura (Wedzicha, 1992; Machado *et al.* 2006).

A química dos sulfitos depende dos múltiplos tipos de equilíbrio entre as várias formas de sulfito e das propriedades nucleofílicas do ião bissulfito, como se pode observar (Figura 6).

O pH do alimento é extremamente importante para a eficiência da utilização do dióxido de enxofre, como acontece, por exemplo, no vinho em que se verifica um aumento de 10 vezes na quantidade de dióxido de enxofre livre quando o valor de pH diminui de 4 para 3 (Ough, 1993).

Em alimentos com pH compreendido entre 3 e 7 existe um predomínio do ião bissulfito (HSO_3^-), mas para valores de pH inferiores a 3 e superiores a 7 o equilíbrio é desviado no sentido de formação de SO_2 molecular e ião sulfito (SO_3^{2-}) (Warner *et al.*, 2000).

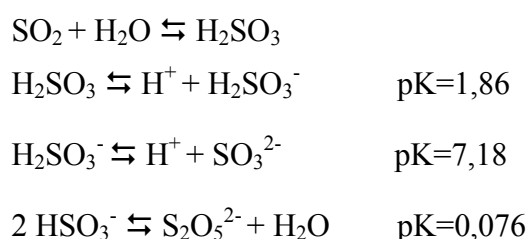


Figura 6 – Diferentes tipos de equilíbrio entre sulfitos (Barnett & Hie-Joon, 1998).

Parte dos sulfitos adicionados a um alimento pode ligar-se de forma reversível ou irreversível a outros compostos presentes na sua matriz, como os aldeídos, cetonas, açúcares, taninos e proteínas, e originam diferentes formas combinadas de sulfitos (Wedzicha, 1984; Machado *et al.* 2006)

A fracção de sulfitos que não se liga a outros compostos do alimento é definida como sulfito livre, e é constituída por um equilíbrio químico dinâmico entre as formas moleculares de SO_2 e os iões SO_3^{2-} e HSO_3^- , constatando-se que a formação de SO_2 é favorecida quando o alimento sulfitado é também acidificado (Fazio & Warner, 1990; Wedzicha, 1992; Machado *et al.*, 2006).

Os compostos hidroxissulfonados resultantes da combinação dos sulfitos com os diferentes componentes dos alimentos, não têm acção antimicrobiana relevante; a inibição do crescimento ou os efeitos letais do ácido sulfuroso sobre os microrganismos são mais intensos quando este se encontra na sua forma não ionizada, apresentando na sua forma livre uma actividade cerca de 30 vezes superior ao verificado na sua forma ligada (Ough, 1993).

O SO₂ é a única forma capaz de atravessar as paredes celulares dos microrganismos, e este facto condiciona a actividade antimicrobiana dos sulfitos que é dependente da forma química em que estes se encontram, e justifica os melhores resultados conseguidos a valores baixos de pH (Taylor *et al.*, 1986; Usseglio-Tomasset, 1992; Wedzicha, 1992).

Como conservantes os sulfitos são usados em vários géneros alimentícios e também na indústria farmacêutica, mas é na conservação de bebidas e frutas que tem a sua principal aplicação, principalmente no controlo de bactérias acéticas, bactérias ácido lácticas, leveduras e bolores prejudiciais cuja presença não é desejável (Ough, 1993; Knodel, 1997; Machado *et al.* 2006).

As bactérias são as mais sensíveis aos sulfitos contrariamente ao que se verifica com os fungos, sendo a eficiência do SO₂ maior no controlo do desenvolvimento de bastonetes Gram-negativos, como *E. coli* e *Pseudomonas* do que na inibição de bastonetes Gram-positivos como os *Lactobacillus* (Wedzicha, 1984; Ough, 1993).

São vários os processos pelos quais o dióxido de enxofre exerce a sua actividade como agente antimicrobiano, por exemplo, através do bloqueio do transporte transmembranar citoplasmático, da inibição da glicólise, da destruição de nutrientes ou da inibição generalizada do metabolismo celular (Ough, 1993).

Na carne existem naturalmente muitos compostos com os quais os sulfitos se podem ligar e que influenciam a sua actividade antimicrobiana, acrescentando o facto de alguns tipos de leveduras contribuírem também para neutralizar indirectamente a acção conservante por serem capazes de produzir determinados compostos ligantes (Visier, 1984; Ough, 1993).

Mesmo assim, a utilização de sulfitos na conservação de produtos cárneos picados permite contrariar o desenvolvimento dos principais microrganismos que costumam desenvolver-se neste tipo de produtos, *Pseudomonas* sp., *Brochothrix thermosphacta*, *Enterococcus* sp., Enterobacteriaceae, *Lactobacillus* e leveduras oxidativas, inibição esta ainda mais pronunciada no caso da *Salmonella* e da *Escherichia coli* (Ough, 1993).

Em carne de cabra picada consegue-se dilatar o prazo de validade de 11 a 13 dias a 7 °C, mediante a adição de 450 ppm de dióxido de enxofre, sem que se alterem as características organolépticas do produto. De igual modo, em carne de vaca picada,

conservada a 0 °C em embalagem permeável ao ar, com a adição de 250 ppm de dióxido de enxofre (Ough, 1993).

No caso de embalagem a vácuo utilizando película impermeável ao oxigénio, consegue diminuir-se a deterioração em salsichas frescas sulfitadas, pois a ausência de oxigénio atrasa o desenvolvimento de leveduras e a consequente produção de substância capazes de se ligar ao enxofre livre, que inibe o crescimento microbiano por maior período de tempo (Adams *et al.*, 1987).

Também adicionando 100 ppm de dióxido de enxofre na forma de metabissulfito a carne de porco enlatada e inoculada com esporos de *Clostridium botulinum*, conseguiu-se atrasar o desenvolvimento das formas vegetativas proporcionalmente à concentração de metabissulfito adicionado (Tompkin *et al.*, 1980).

A preservação da cor e do odor na carne é muito favorecida pela aplicação de sulfitos, que diminuem significativamente ou impedem o desenvolvimento bacteriano à superfície, porém, a principal vantagem da sua aplicação reside no seu poderoso efeito antioxidante (Ough, 1993).

O efeito antioxidante dos sulfitos é parcialmente responsável pela inibição do escurecimento não enzimático e enzimático dos alimentos. Esta capacidade baseia-se na facilidade que os sulfitos têm em sequestrar agentes oxidantes que se formam quando o oxigénio entra em contacto com os alimentos, e de reagir com os compostos intermediários da reacção de Maillard bloqueando assim a produção de pigmentos acastanhados (Wedzicha, 1984; Taylor *et al.* 1986; Swales & Wedzicha, 1992; Machado *et al.*, 2006).

Os sulfitos também podem agir como inibidores de inúmeras enzimas, incluindo polifenoloxidase, ascorbato oxidase, lipoxigenase, peroxidase e enzimas dependentes da tiamina, inibindo directamente as enzimas ou interagindo com compostos intermediários impedindo a sua participação nas reacções enzimáticas (Taylor *et al.* 1986; Iyengar & McEvily, 1992; Warner *et al.*, 2000).

Uma das principais desvantagens da utilização dos agentes sulfitantes em alimentos é a perda da actividade da vitamina B1 (tiamina). A destruição da tiamina ocorre devido a um ataque nucleofílico irreversível do ião bissulfito ao azoto quaternário do anel de tiazol. Além disso os sulfitos também podem agir como

catalisadores de outros nucleófilos que na sua ausência não reagiriam com a tiamina (Wedzicha, 1992; Barnett & Hie-Joon, 1998).

Até há relativamente pouco tempo, o dióxido de enxofre foi reconhecido como um aditivo alimentar cuja utilização era na generalidade reconhecida como segura, porém, relatos acerca do desencadeamento de crises de asma em indivíduos sensíveis a partir de quantidades ínfimas presentes em alimentos levou a que a este respeito se tenha mudado de opinião (Ough, 1993).

São inúmeros os efeitos indesejáveis para a saúde humana que têm sido relacionados com a ingestão de sulfitos, principalmente, anafilaxia, urticária, angiodema, hipotensão, náuseas, irritação gástrica local, diarreia e crises asmáticas em indivíduos sensíveis a sulfitos, sendo variável a quantidade necessária para desencadear reacções adversas em seres humanos (Taylor *et al.*, 1986; Fazio & Warner, 1990; Oliveira & Guimarães, 1991; Añíbarro *et al.*, 1992; Knodel, 1997; Warner *et al.*, 2000).

Os sulfitos livres ou ligados actuam no organismo de forma idêntica, ocorrendo diferenças somente na intensidade e a velocidade com que as reacções de sensibilidade se iniciam (Taylor *et al.*, 1986; Wedzicha, 1992).

Embora os mecanismos envolvidos na manifestação de sensibilidade aos sulfitos ainda estejam pouco esclarecidos, registos clínicos permitiram verificar que certas condições médicas, como a asma severa e dependência de esteróis, estavam associadas a uma predisposição à hipersensibilidade a sulfitos e que o SO₂ era o agente responsável pelas respostas fisiológicas adversas (Knodel, 1997; Warner *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2006).

De qualquer modo, em avaliação realizada pela “*International Agency for Research in Cancer*” os sulfitos foram classificados como pertencentes ao grupo III, isto é, não oferecem risco de carcinogenicidade para humanos (IARC, 1997).

As restrições na utilização dos sulfitos em carne poderão considerar-se excessiva se tivermos em consideração a sua utilização noutros géneros alimentícios, mas a tal facto não será alheia a capacidade que estes têm de actuar sobre a hemoglobina e a mioglobina, formando um complexo S-heme que proporciona a mesma cor vermelho vivo que a oximioglobina, que permite à carne tratada com sulfitos ter sempre a mesma cor independentemente do tempo de armazenamento, podendo assim a carne ser adulterada de modo a parecer sempre fresca (Visier, 1984; Barnett & Hie-Joon, 1998).

3 - Material e métodos

3.1 - A tecnologia tradicional de produção dos Maranhos

A carne que tradicionalmente é utilizada no fabrico dos Maranhos provêm de rezes caprinas adultas, ainda que seja frequente o recurso a carne de ovino adulto, por razões que se prendem provavelmente com sua maior disponibilidade no mercado. Na Figura 7 está representado o diagrama de fabrico dos Maranhos, na sua forma mais simples e tradicional, que não contempla o processamento térmico, pelo que devem ser considerados como produtos de salsicharia fresca.

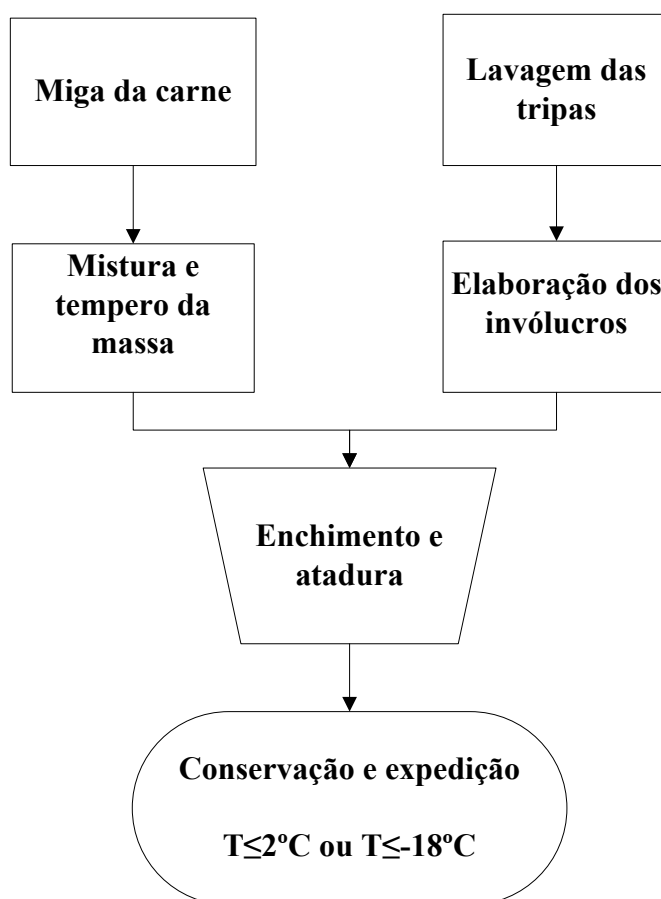


Figura 7 - Diagrama de fabrico dos Maranhos.

É utilizada, de forma indiferenciada toda a carne magra proveniente da carcaça do animal, não existindo qualquer preferência relativamente às diferentes peças anatómicas que a constituem.

Na forma artesanal a miga da carne era realizada manualmente, o que era considerado do ponto uma mais-valia, uma vez que o corte se realizava sem ocorrer esmagamento da carne. Porém, a miga manual torna-se uma operação dispendiosa em mão-de-obra e sujeita a maiores riscos de contaminação que a miga mecânica, pelo que foi sendo abandonada (Sousa & Ribeiro, 1983).

A carne é, então picada de forma grosseira, com recurso a máquinas picadoras que a fragmentam em poliedros de 2-3 cm de aresta.

De igual forma, realiza-se a miga dos restantes ingredientes, toucinho salgado, entremeada salgada, chouriço e por vezes presunto, que são adicionados à massa em quantidades variáveis, dependendo da formulação e disponibilidade de matérias-primas de cada produtor.

A utilização destes ingredientes, além de conferirem melhores características organolépticas aos Maranhos, pode ser uma forma de aproveitamento e de escoamento de produtos como chouriço, presunto e aparas de presunto, apesar de estas terem, já por si, uma mais-valia incorporada.

A preparação da massa prossegue com a adição do arroz cru e dos condimentos que conferem aos Maranhos as qualidades organolépticas que lhe são próprias, sal, hortelã (*Mentha* sp.) e vinho branco, tendo este último ainda a função de facilitar a ligação entre as diferentes partes constituintes da massa.

Após a mistura, procede-se de imediato ao enchimento dos invólucros, pequenos sacos de forma ovalada a cilíndrica, elaborados a partir dos compartimentos gástricos de pequenos ruminantes.

É frequente a utilização de compartimentos gástricos provenientes de rezes ainda jovens por serem as que mais facilmente se encontram disponíveis, o que implica uma menor resistência mecânica dos invólucros, que sendo manifestamente mais frágeis exigem maior cuidado e destreza na sua manipulação.

Os Maranhos são depois comercializados frescos, sob condições de refrigeração ($T \leq 2$ °C), ou congelados ($T \leq -18$ °C), a granel ou embalados individualmente, por vezes a vácuo ou em atmosfera modificada, ou simplesmente hermeticamente selados.

Ao utilizador doméstico cabe a confecção final do produto, que deverá ser cozido em água fervente durante 75-90 minutos, antes de ser consumido.

3.2 - Estrutura do trabalho

Para a realização deste estudo, contou-se com a colaboração de 4 pequenas indústrias de salsicharia tradicional localizadas na região do Pinhal Interior Sul, que acederam em participar nos trabalhos.

O trabalho constou de 2 fases distintas.

Na primeira fase, fez-se o levantamento da formulação, da tecnologia de fabrico, do tipo de embalagem e conservação usadas para produzir e comercializar os Maranhos na sua forma tradicional. Além disso, e com finalidade de caracterizar o produto, recolheram-se de forma aleatória 64 amostras de Maranhos prontos a comercializar, dos quais 32 frescos (NP) e 32 já cozinhados (P).

Posteriormente, tendo em vista a manutenção da qualidade e o alargamento do seu prazo de validade, ensaiaram-se com um produtor seleccionado com base na sua disponibilidade e interesse demonstrado, inovações tecnológicas com recurso ao processamento térmico e utilização de aditivos alimentares.

O estudo incidiu em 4 lotes diferentes de Maranhos, dos quais se acompanhou o processo de fabrico e a evolução ao longo de 28 dias de armazenamento a temperatura de refrigeração (± 4 °C), no que se refere a características físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais.

O Lote 1 (L_1), que serviu de controlo, era composto pelo produto processado termicamente, arrefecido em água corrente fria e embalado a vácuo em saco de polietileno.

No Lote 2 (L₂), o produto processado termicamente foi arrefecido e posteriormente embalado a vácuo em saco de polietileno, numa solução com 2,5% de sorbato de potássio (E202) e 1% de metabissulfito de sódio (E223).

No Lote 3 (L₃), o sal comum (cloreto de sódio) usado na formulação do produto foi substituído por sal nitritado com 1,5% de nitrito de sódio (E250) adicionado em partes iguais de ácido ascórbico (E300); que após o processamento térmico foi arrefecido em água corrente fria e embalado a vácuo em saco de polietileno.

No Lote 4 (L₄), conjugaram-se as alterações preconizadas em L₂ e L₃, o sal comum (cloreto de sódio) usado na formulação do produto foi substituído por sal nitritado com 1,5% de nitrito de sódio (E250) adicionado em partes iguais de ácido ascórbico (E300). Processou-se termicamente o produto que foi depois arrefecido numa solução com 2,5% de sorbato de potássio (E202) e 1% de metabissulfito de sódio (E223), antes de o embalar a vácuo em saco de polietileno.

As análises efectuadas aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, constaram de determinação da temperatura no centro térmico do produto, pH e a_w; análise centesimal, determinação do teor em cloretos, nitritos e sulfitos totais; e determinação do azoto básico volátil total (ABVT), índice do ácido tiobarbitúrico (TBA), índice de peróxidos (IP) e índice de acidez da gordura.

Da análise microbiológica constaram a contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, termotróficos e psicrotróficos; anaeróbios psicrotróficos; bolores e leveduras; bactérias ácido lácticas; Enterobacteriaceae; e *Escherichia coli*. E a pesquisa de esporos de Clostrídeos Sulfito-redutores; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

3.2.1 - Análises físico-químicas

3.2.1.1 - Determinação da temperatura no centro térmico do produto

A determinação dos binómios tempo/temperatura no centro térmico do produto ao longo do seu processamento, foi realizada com recurso a um termómetro digital de oito canais CTF9008 (Ellab A/S, Dinamarca), munido de sondas adequadas para

medição da temperatura no interior do produto e na água em que decorreu o processamento. As temperaturas foram expressas em graus Celsius (°C), e a unidade de tempo usada foi o minuto (min).

3.2.1.2 - Determinação do pH

A determinação do pH foi feita de acordo com a NP-3441 (1990), recorrendo a um potenciómetro portátil HI9023 (HANNA Instruments, Itália) munido de um eléctrodo de perfuração FC230B do mesmo fabricante. O valor do pH obteve-se da média aritmética de duas determinações consecutivas, cumprindo os requisitos de repetibilidade.

3.2.1.3 - Determinação da actividade da água (a_w)

A determinação do a_w fez-se com recurso a um aparelho previamente calibrado, modelo ROTRONIC HYGROSKOP DT (Zurique, Suíça), equipado com uma estação de medida do tipo WA14-TH termicamente estável a 25°C.

3.2.1.4 - Determinação da humidade

A determinação da humidade foi realizada de acordo com a técnica descrita pela NP-1614 (2002), mediante avaliação da perda de massa, até peso constante, em estufa regulada a 103 ± 2 °C. Os resultados foram expressos em percentagem em massa.

3.2.1.5 - Determinação da cinza total

A determinação da cinza total processou-se por via seca, com incineração a uma temperatura entre os 550 ± 25 °C em mufla modelo N3 da Naber Industrieofanbau (Bremen, Alemanha) e posterior determinação da massa do resíduo, conforme o descrito na NP-1615 (2002). Os resultados foram expressos em percentagem em massa.

3.2.1.6 - Determinação da proteína total

A proteína total foi calculada por multiplicação do valor de azoto total pelo factor 6,25 ($P=N\times 6,25$). Na determinação do azoto, usou-se o método de Kjeldhal segundo a NP-1612 (1979), modificada para proceder à mineralização com ácido sulfúrico concentrado num digestor DK6 (Velp Scientifica, Itália), a que se seguia destilação em aparelho UDK 130D (Velp Scientifica, Itália) e a titulação, do amoníaco combinado com o ácido bórico, pelo ácido sulfúrico numa concentração de 0,2 N. Os resultados foram expressos em percentagem em massa.

3.2.1.7 - Determinação da matéria gorda livre

O teor de matéria gorda livre foi determinado pelo método de Soxhlet consoante o descrito na NP-1224 (2002), usando para extracção o resíduo seco e como solvente o éter de petróleo. Os resultados foram expressos em percentagem em massa.

3.2.1.8 - Determinação do valor energético

O valor energético do alimento foi calculado utilizando os factores clássicos de conversão de Atwater: 37 kJ/g lípidos; 17 kJ/g de proteína e 17 kJ/g de hidratos de carbono (Pearson, 1970).

O resultado final obteve-se pelo somatório dos valores parciais de energia fornecidos pelas diferentes fracções energéticas do alimento, tendo o teor em hidratos de carbono sido calculado por diferença relativamente aos restantes constituintes da composição centesimal do produto. Os valores são expressos em kJ/100g de alimento, conforme estabelecido na Directiva 90/496/CE.

3.2.1.9 - Determinação do azoto básico volátil total (ABVT)

O azoto básico volátil total (ABVT), constituído pelo amoníaco e aminas voláteis foi determinado pelo método das células de Conway conforme está descrito na NP-1848 (1987). Consiste na extracção das bases voláteis por meio de uma solução de ácido tricloroacético, seguida de libertação das bases voláteis por alcalinização com carbonato de potássio, recepção numa solução de ácido bórico e titulação com solução de ácido clorídrico com uma normalidade de 0,02 N. Os resultados foram expressos em mg de NH_3 /100g de produto.

3.2.1.10 - Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)

Para determinar o índice do ácido tiobarbitúrico (TBA), pesaram-se 15g de amostra ($\pm 0,001\text{g}$), e extraiu-se o aldeído malónico com uma mistura de ácido tricloroacético, galato de propilo e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético-tritriplex II).

O pigmento vermelho formado na reacção do ácido tiobarbitúrico com os lípidos oxidados foi avaliado colorimetricamente, medindo-se a absorvância num espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Inglaterra) no

comprimento de onda de 538 nm, de acordo com a técnica descrita na NP-3356 (1990). Os resultados foram expressos em mg de aldeído malónico/kg de produto.

3.2.1.11 - Determinação do índice de peróxidos (IP)

O índice de peróxidos foi determinado pela norma húngara HST-19823 (1973), com extracção da matéria gorda por acção do clorofórmio e posterior oxidação do iodeto de potássio a iodo, pelo oxigénio activo, em presença de ácido acético numa massa conhecida de gordura. Segue-se a determinação da quantidade de iodo libertada por meio de titulação com tiosulfato de sódio na presença de cozimento de amido como indicador. Os resultados foram expressos em miliequivalentes de oxigénio activo/kg de gordura extraída.

3.2.1.12 - Determinação do índice de acidez da gordura

Para a determinação do índice de acidez da gordura macerou-se a amostra com clorofórmio, filtrou-se em filtro de papel com sulfato de sódio anidro e juntou-se parte igual de álcool neutralizado, a titulação dos ácidos gordos livres fez-se com hidróxido de sódio a 0,1 N usando a fenolftaleína como indicador (Pearson, 1970). Os resultados foram expressos em % de ácido oleico na gordura extraída.

3.2.1.13 - Determinação do teor em cloretos

Para determinar o teor de cloretos realizou-se a sua extracção a quente e posterior precipitação por excesso de nitrato de prata, realizando-se depois a titulação desse excesso com tiocianato de potássio em presença de alumínio férrico, de acordo com

NP-1845 (1982). Os resultados foram expressos em percentagem, em massa, de cloreto de sódio.

3.2.1.14 - Determinação do teor em nitritos

Após extração por meio de água quente, defecação e filtração, o teor em nitritos foi determinado por técnica fotométrica, medindo-se a absorvância com um espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Inglaterra) no comprimento de onda de 538 nm, de acordo com a técnica descrita na NP-1846 (1987). Os resultados foram expressos em mg de NaNH_2 /kg de amostra.

3.2.1.15 - Determinação dos sulfitos totais

A determinação dos sulfitos totais foi realizada pelo método Monier-Williams descrito no AOAC Official Method 990.28. (1994), adaptado, para possibilitar a destilação do dióxido de enxofre por vapor em aparelho UDK 130D (Velp Scientifica, Itália) e sua posterior quantificação por titulação com iodo usando cozimento de amido como indicador. Os resultados foram expressos em mg de anidrido sulfuroso/kg de amostra.

3.2.2 - Análises microbiológicas

3.2.2.1 - Preparação da amostra

No laboratório prepararam-se as amostras para realização das análises microbiológicas de acordo com a NP-2079 (1989). Procedeu-se à colheita aleatória de pequenas quantidades de produto preparando-se duas amostras de 25 g cada, uma

destinada à pesquisa de *Salmonella* spp. e outra para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*.

Para preparação das diluições decimais necessárias aos restantes tipos de análise foi considerada a NP-3005 (1985), usando a solução de Triptona Sal¹ como diluente e, a suspensão inicial obtida a partir de 10 g da amostra destinada à pesquisa de *Salmonella* spp. que se homogeneizou durante 2 minutos num aparelho Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical UAC House, London).

3.2.2.2 - Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C

A contagem de microrganismos aeróbios totais foi realizada em duplicado, com sementeira por incorporação de 1 ml de cada diluição decimal no meio de cultura Triptose Glucose Extract Agar (Scharlau, Espanha), incubado a 30°C por 72 h conforme a NP-1995 (1982).

Os resultados foram expressos em logaritmo decimal do número de unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (log ufc/g).

3.2.2.3 - Contagem de microrganismos aeróbios termotróficos

A contagem de microrganismos aeróbios termotróficos foi realizada em duplicado, com sementeira por incorporação de 1 ml de cada diluição decimal no meio de cultura Triptose Glucose Extract Agar (Scharlau, Espanha), incubado a 42±0,5°C durante 48 h, expressando-se os resultados em log ufc/g.

¹ Composição: 1 g de Triptona (Scharlau, Espanha) com 8,5 g de NaCl (Riedel- de Haen) para um litro de água destilada.

3.2.2.4 - Contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos

A contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos foi realizada em duplicado, com sementeira por incorporação de 1 ml de cada diluição decimal no meio de cultura Triptose Glucose Extract Agar (Scharlau, Espanha), incubado a $6,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias conforme a NP-2307 (1987), expressando-se os resultados em log ufc/g.

3.2.2.5 - Contagem de microrganismos anaeróbios psicrotróficos

A contagem de microrganismos anaeróbios psicrotróficos, estritos e facultativos, foi realizada em duplicado, com sementeira por incorporação de 1 ml de cada diluição decimal no meio de cultura Brewer Anaerobic Agar (Merck, Alemanha), incubado a $6,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias no interior de caixas estanques em que se colocaram geradores de anaerobiose Anaerocult A (Merck, Alemanha), expressando-se os resultados em log ufc/g.

3.2.2.6 - Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi realizada em duplicado, com sementeira à superfície com auxílio de um semeador, de 1 ml de inóculo distribuído por 5 placas de Petri contendo meio de cultura Cooke Rose Bengal com clorotetraciclina (Scharlau, Espanha) e depois incubadas a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias conforme a NP-2077 (1985), expressando-se os resultados em log ufc/g.

3.2.2.7 - Contagem de Enterobacteriaceae

A contagem de Enterobacteriaceae foi realizada em duplicado, com sementeira por incorporação de 1 ml de cada diluição decimal no meio de cultura VRBD - agar violeta de cristal vermelho neutro bÍlis glucose - (Merck, Alemanha), incubado a 37°C durante 48 h, conforme a NP-4137 (1991), expressando-se os resultados em log ufc/g.

3.2.2.8 - Contagem de bactÉrias ácido lácticas

A contagem das bactÉrias ácido lácticas foi realizada em duplicado, com sementeira por incorporação de 1 ml de cada diluição decimal em dupla camada de meio de cultura MRS – Man Rogosa Sharpe - (Oxoid, Inglaterra), incubado a 30°C durante 72 h, expressando-se os resultados em log ufc/g.

3.2.2.9 - Contagem de *Escherichia coli*

A contagem de *E. coli* foi realizada em duplicado, com sementeira por incorporação de 1 ml de cada diluição decimal em meio de cultura Gelose Tergitol BCIG – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glucorónico - (Biokar Diagnostics, Espanha), incubado a 44°C durante 24 h, de acordo com a NP-4396 (2002). Os resultados foram expressos em log ufc/g.

3.2.2.10 - Pesquisa de esporos de clostrÍdeos sulfito-redutores

A pesquisa de esporos de clostrÍdeos sulfito-redutores foi feita nas várias diluições de acordo com a NP-2262 (1986), após inativação do inóculo em banho de água a 80°C durante 10 minutos, posterior arrefecimento em água fria corrente, e

incorporação do meio de cultura SPS - sulfito polimixina sulfadiazina - (Merck, Alemanha) em tubo de ensaio, incubação a 37°C durante 72 h, considerando-se positivos os tubos nos quais se observaram as colónias negras características, de dimensão variada, isoladas ou confluentes.

3.2.2.11 - Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* foi feita nas várias diluições de acordo com a NP-2260 (1986), após enriquecimento do inóculo em meio líquido selectivo de Chapman (Oxoid, Inglaterra), concentração dupla para a suspensão inicial e simples para as restantes diluições e incubação dos tubos a 37°C por 48 h.

Seguiu-se a sementeira à superfície em placas com meio selectivo de Baird-Parker (Merk, Alemanha), que incubou 24 a 48 h a 37°C para posterior isolamento das colónias características. As que se apresentavam suspeitas, negras com halo branco, foram repicadas para meio de BHI – infusão de cérebro e coração de vitela - (Merk, Alemanha), e incubadas a 37 °C durante 24 h para posterior confirmação por prova de coagulase da presença ou ausência de *Staphylococcus aureus*.

3.2.2.12 - Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. efectuou-se seguindo a NP-1933 (1982), com pré-enriquecimento de 25 g de amostra em meio líquido de Água Peptonada Tamponada (Oxoid, Inglaterra) durante 16 h a 37 °C, seguido do enriquecimento em simultâneo nos meios líquidos Tetrionato (Oxoid, Inglaterra) e Selenito cistina (Merk, Alemanha), que incubaram 24 h respectivamente a 42 e 37 °C.

Seguiu-se o isolamento nos meios BGA - verde brilhante modificado – (Scharlau, Espanha), e Agar Entérico de Hektoen (Scharlau, Espanha), que incubaram a 37 °C por 24 h, após o que as colónias suspeitas foram repicadas para meio de agar TSI – triple sugar iron – (Oxoid, Inglaterra). Quando a cultura se apresentava característica,

fez-se a prova de oxidase seguida, se for o caso, pelo isolamento para TSA – triptona soja agar – (Oxoid, Inglaterra) para se fazer a classificação mediante recurso aos testes bioquímicos API20E (BioMerieux, França).

3.2.2.13 - Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* consistiu inicialmente no enriquecimento de 25 g de amostra em meio líquido Frazer I (Merck, Alemanha), seguido de Frazer II (Merck, Alemanha), respectivamente incubados a 30 e a 37°C por 24h.

O isolamento realizou-se a partir dos meios de enriquecimento mediante sementeira por estria à superfície no meio de cultura Modified Oxford Medium (Difco, EUA), que foi incubado a 37°C de 24 a 48 h conforme o descrito na International Standard ISO/DIS 11290-1 (1995).

Para confirmação das colónias suspeitas efectuou-se repicagem para meio TSA – triptona soja agar – (Oxoid, Inglaterra) e após incubação a 37°C por 24 h, fez-se o estudo por trans-iluminação de Henry das colónias desenvolvidas, e nas que mostraram luminiscência azul fez-se o teste da catalase e oxidase, identificando-se as que passaram os testes mediante o recurso aos testes bioquímicos APIListeria (BioMerieux, França).

3.2.3 - Análise sensorial

3.2.3.1 - Preparação e apresentação da amostra para análise sensorial

As amostras referentes a cada um dos lotes testados foram apresentadas ao painel de provadores, uma a uma num total de quatro, em cada um dos tempos considerados para análise 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4°C.

Com cada amostra foi fornecida uma ficha de análise sensorial para registo das apreciações.

3.2.3.2 - Constituição do painel

Para constituição do painel de provadores foi solicitada a colaboração da Confraria do Maranhão, instituição sediada na cidade da Sertã, que disponibilizou 12 dos seus elementos para participar nas provas realizadas. Tendo cada sessão sido realizada com a participação mínima de 9 provadores.

Não se efectuou nenhum tipo de treino especial para a realização das provas de análise sensorial, uma vez que todos os elementos constituintes do painel podem ser considerados especialistas, em virtude do seu efectivo conhecimento das características organolépticas do produto, que advém do facto de serem consumidores críticos e habituais de Maranhos.

3.2.3.3 - Avaliação sensorial

A análise sensorial das amostras de produto correspondentes aos diferentes lotes em estudo, foi realizada recorrendo ao método de avaliação por classificação em categorias de acordo com a International Standard ISO 6658 (1985), sendo expressa por cada provador a intensidade de cada um dos atributos considerados, numa escala bipolar ordenada em 5 categorias, de muito mau a muito bom.

Em cada amostra realizou-se a avaliação dos atributos Aspecto Geral e Cor no produto embalado a vácuo recém retirado da refrigeração, e depois de aquecido e fatiado, já pronto a ser consumido. Cada provador teve também que se pronunciar sobre os atributos Cor ao corte, Cheiro, Sabor e Textura.

3.2.4 - Análise estatística

A estatística descritiva dos resultados obtidos foi feita com recurso aos programas Microsoft Excel[®] 2000 e [©]GraphPad Prism 4 for Windows Version 4.0.

Para a análise estatística dos resultados obtidos na primeira fase do trabalho, no qual se procurou caracterizar o produto tradicional antes e depois de ser cozinhado, recorreu-se ao teste T-Student para amostras independentes, tendo para o efeito sido utilizado o programa SPSS[®] 11.5 para o Windows.

Já a análise dos resultados dos ensaios de alterações tecnológicas foi executada mediante um procedimento de GLM (General Linear Model) pelo programa The SAS/STAT[®] 8.1, em que os dados foram submetidos a uma análise de covariância, que incluiu o efeito do tratamento (L₁, L₂, L₃ e L₄) e os efeitos linear e quadrático do tempo (0, 7, 14, 21 e 28 dias).

Numa análise preliminar, foi considerada a interação entre o efeito linear e quadrático do tempo com o tratamento; no caso de alguma destas interações ser significativa, obtiveram-se equações de regressão distintas para cada um dos tratamentos, mas quando a interação não foi significativa, foi retirada do modelo e utilizado um coeficiente de regressão no tempo comum para todos os tratamentos.

4 - Resultados e discussão

4.1 - Processamento térmico dos Maranhos

A larga maioria das carnes e dos produtos cárneos são processados termicamente pelo fabricante ou pelo consumidor final e não poucas vezes por ambos, antes de finalmente serem consumidos. Com o tratamento térmico aumenta-se a sua palatabilidade e melhora-se, entre outros, a sua tenrura, cor e sabor para além de se tornarem os alimentos mais seguros e fáceis de conservar ao eliminar os parasitas e os microrganismos eventualmente existentes (Eburne & Prentice, 1996; Dzudie *et al.*, 2000; Ranken, 2000).

Os alimentos cozinhados podem considerar-se pasteurizados quando no seu centro térmico se atinge a temperatura de 70°C durante pelo menos 2 minutos, tempo que pode ser diminuído quando se empregam temperaturas superiores. A esse nível, todas as formas vegetativas de microrganismos são eliminadas, mas algumas formas esporuladas podem sobreviver e posteriormente desenvolver-se no produto se este não for conservado de forma conveniente (Betts & Gaze, 1995; Azizi, 2000; Stoforos & Taoukis, 2006).

A completa eliminação dos esporos só se consegue a temperaturas de esterilização, quando o alimento atinge em todos os pontos uma temperatura superior a 100°C durante algumas horas ou superior a 120°C durante alguns minutos. Apesar da maior segurança conseguida ao empregar esta gama de temperaturas, as características organolépticas dos produtos finais ficam bastante comprometidas, o que torna este processo, salvo algumas situações especiais, pouco adequado para responder às exigências do consumidor moderno (Stiebing, 1992^b; Varnam & Sutherland, 1995; Martens, 1996).

A evolução média das temperaturas utilizadas na água de cozedura e no centro térmico dos Maranhos está representada no Gráfico 3, no qual se pode constatar que o produto é submetido no seu centro térmico a temperaturas superiores a 90°C durante 25 minutos.

Este processamento térmico é suficiente para garantir que todas as formas vegetativas dos microrganismos inicialmente presentes no alimento serão eliminadas,

cumprindo com o critério que exige que o produto seja submetido, em todos os seus pontos, a uma temperatura de 70 °C durante pelo menos 2 minutos, o que permite uma redução de 6D para *Listeria monocytogenes*, a qual representa a mais resistente de todas as formas vegetativas dos microrganismos patogênicos eventualmente presentes nos alimentos (Salvat *et al.*, 1995; ECFF, 1996; Murphy *et al.*, 2005).

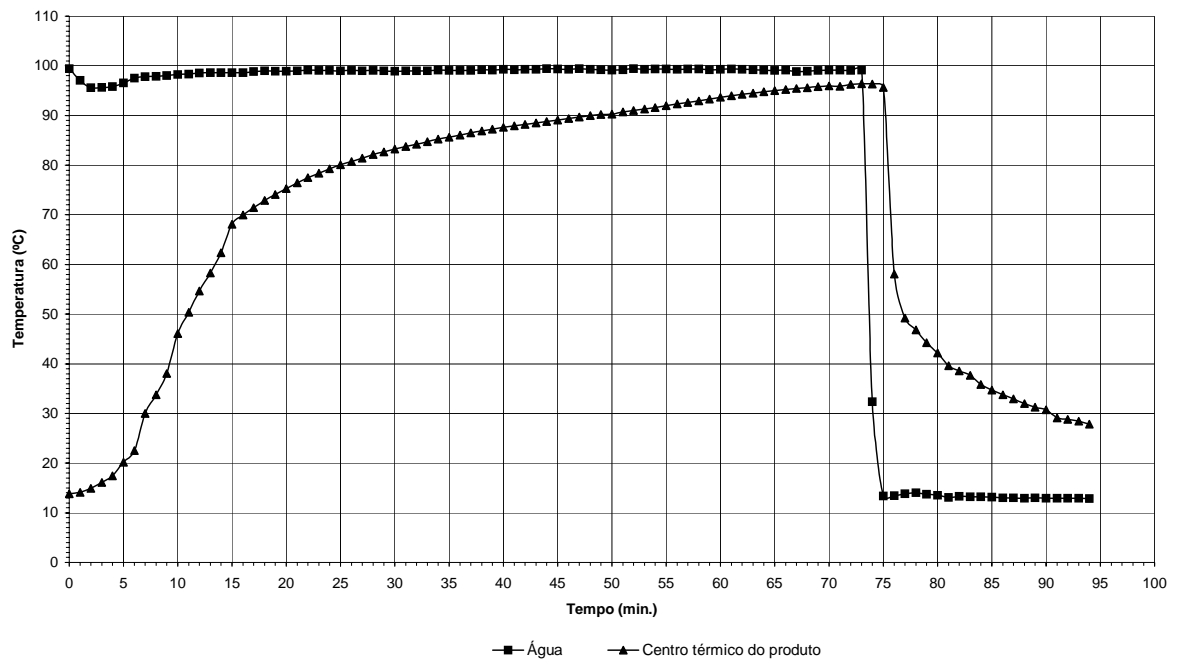


Gráfico 3 – Evolução média das temperaturas ao longo do processamento térmico.

As temperaturas no centro térmico dos Maranhos foram durante mais de 10 minutos superiores a 90 °C, binómio tempo/temperatura que permite garantir uma redução de 6D nos esporos das estirpes psicrófilas não proteolíticas de *C. botulinum* do tipo B, pertencentes ao grupo II, que são as consideradas de maior relevância para a segurança dos alimentos do tipo REPFEDs já que conseguem desenvolver-se e produzir toxina a temperaturas compreendidas entre os 3,3 °C e os 45 °C (Hyytiä-Trees *et al.*, 2000; Carlin *et al.*, 2004; Del Torre *et al.*, 2004).

A letalidade do processo aplicado não é, porém, suficiente para garantir a esterilização comercial dos Maranhos e com isso a sua estabilidade à temperatura ambiente, não garantindo uma redução equivalente a 12D necessária em alimentos pouco ácidos. Na maioria dos enchidos cozidos essa redução é alcançada após 1 minuto a 121,1 °C, o que permite eliminar os esporos de maior resistência térmica conhecida, os

das estirpes proteolíticas não psicrotróficas de *C. botulinum* (ECFF, 1996; Gould, 1999; Johnson, 2000).

Nos alimentos REPFEDs, o controlo deste perigo microbiológico passa, acima de tudo, pela utilização de matérias-primas com reduzido teor de esporos de clostrídeos sulfito redutores, pelo cumprimento das boas práticas de fabrico e a garantia de um rápido arrefecimento após o processamento térmico, devendo o produto atingir os 10 °C ou menos em 2 horas e assim permanecer ao longo de toda a cadeia de distribuição, já que abaixo deste valor os esporos não têm capacidade de germinar (Hart, 1995; Cross, 2006; Peck *et al.*, 2008). Quando o processamento dos produtos se realiza, como é o caso dos Maranhos, sem previamente estarem embalados, são elevados os perigos de contaminação cruzada que deve a todo o custo ser evitada, devendo desenvolver-se para isso uma zona de trabalho própria, classificada como de alto risco, onde as condições de higiene são máximas e o acesso restringido (ACMSF, 1993; ECFF, 1996; Gould, 1999).

Ao verificar-se uma recontaminação pós-processamento térmico, o facto da flora inicialmente presente ter sido eliminada permite que a nova flora se desenvolva rapidamente na ausência de competição, e possa atingir níveis que comprometam a segurança e qualidade do produto. Neste contexto, a causa de preocupação maior são os microrganismos patogénicos *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e, numa perspectiva diferente, também o vírus da Hepatite A (ACMSF, 1993; Franz & von Holy, 1996; Rajkovic *et al.*, 2006; Membré *et al.*, 2008).

Para complementar o efeito barreira do processamento térmico e da refrigeração neste tipo de produtos, e pretendendo sempre o prolongamento em segurança do tempo de vida útil, recorre-se muitas vezes a outros processos barreiras complementares como sejam a utilização de aditivos alimentares, a manipulação do a_w , do pH, ou do teor em sal e a escolha criteriosa do tipo de embalagem (Gould, 1999; Nissen *et al.* 2002; Pizza *et al.*, 2004).

Provavelmente de igual importância será a informação do consumidor para o perigo potencial que pode constitui a má utilização deste tipo de alimentos, cuja permanência no perigoso intervalo de temperaturas compreendido entre os 10 °C e os 63 °C, tem que ser obrigatoriamente evitada e cuja tratamento térmico antes do consumo

final, sempre que o produto o exija deve ser garantidamente eficiente (ACMSF, 1993; ECFF, 1996; Rybka-Rodgers, 2001).

4.2 - Caracterização físico-química dos Maranhos tradicionais

4.2.1 - Caracterização físico-química dos Maranhos tradicionais

Todos os alimentos de matriz mais ou menos complexa são constituídos por nutrientes de origem orgânica à base de carbono, e por nutrientes de origem inorgânica como a água e os sais minerais, que por um lado vão permitir a satisfação das diferentes necessidades do consumidor e por outro vão determinar as características intrínsecas do alimento, com repercussões na evolução da sua vida útil (Fennema & Tannenbaum, 1993; Hubbert *et al.*, 1996; Man, 2002).

Independentemente dos objectivos a atingir, o conhecimento das características inerentes a cada alimento e a forma como estas evoluem ao longo do seu processamento e vida útil, constitui a base do desenvolvimento de qualquer inovação tecnológica num alimento (Fennema & Tannenbaum, 1993; Dekker & Linnemann, 1998).

Assim, ao realizar este trabalho, tornou-se numa primeira fase imprescindível, para além do registo do modo de produção tradicional, fazer a caracterização físico-química e microbiológica do produto original, na sua forma fresca e após cocção, tentando identificar eventuais problemas e oportunidades que permitissem atingir os objectivos propostos neste trabalho.

4.2.1.1 - pH

O pH é um importante factor físico-químico que condiciona as reacções enzimáticas, a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos nos alimentos, constituindo uma potencial barreira que interessa conhecer e controlar ao longo de todo o processo produtivo, a fim de garantir uma maior segurança e a conservação dos

gêneros alimentícios até o seu consumo final (Hernández-Herrero *et al.*, 1999; Rompf & Jahn, 2000; Ordóñez & Hoz, 2007).

A grande maioria dos microrganismos patogênicos e saprófitas que ocorrem nos alimentos, alcançam o seu ótimo desenvolvimento a valores de pH próximos de 7, e a sua sobrevivência fica tanto mais comprometida quanto mais distantes estão os valores de pH da neutralidade. A este respeito, é particularmente importante o pH =4,5 valor abaixo do qual o *C. botulinum* não se desenvolve, o que permite suavizar o processamento térmico nos produtos que cumpram esse requisito (Stiebing, 1992^a; Betts & Gaze, 1995; Leistner & Gould, 2002). O desenvolvimento de outros microrganismos potencialmente patogênicos é limitado em alimentos de pH <4,2, apesar de microrganismos saprófitas como as BAL, e os bolores e leveduras não terem o seu desenvolvimento comprometido por tolerarem bem e desenvolverem-se a valores de pH como 2 ou 3 (Mossel *et al.*, 1995; Doores, 1993; Leistner & Gould, 2002).

A maioria dos alimentos é, por natureza, ligeiramente ácida, e apesar do pH do músculo vivo ser ligeiramente alcalino oscilando entre 7,0 e 7,5, em condições normais, após a transformação do músculo em carne, o pH muscular final será de aproximadamente 5,5. Conseqüentemente, os produtos de salsicharia também apresentam um pH ligeiramente ácido, decorrente das matérias-primas usadas no seu fabrico e das reacções que ocorrem durante o seu processamento (Patarata, 1995^a; Varnam & Sutherland, 1995; Ranken, 2000).

Os valores médios das determinações de pH observadas nos Maranhos não processados e nos Maranhos processados termicamente são apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 – Valores médios de pH dos Maranhos em função do processamento térmico.

pH	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	5,92	5,60	6,48	0,21	3,55	N.S.
Processado	6,10	5,26	6,40	0,33	5,41	

N.S. Não significante; * Significante, p<0.05; ** Muito significante, p<0.01

Da análise dos resultados verifica-se que o valor de pH é ligeiramente inferior nos Maranhos não processados termicamente, não sendo significativa a diferença relativamente ao valor de pH medido nos Maranhos processados termicamente, (5,92 e 6,10, respectivamente).

Esta diferença poderá justificar-se pelo efeito do processamento térmico, eventualmente devido à desnaturação das proteínas. Geralmente a massa dos enchidos escaldados, antes de submetida ao processamento térmico, apresenta valores de pH entre 5,8 e 6,2 os quais, dependendo da intensidade do tratamento térmico, podem aumentar 2 a 5 décimas; de igual modo, também a adição de sais de sódio à água de cocção poderá ter contribuído para o aumento do pH em virtude da sua natureza alcalina (Stiebing, 1992^a; Wirth, 1992; Dzudie *et al.*, 2000).

Constata-se, assim, que em ambas as situações os valores de pH obtidos não constituem uma barreira efectiva ao desenvolvimento microbiano, constituindo os Maranhos, sob este ponto de vista, um meio favorável ao desenvolvimento de microrganismos saprófitas e patogénicos.

4.2.1.2 - Actividade da água (a_w)

O a_w é um parâmetro físico-químico que permite avaliar a fracção de água disponível nos alimentos para participar na actividade enzimática, reacções físico-químicas e no metabolismo microbiano, constituindo uma importante, e frequentemente utilizada, referência para a determinação da estabilidade e segurança sanitária dos géneros alimentícios (Patarata, 1995^a; Le Meste *et al.*, 2006; Sablani *et al.*, 2007).

Com valores que podem variar entre 0 e 1, o a_w tem um efeito inibidor sobre o desenvolvimento dos microrganismos num determinado alimento, tanto maior quanto menor for o seu valor, pois limita a disponibilidade de água e perturba os mecanismos de regulação osmótica das células; os limites inibitórios da grande maioria dos microrganismos são conhecidos (Christian, 1980; Krist *et al.*, 2000; Leistner & Gould, 2002).

Os valores médios das determinações do a_w obtidas nos Maranhos não processados e nos Maranhos processados termicamente são apresentados no Quadro 5; não foram verificadas diferenças significativas entre os valores obtidos.

Quadro 5- Valores médios de a_w dos Maranhos em função do processamento térmico.

a_w	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	0,945	0,926	0,989	0,018	1,90	N.S.
Processado	0,944	0,922	0,988	0,018	1,91	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0.05$; ** Muito significante, $p < 0.01$

O valor médio do a_w no produto cru e no produto processado foi praticamente o mesmo, 0,945 e 0,944 respectivamente; teoricamente este valor é suficientemente baixo para impedir o desenvolvimento de *Campylobacter* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens* e as estirpes psicrótróficas de *Clostridium botulinum* tipo B e E, mas suficientemente alto para permitir o desenvolvimento de outros microrganismos saprófitas e patogénicos (ACMSF, 1993; Krist *et al.*, 2000; Leistner & Gould, 2002).

Aos valores de a_w já de si elevados, acresce o facto da matriz do produto não ser uniforme e conseqüentemente poder apresentar em alguns pontos onde predomine um determinado ingrediente, valores de a_w superiores à média facto que contribui para a eventual existência de gradientes de a_w e uma maior incerteza relativamente à estabilidade deste produto (Christian, 1980; Lenovich, 1987; Lebert *et al.*, 2005; Le Meste *et al.*, 2006).

Assim, relativamente ao a_w os Maranhos devem ser classificados no grupo dos produtos frescos de elevada actividade da água ($a_w > 0,90$), cuja conservação requer a utilização de uma tecnologia de barreiras; ainda assim, os Maranhos apresentam valores inferiores aos verificados na maioria dos enchidos escaldados que em média apresentam um a_w entre 0,98 e 0,97 (Stiebing, 1992^b; Hubbert *et al.*, 1996; Leistner & Gould, 2002).

4.2.1.3 - Composição centesimal

O conhecimento da composição química de um alimento é importante, já que esta reflecte as suas propriedades nutritivas, salubres, de segurança e estabilidade, que para além de permitirem responder a questões regulamentares e de informação geral ao consumidor, determinam a sua utilização e a escolha das tecnologias de processamento e conservação adequadas a cada caso (Fennema & Tannenbaum, 1993; Torres *et al.*, 2000).

De uma forma geral obtém-se a composição química de um alimento através da sua análise centesimal, determinando o grau de presença das distintas fracções que o compõe, nomeadamente, a humidade, os sais minerais ou cinzas, os lípidos, as proteínas e os hidratos de carbono, sendo esta última fracção geralmente a que tem menor expressão nos produtos cárneos (Torres *et al.*, 2000; Li-Chan, 2006; Ruiz, 2007).

No Quadro 6 estão representados os valores médios, em %, das determinações de humidade, cinza total, proteína e gordura livre registadas nos Maranhos não processados e nos Maranhos processados termicamente, tendo a composição em hidratos de carbono sido posteriormente estimada por diferença para 100%.

Não foram significativas as diferenças observadas entre o valor médio de humidade no produto cru e no produto processado termicamente, 59,90% e 61,24%, reflectindo uma boa capacidade de fixação de água por parte dos Maranhos durante o processamento térmico, o que contribui para a manutenção deste importante factor de qualidade e de rendimento na produção de produtos cárneos cozidos (Wirth, 1992; Ranken, 2000; Tilloca *et al.*, 2006).

Relativamente aos valores médios da cinza total, 2,05% no produto cru e 1,50% no produto cozinhado, a diferença observada foi muito significativa ($P < 0,01$).

As alterações neste parâmetro analítico são geralmente reflexo do efeito de alguns processos tecnológicos sobre os alimentos como sejam a descorticação e a adição/remoção de sais (Pearson, 1970; Li-Chan, 2006).

A cozedura dos Maranhos directamente em água com uma concentração de NaCl inferior à sua, favorece a difusão do sal para o exterior, facto que não estando associado a uma diminuição das características organolépticas normais do produto nem sendo este um produto em que o sal constitui uma barreira fundamental para a sua

conservação, poderá interessar do ponto de vista da obtenção de um alimento com baixo teor em sal, indo assim ao encontro das pretensões actuais do consumidor preocupado com a saúde (Resurreccion, 2003; Ruusunen & Puolanne, 2005; Webb *et al.*, 2007).

Quadro 6 – Análise centesimal da Humidade, Cinza total, Proteína total e Matéria gorda livre dos Maranhos.

		Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Humidade (%)	Não processado	59,90	47,69	65,06	4,43	7,39	N.S.
	Processado	61,24	55,11	64,93	2,55	4,16	
Cinza total (%)	Não processado	2,05	1,37	3,30	0,40	19,51	**
	Processado	1,50	1,03	2,28	0,34	22,67	
Proteína total (%)	Não processado	12,81	10,42	15,87	1,3260	10,30	N.S.
	Processado	14,60	11,12	17,39	1,33	9,11	
Matéria gorda livre (%)	Não processado	10,03	4,92	20,32	4,04	40,28	**
	Processado	7,11	5,38	9,72	1,24	17,44	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0.05$; ** Muito significante, $p < 0.01$

Na proteína total a diferença verificada entre os valores médios no produto cru e no produto processado, respectivamente 12,81% e 14,60%, não foram significativas, sendo o ligeiro aumento verificado após o processamento térmico provavelmente devido à diminuição da representatividade das cinzas e da matéria gorda livre na composição total do alimento (Pearson, 1970; Ranken, 2000; Tilloca *et al.*, 2006).

Relativamente à matéria gorda livre a diferença obtida entre o valor médio no produto cru e no produto processado termicamente foi muito significativa ($P < 0,01$), decaindo dos iniciais 10,03% para 7,11% nos Maranhos já cozinhados.

Este facto é justificado pelas perdas ocorridas durante a cocção, uma vez que a gordura funde a temperaturas compreendidas entre 37 °C e 40 °C, pelo que passa com facilidade para o exterior da matriz do enchido durante o processamento a temperatura

relativamente baixa, sempre que o invólucro não garanta a sua eficaz retenção (Honikel, 1996; Ranken, 2000; Tilloca *et al.*, 2006).

Não tendo sido determinada de forma directa a composição dos Maranhos em hidratos de carbono, fez-se uma estimativa diferencial relativamente às restantes fracções componentes do produto, constatando-se uma participação de aproximadamente 16% de hidratos de carbono na composição centesimal dos Maranhos, como pode ver no Gráfico 4.

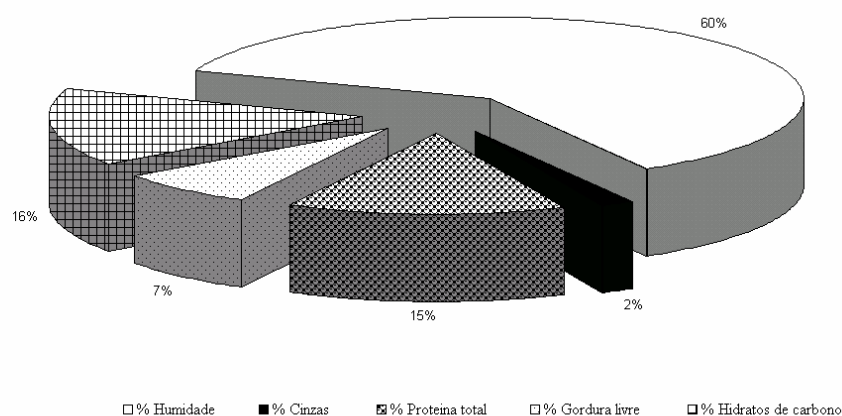


Gráfico 4 – Composição centesimal dos Maranhos cozidos.

Com uma composição em hidratos de carbono atípica para um produto cárneo, os Maranhos apresentam uma composição centesimal interessante do ponto de vista do equilíbrio entre as diferentes fracções que o constituem, com um teor proteico elevado e um valor energético que não resulta essencialmente da fracção lípidica, podendo por si só assumir o papel de uma refeição completa com baixo teor de gordura (<10%), capaz de contribuir para a satisfação das necessidades diárias do consumidor (Muller & Tobin, 1986; Tändler, 1992^b; Resurrecion, 2003; Mahan & Escot-Stump, 1998).

Este facto está em concordância com outros autores que demonstraram que a incorporação de carne de cabra em salsichas elaboradas com misturas de diferentes tipos de carne possibilita a obtenção de produtos com baixo teor de gordura, com

elevada capacidade de retenção de água, superior qualidade nutricional e boa textura (Gadiyaram & Kannan, 2004; Dzudie *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008^a).

E considerando que para uma parte considerável da população mundial é difícil suprir as necessidades proteicas, fenómeno com tendência a agravar-se já que a produção de proteína resulta mais dispendiosa do que a dos lípidos ou hidratos de carbono, torna-se permente encontrar novas fontes de proteína e melhorar a eficiência da utilização das proteínas convencionais, e a carne de cabra e os produtos obtidos a partir da sua utilização podem contribuir de uma forma importante para a resolução deste problema (Cheftel *et al.*, 1993; Banskalieva *et al.*, 2000; Ahuya *et al.*, 2005; Simela & Merkel, 2008).

4.2.1.4 - Valor energético

A principal função dos nutrientes de um alimento é o fornecimento de energia suficiente para a manutenção da vida de quem o consome, e que resulta essencialmente do metabolismo dos hidratos de carbono, gorduras e proteínas que são depois utilizados de formas várias na manutenção do metabolismo basal, regulação térmica, termogénese e exercício físico (Muller & Tobin, 1986; Mahan & Escot-Stump, 1998).

O valor energético dos Maranhos, função da sua composição em hidratos de carbono, gordura e proteína, foi determinado através da aplicação dos factores clássicos de conversão de Atwater que permitem estimar a energia metabolizável dos alimentos (Pearson, 1970; Muller & Tobin, 1986; Mahan & Escot-Stump, 1998). Os resultados são apresentados no Quadro 7.

O efeito do processamento térmico no valor energético dos Maranhos não foi significativo, e a ligeira diminuição ocorrida de 847,97 kJ/100g para 775,57 kJ/100g após a cocção, pode ser justificada pela diminuição do teor em matéria gorda livre no produto após o processamento térmico, cujas causas prováveis foram anteriormente referidas.

Quadro 7- Valores médios do valor energético dos Maranhos em função do processamento térmico (kJ/100g).

Valor energético	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	847,97	685,03	1203,20	145,00	17,10	N.S.
Processado	775,57	690,85	932,78	64,50	8,32	

N.S. Não significante; * Significante, p <0.05; ** Muito significante, p <0.01

Devido ao seu baixo teor em gordura, os Maranhos são comparativamente menos energéticos que outros enchidos escaldados em cuja composição entra maior quantidade de gordura (Wirth, 1992; Varnam & Sutherland, 1995; Ranken, 2000).

4.2.1.5 - Teor de cloretos

O cloreto de sódio, ou simplesmente sal como é vulgarmente designado, é um ingrediente de utilização frequente no processamento de alimentos; o seu emprego na conservação da carne, peixe e produtos de salsicharia é feito desde tempos imemoriais sendo responsável pelo sabor salgado e pela intensificação e harmonização dos sabores entre os diferentes ingredientes (Patarata, 1995^a; Brewer, 2000; Ruusunen & Puolanne, 2005).

Quase sempre usado nos produtos cárneos, o sal desempenha para além da imediata influência sobre as características organolépticas dos produtos várias funções tecnologicamente importantes, como a acção selectiva e controladora do desenvolvimento da flora microbiana, o condicionamento da actividade enzimática e das características da fracção proteica, nomeadamente na capacidade de retenção de água e solubilidade das proteínas (Varnam & Sutherland, 1995; Ranken, 2000; Ruiz, 2007).

A sua capacidade sequestrante de moléculas de água (uma molécula de NaCl consegue ligar-se a seis molécula de H₂O), faz do sal um umectante que permite diminuir o a_w nos alimentos e com isso aumentar a sua estabilidade mesmo quando estes

permanecem com um elevado teor em água, garantindo a manutenção de características organolépticas como a plasticidade e melhorando os rendimentos na produção, desde que utilizado dentro dos limites sensoriais aceitáveis para cada produto (Lindsay, 1993; Patarata, 1995^a; Ruiz, 2007).

O poder conservante do sal resulta essencialmente do seu efeito depressor no a_w do alimento, mas a sua acção inibitória sobre o desenvolvimento dos microrganismos também é exercida de forma directa, provocando osmólise e interferindo no bom funcionamento da membrana e dos sistemas enzimáticos das células, seleccionando e regulando deste modo os microrganismos que conseguem desenvolver-se de acordo com a sensibilidade mostrada por cada espécie (Hubbert *et al.*, 1996; Flores, 1997; Brewer, 2000).

Os valores médios das determinações do teor em cloreto de sódio obtidos nos Maranhos não processados e nos Maranhos processados termicamente estão representados no Quadro 8.

Quadro 8- Valores médios do teor em cloretos dos Maranhos em função do processamento térmico.

NaCl (%)	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	1,25	0,81	2,13	0,32	25,60	**
Processado	0,82	0,46	1,27	0,24	29,27	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0.05$; ** Muito significante, $p < 0.01$

É notória a diminuição entre os valores médios do teor de cloretos no produto cru e no produto processado - o valor médio inicial de 1,25% cai após o processamento térmico para 0,82%, sendo esta diferença muito significativa ($p < 0,01$). Tal diminuição será justificada pela difusão do sal contido no produto para a água onde se procede à cozedura directa dos Maranhos, à semelhança do que é normal acontecer durante a cocção de outros produtos de salsicharia (Dzudie *et al.*, 2000; Tilloca *et al.*, 2006).

De qualquer modo, em nenhum dos casos se pode considerar o teor de cloretos suficientemente alto por forma a garantir a conservação prolongada do produto, estando mesmo o valor determinado nos Maranhos cozidos abaixo dos valores médios usuais

para os enchidos escaldados, que frequentemente variam entre 1,6% e 2,2%. Deste ponto de vista os Maranhos devem classificar-se como um produto com baixo teor de sal por ter menos de 1,5% de NaCl (Hammer, 1992; Brewer, 2000 Leistner & Gould, 2002).

Considerando os padrões organolépticos normais do produto, o baixo teor em sal observado não deixa de ser interessante do ponto de vista das crescentes preocupações associadas ao seu consumo excessivo, para o qual muito contribuem os produtos cárneos, e que está directamente relacionado com problemas de hipertensão arterial, cardiovasculares e oncológicos, recomendando-se por isso que o consumo de sal não exceda 5 a 6 g/dia (Hammer, 1992; Ruusunen & Puolanne, 2005; Webb et al., 2007).

4.2.1.6 - Azoto básico volátil total (ABVT)

O ABVT é constituído essencialmente por amoníaco e aminas voláteis e o seu teor está directamente relacionado com o nível de degradação da fracção proteica dos alimentos, consequência da proliferação de microrganismos e do aumento associado da actividade enzimática com acção proteolítica; permite avaliar o grau de proteólise e reconhecer de uma forma expedita a frescura de um alimento proteico (Pearson, 1970; Mathews *et al.*, 1990; Nychas & Tassou, 1997).

No Quadro 9 são apresentados os valores médios do ABVT nos Maranhos crus e nos Maranhos processados termicamente, respectivamente 34,29 e 23,46 mg de NH₃/100g de produto.

Esta diferença é muito significativa ($p < 0,01$) e poderá justificar-se pelo efeito da temperatura de processamento e contacto directo do produto com a água de cozedura na amplitude da volatilização e lixiviação dos compostos azotados não proteicos, há semelhança do que acontece com outros componentes do alimento que se perdem durante a preparação culinária (Varnam & Sutherland, 1995; Ranken, 2000).

Quadro 9 - Valores médios do ABVT dos Maranhos em função do processamento térmico (mg de NH₃/100g).

ABVT	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	34,29	10,62	75,86	13,04	38,02	**
Processado	23,46	10,56	44,64	6,09	25,98	

N.S. Não significante; * Significante, p<0.05; ** Muito significante, p<0.01

Os valores de ABVT variam de produto para produto e podem ou não considerar-se aceitáveis conforme este se encontra dentro dos padrões de qualidade microbiológica e organoléptica considerados normais, ou pelo contrário mostra sinais de deterioração. Podem considerar-se regulares os valores inferiores a 16,5 mg NH₃/100g na carne de bovino fresca, 14 mg NH₃/100g na carne de peru fresca, 60 mg NH₃/100g nos produtos de salsicharia frescos crus ou cozidos e 100 mg NH₃/100g nos produtos de salsicharia curados, fermentados ou secos (IQA, 1981; Martins & Patarata, 1993; Bauer, 1996; Fraqueza, 2006).

Deste modo, tomando como referência o valor de 60 mg NH₃/100g para os produtos de salsicharia frescos crus ou cozidos, constata-se que os valores médios de ABVT encontrados nos Maranhos foram, em ambas as situações, inferiores a 60 mg NH₃/100g, apesar de ocasionalmente algumas amostras frescas apresentarem valores superiores que poderão justificar-se pela pior qualidade das matérias primas.

4.2.1.7 - Índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)

A oxidação lipídica constitui um dos principais problemas no processamento de carne, durante a sua preparação culinária e posteriormente no armazenamento sob refrigeração, pois compromete a qualidade do produto mediante alterações na cor, odor e sabor, que lhe limitam o prazo de validade. O defeito apontado em produtos cárneos processados termicamente e descrito como sabor a requentado, é um exemplo destas alterações (Gray *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002; Serdaroglu & Yildiz-Turp, 2004).

O TBA permite avaliar o grau de rancificação dos lípidos num alimento, sendo uma determinação com elevada correlação relativamente à apreciação sensorial na detecção da oxidação lipídica, apesar das metodologias laboratoriais mais utilizadas variarem muito no grau de precisão. Os teores podem surgir por defeito, quando a extracção dos produtos de oxidação não é completa, ou por excesso, quando provocado pelas altas temperaturas ou interferência de outras substâncias presentes nos alimentos, como por exemplo a glucose, maltose, sacarose e o sorbitol, que também originam cor ao reagirem com o ácido tiobarbitúrico (Wang *et al.*, 2002; Pizza *et al.*, 2004; Richards, 2006).

Apesar de acumular menos gordura intramuscular e subcutânea, a cabra produz, comparativamente com outras espécies, carne mais susceptível a uma rápida oxidação lipídica devido ao seu maior conteúdo em ácidos gordos insaturados, com valores de TBA entre 1,18 mg de aldeído malónico/kg no primeiro dia após o abate e 4,60 mg de aldeído malónico/kg passados 7 dias (Galipalli *et al.*, 2004; Banskalieva *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008^{a,b}).

Os resultados obtidos nas determinações de TBA feitas nos Maranhos crus e processados termicamente não foram significativamente diferentes, mas notou-se um ligeiro aumento do valor médio de 0,43 mg de aldeído malónico/kg para 0,53 mg de aldeído malónico/kg após o processamento térmico, como pode ver-se no Quadro 10.

Quadro 10 - Valores médios do TBA dos Maranhos em função do processamento térmico (mg de aldeído malónico/kg).

TBA	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	0,43	0,13	0,87	0,21	48,84	N.S.
Processado	0,53	0,07	2,65	0,52	98,11	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0.05$; ** Muito significante, $p < 0.01$

De facto, a carne ao ser cozinhada torna-se mais sensível à oxidação do que a carne crua, devendo-se esse fenómeno à desnaturação das proteínas, aos danos estruturais causados às membranas pelo calor e pelo próprio efeito que a temperatura

tem na promoção de todo o processo de oxidação lipídica nos alimentos (Gray *et al.*, 1996; Houben & van Dijk, 2002; Ramírez *et al.*, 2004).

4.2.1.8 - Índice de peróxidos (IP)

Os peróxidos são os produtos iniciais maioritariamente presentes no processo de autoxidação, e frequentemente utilizam-se para monitorizar a evolução das primeiras etapas da oxidação lipídica. Ao longo do processo oxidativo o seu valor cresce até um máximo a partir do qual volta a diminuir e embora algumas vezes se tenha já correlacionado a sua presença com o desenvolvimento de aromas e sabores a ranço os resultados são frequentemente inconsistentes (Nawar, 1993, 1998; Richards, 2006).

A carne de bovino fresca e em boas condições apresenta normalmente valores de IP compreendidos entre 0 e 1 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura extraída, aceitando-se o valor de 5 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura extraída como limite crítico superior para este produto (Pearson, 1970).

No Quadro 11, são apresentados os valores médios dos IP determinado para os Maranhos não processados e processados termicamente, e embora se note um aumento de 10,79 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura para 15,76 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura após o processamento do produto, os resultados não são significativos.

Quadro 11 - Valores médios do IP dos Maranhos em função do processamento térmico (miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura extraída).

IP	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	10,79	1,43	45,35	9,75	90,36	N.S.
Processado	15,76	1,10	53,28	11,90	75,50	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0.05$; ** Muito significante, $p < 0.01$

Note-se, porém, que os coeficientes de variação são extremamente elevados, facto que para além de poder ser reflexo da fragilidade da técnica usada, pode dever-se aos diferentes lotes e proveniências das amostras analisadas, reflectindo conseqüentemente as variações no tipo e qualidade dos ingredientes utilizados na manufactura dos Maranhos.

4.2.1.9 - Índice de acidez da gordura

A presença de ácidos gordos livres está directamente relacionada com a actividade lipolítica que se desenvolve no alimento e expressa-se pelo índice de acidez da gordura, sendo expectável que se verifique uma maior presença deste tipo de ácidos gordos em alimentos detentores de um maior conteúdo em gordura (Nawar, 1993, 1998; Richards, 2006).

É sabido que os ácidos gordos apresentam uma maior estabilidade na sua forma triacilglicerídica comparativamente com a sua forma livre, e que a carne de cabra é conhecida pelo menor teor em gordura relativamente à carne proveniente de outras espécies pecuárias. Porém, o facto destes animais serem geralmente alimentados em regime de pastoreio proporciona uma predominância de ácidos gordos insaturados que são naturalmente mais propensos a fenómenos de oxidação (Banskalieva *et al.*, 2000; Gadiyaram & Kannan, 2004; Lee *et al.*, 2008^b).

No Quadro 12 são apresentados os valores médios da acidez determinados para o produto cru e para o produto processado termicamente, verificando-se que praticamente não existe alteração entre nos valores, tendo a análise de variância mostrado não haver diferenças significativas entre as médias obtidas.

Geralmente são aceites para a carne de bovino fresca em boas condições valores compreendidos entre 1 e 2 % de ácido oleico na gordura extraída; os valores verificados nos Maranhos foram superiores e atingiram em média quase 4% de ácido oleico na gordura extraída, valores que ainda assim se podem considerar baixos quando comparados com os de outros produtos cárneos cozidos (Pearson, 1970; Tilloca *et al.*, 2006).

Quadro 12 - Valores médios de acidez dos Maranhos em função do processamento térmico (% de ácido oleico na gordura extraída).

Acidez	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	3,88	1,09	7,93	1,82	46,91	N.S.
Processado	3,91	1,26	8,66	2,03	51,92	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0.05$; ** Muito significante, $p < 0.01$

4.3 - Caracterização microbiológica dos Maranhos tradicionais

De seguida apresentam-se os resultados dos parâmetros microbiológicos considerados relevantes para a avaliação da qualidade higiénica dos Maranhos tradicionais.

4.3.1 - Microrganismos

4.3.1.1 - Aeróbios totais a 30 °C

A contagem de microrganismos totais a 30°C permite estimar a totalidade dos microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos presentes num alimento, sem contudo especificar a que grupos mais restritos pertencem, nomeadamente as BAL, Enterobacteriaceae, psicrotróficos, bolores e leveduras entre outros (Mossel & Garcia, 1985; Mossel *et al.*, 1995).

Este critério microbiológico tem, então limitado valor como indicador de agentes potencialmente patogénicos, que podem estar presentes assim como as suas toxinas, em produtos alimentares com baixas contagens de microrganismos totais (Anderson & Pascual, 2000; Messer & Clifford, 2000; Esteves, 2005).

No Quadro 13 estão representados os valores médios das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, nos Maranhos crus e nos Maranhos já processados termicamente. Como era expectável, as diferenças entre os dois valores são muito significativas ($P < 0,01$), justificando-se o decréscimo em cerca de 4 unidades logarítmicas após o processamento térmico do produto, pelo efeito letal que as temperaturas elevadas têm sobre os microrganismos (Olson & Nottingham, 1980; Stiebing, 1992^a; Marks, 2006).

Os resultados desta determinação em produtos alimentares reflectem a sua qualidade sanitária e indicam, para além das condições higiénicas das matérias-primas utilizadas, a forma como os produtos foram manipulados ao longo do seu ciclo produtivo. Excepções feitas aos produtos fermentados, estas contagens não devem ser elevadas já que tal é geralmente reflexo da utilização de matérias-primas muito contaminadas, ou da ocorrência de deficiências na manipulação e processamento do alimento ao longo do seu fabrico e distribuição (Shaw, 1996; Guerrero & Chabela, 2000; Esteves, 2005).

Quadro 13 - Valores médios das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).

Aeróbios totais	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	7,44	6,41	8,30	0,51	6,86	**
Processado	3,06	1,00	5,83	1,52	49,67	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0,05$; ** Muito significante, $p < 0,01$

Contagens muito elevadas são em regra sinal de deterioração dos alimentos, que passam a considerar-se menos próprios para o consumo quando atingem valores na ordem dos 6 a 7 log ufc/g. Os Maranhos crus apresentaram um valor médio das contagens de microrganismos aeróbios totais de 7,44 log ufc/g com um mínimo de 6,41 log ufc/g, sempre acima dos 5 log ufc/g considerados aceitáveis para uma boa qualidade microbiológica deste tipo de produtos (Borch *et al.* 1996; Anderson & Pascual, 2000; Candlish *et al.*, 2001).

Nos Maranhos cozinhados, o valor médio registado para este parâmetro foi de 3,06 log ufc/g, valor por si aceitável que resultou do efeito proporcionado pelo processamento térmico do produto, que constitui deste modo uma importante barreira para assegurar melhorias da qualidade microbiológica do alimento, já que a qualidade higiénica das matérias-primas é baixa e conseqüentemente o produto cru resulta muito contaminado, não se descartando mesmo a eventual presença de microrganismos potencialmente patogénicos (Stiebing, 1992^a; Gorris, 2000; Franz & von Holy, 1996; Greer & Dilts, 2004).

Os Maranhos crus devem pois considerar-se um alimento de muito baixa qualidade higiénica e que ostenta algum perigo, por potencialmente poder ser fonte de contaminação cruzada de outros alimentos já processados, no entanto o facto das amostras analisadas não mostrarem sinais evidentes de deterioração poderá, à semelhança do que acontece com outros produtos alimentares, dificultar ou mesmo impedir o estabelecimento de uma relação entre o número de bactérias presentes e a avaria do produto.

4.3.1.2 - Aeróbios termotróficos

A taxa de crescimento de todos os microrganismos é afectada pela temperatura do meio em que se encontram, a qual altera a duração da fase lag e do tempo de geração. Os microrganismos podem, assim, agrupar-se em diferentes categorias de acordo com as suas temperaturas mínimas, óptimas e máximas de crescimento (Hubbert *et al.*, 1996; Ross & Nichols, 2000).

Designam-se por termófilos e termotróficos os microrganismos que são capazes de se desenvolver a temperaturas elevadas. Dos primeiros, os pertencentes ao género *Thermus* spp., têm capacidade para se desenvolver a 80 a 90 °C e a sua temperatura mínima de crescimento ronda os 40 a 50 °C; são microrganismos que se desenvolvem em ambientes específicos como fontes termais e caldeiras de aquecimento central, mas que não estão associados a problemas nos alimentos. Já alguns bacilos, clostrídeos e actinomicetas são capazes de se desenvolver a temperaturas entre o 40 e os 65 °C e podem estar na origem da deterioração de produtos enlatados em regiões tropicais,

como é o caso do *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *C. thermosaccharolyticum* e *Desulfotomaculum nigrificans* (Mossel *et al.*, 1995; Ambrosini *et al.*, 2000).

Serão termotróficos os microrganismos que se desenvolvem entre os 10 e os 50°C e têm o seu máximo de crescimento entre os 42 e 46°C; enquadram-se nesta categoria muitos dos microrganismos potencialmente patogénicos em alimentos como *Salmonella* spp., *E. coli* (EVEC), *Campylobacter* spp. e a maioria das estirpes toxigénicas de *B. cereus*, *C. perfringens* e *S. aureus*. Estes microrganismos, sendo mesófilos, distinguem-se dos outros pertencentes a esta categoria pelo facto da sua temperatura crítica superior ser mais elevada comparativamente com a dos restantes mesófilos, mas ainda assim bastante abaixo da dos verdadeiros termófilos (Mossel & Garcia, 1985; Mossel *et al.*, 1995).

No Quadro 14 apresentam-se, em log ufc/g, as contagens médias dos microrganismos aeróbios termotróficos obtidas nos Maranhos antes e depois do processamento térmico. A diferença entre os 5,42 log ufc/g contados no produto cru e os 1,75 log ufc/g no produto processado, foi muito significativa (P <0,01)

Quadro 14 - Valores médios das contagens de microrganismos aeróbios termotróficos nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).

Aeróbios termotróficos	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	5,42	3,70	7,22	1,00	18,45	
Processado	1,75	0,00	4,09	1,29	73,71	**

N.S. Não significativa; * Significante, p<0.05; ** Muito significativa, p<0.01

Estes valores reforçam a ideia da deficiente higiene das matérias-primas usadas e das más práticas de fabrico que são frequentemente aplicadas, como seja o arrefecimento dos Maranhos após o processamento térmico à temperatura ambiente, prolongando para lá do desejável a permanência do produto a temperaturas que favorecem o desenvolvimento dos microrganismos.

4.3.1.3 - Aeróbios psicrotróficos

Em oposição aos microrganismos termófilos e termotróficos, distinguem-se também os psicrófilos e os psicrotróficos cujo desenvolvimento ocorre a baixas temperaturas.

Os psicrófilos caracterizam-se por terem temperaturas máximas de crescimento inferiores a 25 °C, e crescimento óptimo entre os 10 °C e 15 °C, apesar da sua grande maioria conseguir desenvolver-se, embora de forma lenta, a temperaturas próximas e abaixo dos 0 °C. Neste caso o seu desenvolvimento fica limitado pelo a_w do produto congelado, sendo exemplo de microrganismos tolerantes a estes condicionalismos alguns bolores do tipo *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Chrysosporium* spp., *Rhizopus* spp., *Thamnidium* spp., *Aureobasidium* spp., *Cladosporium* spp. e *Sporotrichum* spp. (Mossel *et al.*, 1995; Filtenborg *et al.*, 1996; Ambrosini *et al.*, 2000).

Já os microrganismos psicrotróficos podem desenvolver-se entre -5 °C e 40°C, apesar do seu crescimento óptimo acontecer a temperaturas entre os 25 °C e os 37 °C, podendo pois considerar-se microrganismos mesófilos psicrotróficos. São exemplo os agentes patogénicos *L. monocytogenes*, *C. botulinum* do tipo E, *Y. enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* e algumas estirpes de *B. cereus*, todos capazes de se desenvolver abaixo dos 5 °C e com uma temperatura máxima de crescimento de cerca de 35 °C (Mossel *et al.*, 1995; Anderson & Pascual, 2000; Ambrosini *et al.*, 2000).

São exemplo de microrganismos psicrotróficos vulgarmente associados à degradação de alimentos refrigerados algumas bactérias pertencentes aos géneros *Brochothrix* spp., *Pseudomonas* spp., *Hafnia* spp., *Achromobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Enterobacter* spp. e *Moraxela* spp. entre outras, bem como as leveduras pertencentes aos géneros *Rhodotorula* spp., *Torulopsis* spp., *Trichosporon* spp., *Candida* spp., *Saccharomyces* spp. e *Hansenula* spp. (Miller, 1979; Mossel *et al.*, 1995; Khachatouranis & Arora, 2000).

Como poderá depreender-se da observação do Quadro 15, o processamento térmico teve uma acção muito significativa ($P < 0,01$), na redução de 7,44 log ufc/g de produto não processado para 2,70 log ufc/g no produto processado.

Porém, a falta de higiene que algumas vezes acontece no decorrer do fabrico, leva a que ocorram contagens de microrganismos aeróbios psicrotróficos no produto

processado superiores ao que seria desejado, o que vai certamente comprometer o prazo de validade do produto em refrigeração, não sendo excluído o possível desenvolvimento de alguns dos microrganismos patogénicos atrás referidos.

Quadro 15 - Valores médios das contagens de microrganismos aeróbios psicrotróficos nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).

Aeróbios psicrotróficos	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	7,44	6,32	8,33	0,53	7,12	**
Processado	2,70	0,00	5,10	1,78	65,93	

N.S. Não significante; * Significante, p<0.05; ** Muito significante, p<0.01

4.3.1.4 - Anaeróbios psicrotróficos

Para além da temperatura, outro factor extrínseco que determina o desenvolvimento dos microrganismos presentes num alimento é a composição da atmosfera envolvente, diferindo estes entre si relativamente às suas necessidades ou tolerância à presença de oxigénio (Rompf & Jahn, 2000).

Os microrganismos que não necessitam de oxigénio para o seu desenvolvimento designam-se microrganismos anaeróbios, e dentro destes distinguem-se os anaeróbios estritos, para os quais a presença de oxigénio pode ser fatal e os aerotolerantes que toleram a presença de oxigénio apesar de não o utilizarem (Alur, 2000; Ambrosini *et al.*, 2000).

Nos produtos cárneos refrigerados em condições de anaerobiose mediante utilização de embalagem a vácuo ou atmosfera modificada, é principalmente favorecido o desenvolvimento de BAL psicrotróficas como as *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. e *Carnobacterium* spp., que são responsáveis pela indesejável formação de visco superficial. E em situações em que predominam as Enterobacteriaceae como a *Hafnia alvei* e *Serratia liquefaciens* pode ocorrer a formação de amins biogénicas e consequentes defeitos de aroma (Hansen & Bautista, 2000; Guerrero & Chabela, 2000).

Estes microrganismos chegam geralmente aos alimentos após o seu processamento térmico e anteriormente à sua embalagem, sendo do interesse do produtor saber da sua existência no momento de decidir o tipo de embalagem a utilizar.

No Quadro 16 constam os resultados dos valores médios das contagens de microrganismos anaeróbios psicotróficos.

Voltou a verificar-se que a diminuição de 6,81 log ufc/g de produto não processado para 1,94 log ufc/g após o processamento térmico foi muito significativa ($P < 0,01$), prevalecendo no entanto casos em que as contagens no produto processado foram acima do desejado.

Quadro 16 - Valores médios das contagens de microrganismos anaeróbios psicotróficos nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).

Anaeróbios psicotróficos	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	6,81	5,97	7,58	0,52	7,64	**
Processado	1,94	0,00	5,64	1,71	88,14	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0,05$; ** Muito significante, $p < 0,01$

4.3.1.5 - Fungos

Os fungos são microrganismos eucariotas, heterotróficos, caracteristicamente micelares, que se dividem em bolores e leveduras, com interesse não só do ponto de vista da deterioração dos alimentos mas também pelas múltiplas utilizações industriais em que participam como agentes fermentativos (Mossel *et al.*, 1995; Moss, 2000; Sarbhoy & Kulshrestha, 2000).

Os bolores distinguem-se das leveduras pelo facto serem dotados de um micélio verdadeiro constituído por hifas com crescimento apical, que são responsáveis pelo seu aspecto cotonoso. Estão bem adaptados para o desenvolvimento sobre meios sólidos e pobres em água que colonizam e degradam mediante a libertação de exoenzimas,

dispersando-se depois através de esporos adaptados para a circulação na atmosfera onde são ubíquos (Krist *et al.*, 2000; Moss, 2000; Soler, 2000).

As leveduras crescem geralmente em forma de agregados soltos de células independentes de forma globosa, ovóide, periforme ou quase cilíndrica, mas também podem formar cadeias semelhantes a um micélio designado por pseudomicélio, e algumas vezes podem mesmo formar micélio verdadeiro frequentemente ramificado. Este facto torna mais difícil distingui-las dos bolores e não permite classificá-las exclusivamente de acordo com o seu aspecto morfológico, sendo algumas vezes necessário recorrer a provas bioquímicas para a sua identificação específica (Soler, 2000).

A grande dispersão dos fungos no ambiente justifica sua frequente aparição como contaminantes nos produtos alimentares, visto que estes, em virtude da sua composição, constituem um excelente meio para a fixação e reprodução de grande número de espécies fúngicas, cuja proliferação ocorre com facilidade por serem mais tolerantes a factores extremos que limitam o desenvolvimento bacteriano, como baixos valores de a_w , pH e temperatura (Krist *et al.*, 2000; Rompf & Jahn, 2000; Ross & Nichols, 2000).

No Quadro 17 estão apresentados os valores médios das contagens de bolores nos Maranhos crus e nos Maranhos já processados. Apesar da presença inicial não ser tão acentuada como a dos restantes microrganismos até aqui avaliados, verificou-se ainda assim uma diminuição para menos de metade após o processamento térmico, que foi muito significativa ($P < 0,01$).

Porém, a capacidade de desenvolvimento dos bolores a baixas temperaturas constitui um problema na conservação dos produtos cárneos quando estes após o processamento térmico, são contaminados com esporos destes microrganismos, que desenvolvendo-se vão alterar o aspecto, e as características nutricionais e organolépticas dos produtos, abreviar a sua conservação e eventualmente contaminá-los com micotoxinas. São frequentes os géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. (Filtenborg *et al.*, 1996; Guerrero & Chabela, 2000; Moss, 2000).

Neste tipo de produtos, para além da qualidade das matérias-primas, o controlo do desenvolvimento dos bolores passará pelos cuidados a ter com a qualidade do ar nas zonas de alto risco em que o produto permanece após o processamento térmico e antes

de ser embalado, na utilização de embalagens adequadas, a vácuo ou com atmosfera modificada, visto que são aeróbios estritos, ou pelo eventual recurso a conservantes (Filtenborg *et al.*, 1996; Guerrero & Chabela, 2000; Nychas & Drosinos, 2000).

Quadro 17 - Valores médios das contagens de bolores nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).

Bolores	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	2,41	0,00	4,51	0,93	38,59	**
Processado	0,99	0,00	2,08	0,67	67,68	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0.05$; ** Muito significante, $p < 0.01$

Conforme se pode constatar no Quadro 18, a presença média inicial de leveduras no produto não processado foi de 4,94 log ufc/g, posteriormente reduzida, após o processamento térmico, para 1,42 log ufc/g constituindo esta uma diferença muito significativa ($P < 0,01$).

Na ausência de cuidados após o processamento térmico, desenvolvem-se geralmente leveduras pertencentes aos géneros *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Torulaspóra* spp. e *Tricosporon* spp., que por serem microaerófilas crescem em ambientes onde existem quantidades residuais de oxigénio como pode acontecer nas embalagens a vácuo ou em atmosfera modificada, passando nestes casos o seu controlo pela utilização de conservantes (Miller, 1979; Guerrero & Chabela, 2000; Nychas & Drosinos, 2000).

Quadro 18 - Valores médios das contagens de leveduras nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).

Leveduras	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	4,94	4,20	5,90	0,48	9,72	**
Processado	1,42	0,00	4,70	1,40	98,59	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0.05$; ** Muito significante, $p < 0.01$

4.3.1.6 - Enterobacteriaceae

A família das Enterobacteriaceae é constituída por bactérias Gram-negativas em forma de bastonetes, móveis ou não, que podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas, sem capacidade para produzir esporos mas que fermentam a glucose e reduzem os nitratos a nitritos, e a que pertencem, entre outros, os géneros *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Proteus* spp., *Yersinia* spp., *Morganella* spp., *Erwinia* spp., *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. e *Klebsiella* spp. (Mossel & Garcia, 1985; Anderson & Pascual, 2000; Pandey *et al.*, 2000).

Algumas das espécies pertencentes a esta família de microrganismos têm importância como agentes potencialmente patogénicos e outras como saprófitas que contribuem para a deterioração de alguns alimentos, mas o principal interesse da sua determinação reside no facto de constituírem um adequado índice de qualidade para os alimentos processados; para os alimentos cujo processamento térmico é insuficiente para eliminar a maioria das formas vegetativas bacterianas, é preferível usar como indicador de contaminação fecal a *E. coli* (Varnam & Sutherland, 1995; Pandey *et al.*, 2000).

No Quadro 19 apresentam-se os resultados médios das contagens de Enterobacteriaceae. Como seria de esperar verificou-se um decréscimo, após o processamento térmico, superior a 4 unidade logarítmicas, sendo muito significativa ($P < 0,01$) a diferença entre o valor contado antes (5,96 log ufc/g) e após (1,73 log ufc/g) o processamento térmico.

Quadro 19 - Valores médios das contagens de Enterobacteriaceae nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).

Enterobacteriaceae	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	5,96	4,17	7,63	0,97	16,28	
Processado	1,73	0,00	5,36	2,06	119,08	**

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0,05$; ** Muito significante, $p < 0,01$

As contagens elevadas no produto não processado reforçam a ideia de baixa qualidade higiénica das matérias-primas empregues no fabrico dos Maranhos, mas o valor máximo de 5,36 log ufc/g de produto verificado nas contagens realizadas no produto já processado é superior ao desejado e é certamente reflexo de más práticas de fabrico, com a ocorrência de recontaminação após o tratamento térmico que pode comprometer a segurança e a longevidade do produto.

4.3.1.7 - Bactérias ácido lácticas

As BAL são consideradas um dos principais grupos de bactérias associados à deterioração dos produtos cárneos cozidos, embalados e mantidos em refrigeração, verificando-se que uma presença de 7 log ufc/g de *Lactobacillus* spp. somente em 10% dos casos proporciona sinais evidentes de deterioração neste tipo de produtos; o período de tempo que decorre desde que este valor é atingido até à manifestação desses sinais depende da temperatura de conservação, e pode aumentar 60% se conservados a 2 °C comparativamente a 4 °C (Korkeala *et al.*, 1987; Borch *et al.*, 1996; Franz & von Holly, 1996).

Juntamente com os microrganismos psicrotróficos, as BAL constituem um dos grupos microbianos que predominam e que melhor se multiplicam nos produtos mantidos em refrigeração, por serem um grupo de bactérias largamente distribuído no ambiente e se desenvolverem facilmente em substratos ricos em hidratos de carbono, com produtos de degradação proteica, vitaminas e com relativamente baixa tensão de oxigénio (Huis in't Veld, 1996; López-Díaz *et al.*, 2000; Esteves, 2005).

No Quadro 20 são apresentados os valores médios das contagens de BAL em Maranhos crus e cozidos. Novamente se verifica o impacto que o processamento térmico teve na diminuição deste tipo de bactérias, sendo muito significativa ($P < 0,01$) a diferença entre os iniciais 5,63 log ufc/g e os finais 1,09 log ufc/g no produto já processado.

Note-se, porém, que a presença de BAL nem sempre constitui uma desvantagem para a qualidade e ou conservação dos produtos cárneos, conhecidas que são as suas virtudes em produtos fermentados mas também nos cozidos, desempenhando

frequentemente uma acção protectora do alimento quer pela produção de ácido láctico e consequente diminuição do pH, quer pela produção de bacteriocinas com importante efeito inibidor no desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Jouve *et al.*, 1980; López-Díaz *et al.*, 2000; Čurda, 2000).

Quadro 20 - Valores médios das contagens de BAL nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).

Bactérias ácido lácticas	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	5,63	3,63	7,54	0,83	14,74	**
Processado	1,09	0,00	4,58	1,44	132,11	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0.05$; ** Muito significante, $p < 0.01$

Note-se, porém, que a presença de BAL nem sempre constitui uma desvantagem para a qualidade e ou conservação dos produtos cárneos, conhecidas que são as suas virtudes em produtos fermentados mas também nos cozidos, desempenhando frequentemente uma acção protectora do alimento quer pela produção de ácido láctico e consequente diminuição do pH, quer pela produção de bacteriocinas com importante efeito inibidor no desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Jouve *et al.*, 1980; López-Díaz *et al.*, 2000; Čurda, 2000).

4.3.1.8 - *Escherichia coli*

A *E. coli* é um microrganismo que pertence à família das Enterobacteriaceae e que existe naturalmente no intestino do Homem e dos animais de sangue quente, sendo por isso um bom indicador de contaminação fecal, mesmo que a sua dificuldade em sobreviver em ambiente extraentérico implique que a sua presença nos alimentos seja quase sempre sinónimo de uma contaminação recente (Anderson & Pascual, 2000 Batt; 2000^d).

Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, geralmente móvel em forma de bastonete, desenvolve-se entre os 7 °C e os 42 °C, é sensível ao calor e às temperaturas de congelação; na maioria das vezes é inócua mas algumas estirpes são patogénicas para o Homem e provocam toxinfecções alimentares mediante patologias distintas que frequentemente estão associadas ao consumo de alimentos como a água, vegetais, leite cru, queijos de pasta mole, carne e produtos cárneos (Mead & Griffin, 1998; Hau-Yang, 2000; Oteiza *et al.*, 2006).

A presença de *E. coli* nos alimentos fica quase sempre a dever-se a más práticas de fabrico e falta de cuidados de higiene por parte dos manipuladores, mas também pode ser veiculada por matérias-primas de baixo nível higiénico. A sua presença constitui deste modo um excelente indicador relativo à higiene dos alimentos, alertando também para a eventual presença de outros microrganismos entéricos potencialmente mais perigosos como a *Salmonella* spp. e a *Shigella* spp. (Mossel *et al.*, 1995; Oteiza *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2008).

No Quadro 21 são apresentados os valores das contagens de *E. coli* nos Maranhos crus e nos Maranhos depois de processados, constatando-se que as diferenças entre os resultados são muito significativas ($P < 0,01$), o que reflecte o efeito positivo do processamento térmico sobre a qualidade higiénica do produto final.

Porém, é menos positivo o facto do valor máximo de *E. coli* encontrado no produto já processado ser de 2,19 log ufc/g, pois mesmo tratando-se de um produto para conservar em refrigeração, abaixo dos 4 °C, tal reflecte falta de cuidados de higiene após o processamento térmico que comprometem todos os benefícios alcançados, podendo mesmo existir o perigo dos produtos serem também contaminados com outros microrganismos de origem entérica.

Quadro 21 - Valores médios das contagens de *Escherichia coli* nos Maranhos em função do processamento térmico (log ufc/g).

<i>Escherichia coli</i>	Média	Mín.	Máx.	s	s%	P
Não processado	2,62	1,30	4,90	0,72	27,48	**
Processado	0,23	0,00	2,19	0,59	256,52	

N.S. Não significante; * Significante, $p < 0,05$; ** Muito significante, $p < 0,01$

4.3.1.9 - Esporos de clostrídios sulfito-redutores

O grupo bacteriano dos sulfito-redutores é constituído por germes pertencentes ao género *Clostridium* spp. que têm em comum a capacidade de reduzir o sulfito a sulforeto; são frequentemente utilizados na avaliação da qualidade higiénica da água e dos produtos de origem animal apesar da sua presença em produtos frescos ser diminuta e da sua detecção ser muitas vezes dificultada pelo facto de muitas das espécies mais relevantes esporularem de forma escassa (Mossel *et al.*, 1995; Hubbert *et al.*, 1996; Anderson & Pascual, 2000).

Trata-se de microrganismos ubíquos, frequentes no solo, sedimentos marinhos, plantas, intestino e nas feridas infectadas do Homem e de outros animais; são anaeróbios ou microaerófilos, capazes de produzir esporos extremamente resistentes às temperaturas elevadas e que constituem por isso um potencial perigo para os produtos cujas barreiras de conservação assentam no processamento térmico e na anaerobiose; as espécies mais relevantes para a saúde humana são o *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani* e *C. difficile* (Lund, 1990; Mossel *et al.*, 1995; Blaschek, 2000^a).

Como pode constatar-se pela observação do Gráfico 5, após o processamento térmico 100% das amostras analisadas foram negativas em 1g de produto, apesar de inicialmente a sua presença ter sido detectada em 31,25% das amostras de Maranhos crus, sem que isso constituísse motivo de estranheza considerando a proveniência das matérias-primas, em especial o invólucro deste enchido.

O facto deste grupo de microrganismos marcadores não persistir no produto processado e apesar do nível de contaminação com *C. botulinum* em produtos cárneos ser frequentemente baixo, a confirmação da eficiência do processamento térmico permite uma maior segurança, considerando que a letalidade verificada não excluía a hipótese de sobrevivência dos esporos mais resistentes das espécies de *C. botulinum* mesófilas, cujo desenvolvimento ficava então exclusivamente limitado pelas baixas temperaturas de conservação (ICMSF, 1996; Fernández & Peck, 1999; Peck & Stringer, 2005).

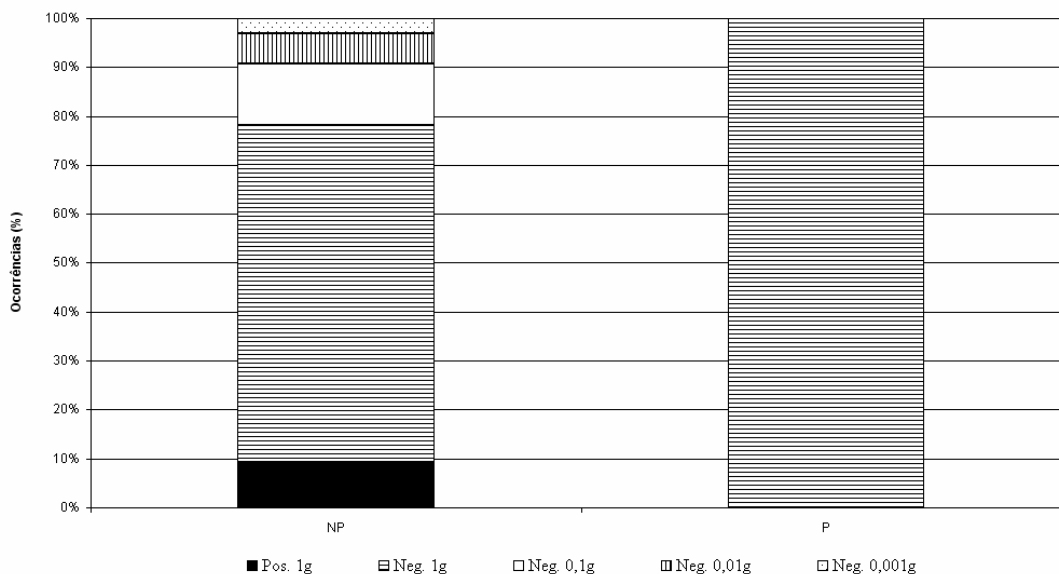


Gráfico 5 – Ocorrência de esporos de clostrídios sulfito redutores em Maranhos não processados (NP) e processados termicamente (P).

4.3.1.10 - *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria da família das *Micrococaceae*, em forma de cocos, Gram-positiva, que se agrupa de forma irregular em cachos, é desprovida de motilidade e de capacidade de esporular, sensível ao calor e à acção dos desinfetantes mas também extremamente resistente a condições ambientais adversas como baixos valores de a_w (Patarata, 1995^b; Luppens *et al.*, 2002; Reinoso *et al.*, 2008).

Estas bactérias são frequentemente isoladas a partir da pele, cabelo e nasofaringe de humanos (portadores sãos) e animais de sangue quente, sendo algumas capazes de produzir enterotoxinas responsáveis pelo síndrome de enterotoxicose estafilocócica, facto que é particularmente grave quanto estas toxinas são extremamente resistentes ao calor podendo muitas vezes persistir no produto já processado, livre de formas viáveis deste microrganismo (ICMSF, 1996; Anderson & Pascual, 2000; Esteves, 2005).

De facto, algumas estirpes podem não ser detectadas ou a sua presença ser muito baixa nos alimentos, mas tal não invalida que se encontrem presentes ou que existam já quantidades de toxina capazes de surtir efeito, e tratando-se de um microrganismo oportunista em condições de baixa competição microbiana poderá vir facilmente a

desenvolver-se, o que é sempre manifesto sinal de falta de higiene ligada a deficiências de manipulação (Patarata, 1995^b; Hubbert *et al.*, 1996; Harvey & Gilmour, 2000).

No Gráfico 6 estão apresentados os resultados das pesquisas de *S. aureus* nos Maranhos crus e nos Maranhos já cozinhados. Constata-se que a percentagem de amostras com resultados negativos em 1g melhorou com o processamento térmico, passando dos iniciais 59,37% para os 84,37% após a cocção.

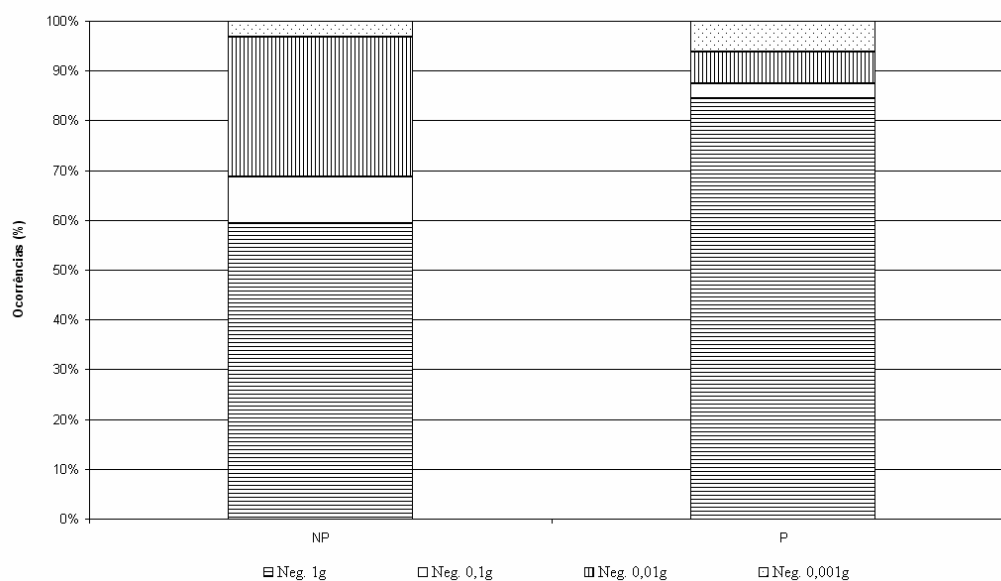


Gráfico 6 - Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em Maranhos não processados (NP) e processados termicamente (P).

No entanto continuou a encontrar-se *S. aureus* no produto já processado, com 3,13% das amostras a revelarem a ausência deste microrganismo só quando a alíquota tomada para análise foi de 0,1 g e 6,25% em 0,01 g e em 0,001g de produto.

Embora esta bactéria apresente uma resistência ao calor idêntica à da *L. monocytogenes*, a sua presença no produto final talvez se deva essencialmente a deficiências na manipulação dos Maranhos após o processamento térmico. A resolução deste problema passará pela conveniente formação e motivação dos manipuladores envolvidos (ACMSF, 1993; ICMSF, 1996; Esteves, 2005).

Não é contudo de esperar que os *S. aureus* que persistem no produto cozido venham a desenvolver-se e a produzir toxinas, se os Maranhos forem conservados em refrigeração a temperaturas inferiores a 4 °C, pois este microrganismo não se

desenvolve a menos de 10 °C ou mesmo 15 °C, em condições de embalagem em anaerobiose (ACMSF, 1993; Harvey & Gilmour, 2000).

4.3.1.11 - *Salmonella* spp.

O género *Salmonella* spp. pertence à família das Enterobacteriaceae e é formado por bactérias Gram-negativas em forma de bacilo, não esporulantes, aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de se desenvolver a temperaturas compreendidas entre os 7 °C e os 49,5 °C, constituindo um dos microrganismos patogénicos com maior responsabilidade a nível mundial na ocorrência de toxinfecções alimentares associadas aos mais variados tipos de alimentos (Cox, 2000^a; Thong *et al.*, 2002; Almeida, 2008).

O seu carácter ubíquo e a sua conhecida resistência a condições ambientais desfavoráveis fazem da *Salmonella* spp. um dos microrganismos patogénicos mais perigosos e difíceis de controlar, o que associado à sua capacidade de crescimento a baixas temperaturas lhe possibilita prevalecer em ambientes como os das indústrias alimentares. Os produtos à base de carne, leite e ovos quando consumidos após tratamento térmico insuficiente ou recontaminação pós processamento geralmente devida a deficientes cuidados higiénicos dos manipuladores são importantes veículos deste microrganismo (Cox, 2000^b; Hammack & Andrews, 2000; Vieira-Pinto, 2008).

Atendendo ao Gráfico 7 verifica-se que existe uma frequência muito baixa de *Salmonella* spp. nos Maranhos, 3,13% no produto cru, que corresponde a 1 caso positivo num total de 32 amostras analisadas e a sua ausência completa no produto cozinhado, transparecendo que as matérias primas estavam pouco ou nada contaminadas com este microrganismo e que a produção foi feita em boas condições de higiene e no respeito pelas boas práticas de fabrico.

O facto de pequenas quantidades de *Salmonella* spp. poderem provocar doença torna particularmente importante garantir a sua completa ausência nos alimentos prontos a comer, o que é possível através da eleição cuidada das matérias primas, com um eficiente processamento térmico acima de 63 °C e a aplicação criteriosa de normas de fabrico que contemplem especialmente os perigos de recontaminação e o respeito pela manutenção a temperaturas abaixo de 7 °C ou preferencialmente 4 °C ao longo de

todo o ciclo de produção e distribuição (Nicholas, 1995; ICMSF, 1996; Cox^a, 2000; Hammack & Andrews, 2000).

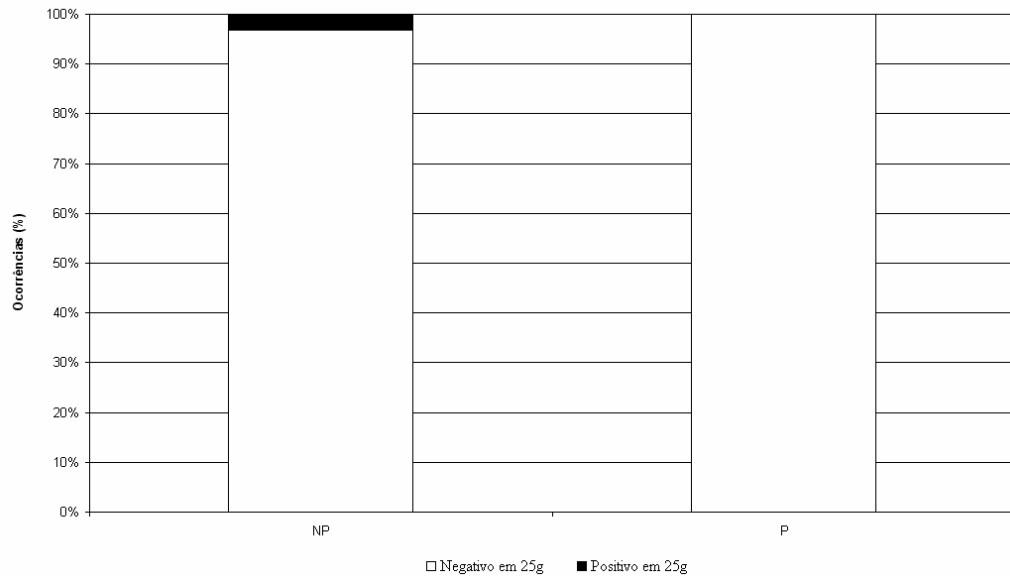


Gráfico 7 - Ocorrência de *Salmonella* spp. em Maranhos não processados (NP) e processados termicamente (P).

4.3.1.12 - *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é, quer pela sua importância para a Saúde Pública quer pelo seu impacto económico, um dos microrganismos patogénicos mais em evidência nas últimas décadas. Trata-se de um bacilo não esporulante Gram-positivo que se distribui de forma ubíqua no ambiente e é frequentemente isolado a partir das mais variadas proveniências, sendo de entre as espécies que constituem o género *Listeria* spp. a única que é patogénica para o Homem (McLauchlin, 1996; Anderson & Pascual, 2000; Ferreira, 2000).

Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa com mobilidade e que se desenvolve bem no intervalo de pH entre 5,0 e 9,0 para além do qual cessa o seu crescimento mas sobrevive. No que diz respeito à temperatura desenvolve-se entre 1 e 45°C mas prefere valores entre os 30 e os 37°C apesar de crescer bem a baixas temperaturas por ser um psicrotrófico; é facilmente destruída quando submetida à temperatura de 70°C durante 2 a 3 minutos porém o seu carácter ubíquo é muito frequentemente causa de recontaminação pós-processamento térmico com os prejuízos que daí podem ocorrer (Salvat *et al.*, 1995; Mena *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2005).

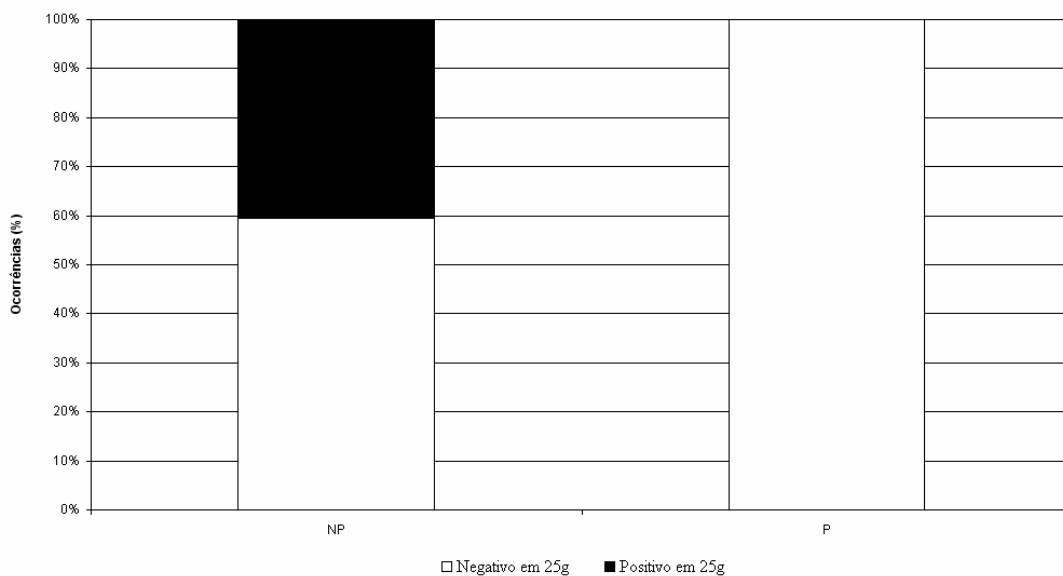


Gráfico 8 - Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em Maranhos não processados (NP) e processados termicamente (P).

Como se pode observar no Gráfico 8, foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* em 40,37 % dos Maranhos crus analisados, mas já os resultados obtidos pela análise das amostras do produto cozinhado revelaram a completa ausência deste microrganismo, reflexo da eficiência do processamento térmico no seu controlo e da aplicação pelos produtores de boas práticas de manufactura e conservação após a sua aplicação.

Não deve porém constituir motivo de aquietação o facto de não se ter encontrado *Listeria monocytogenes* nas amostras de Maranhos processados termicamente, já que

frequentemente a sua presença nos alimentos é muito baixa, inferior a 2 log ufc/g, o que dificulta a sua detecção mas não impede o seu posterior desenvolvimento ao longo do período de conservação (Batt, 2000^c; Martin & Fisher, 2000; Azevedo *et al.*, 2005).

Ao estabelecer medidas de controlo para *Listeria monocytogenes* em produtos processados, refrigerados, de vida útil prolongada, deve pois ter-se em consideração a sua ubiquidade e capacidade de sobrevivência em condições extremamente desfavoráveis, para posteriormente em circunstâncias favoráveis e na ausência de competição se poder desenvolver sem dificuldades. O problema não reside tanto no impedimento da sua presença mas antes no controlo da sua sobrevivência e desenvolvimento a fim de diminuir o seu número nos alimentos (ECFF, 1996; Anderson & Pascual, 2000; Notermans & Barendsz, 2002).

4.4 - Avaliação dos parâmetros físico-químicos nos Maranhos de tecnologia modificada

As características físico-químicas de um alimento para além de condicionar o microbiota que nele se pode desenvolver, vão também influenciar directamente as suas características organolépticas, e assim afectar, de uma forma e doutra, o prazo de validade do género alimentício (Ellis, 1996; Man, 2002; Li-Chan, 2006).

Apresentam-se de seguida, os resultados dos parâmetros físico-químicos que se consideraram mais relevantes para a avaliação das qualidades e da longevidade dos Maranhos, e do efeito da introdução das alterações tecnológicas preconizadas, sobre esses parâmetros.

4.4.1 - pH

No Gráfico 9 estão representados os valores de pH médios nos diferentes lotes de Maranhos, e a sua evolução ao longo do tempo considerado para a realização deste estudo.

No dia 0, os valores de pH dos vários lotes, L₁, L₂, L₃ e L₄ são muito idênticos, respectivamente $6,00 \pm 0,46$, $5,99 \pm 0,46$, $5,93 \pm 0,48$ e $5,92 \pm 0,49$. Estes valores não variaram ao longo dos ensaios, apesar de no Gráfico 9 se notar a partir da segunda semana uma ligeira divergência entre os valores de L₁ e de L₃ relativamente aos de L₂ e L₄.

As ligeiras diferenças registadas no último dia, em que L₁ e L₃ apresentaram um pH de, respectivamente $5,91 \pm 0,11$ e $6,10 \pm 0,20$, um pouco inferior a $5,85 \pm 0,05$ e $6,10 \pm 0,08$ verificados em L₂ e L₄, não tiveram qualquer significado estatístico e como tal não devem ser consideradas.

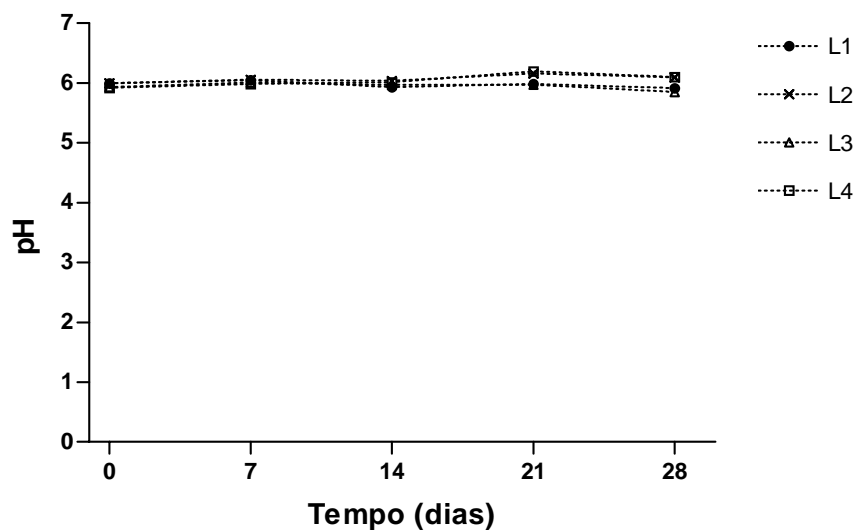


Gráfico 9 – Evolução média do valor de pH nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

Diversos factores têm influência no valor de pH e na sua evolução nos produtos cárneos, como sejam a junção de sal nitritado e de ácido ascórbico que justificam a diminuição do pH pela acção directa do ácido ascórbico, ou indirecta pela acção selectiva do nitrito na microflora produtora de ácido láctico (Jouve *et al.*, 1980; Leistner, 1986; Tompkin, 1993).

Também a natureza ligeiramente alcalina dos sais de sódio justifica, após a sua utilização, um pequeno incremento do pH, facto que igualmente pode resultar da actividade proteolítica das enzimas tissulares e ou microbianas capazes de desencadear uma acção tamponizante na massa dos enchidos curados (Fournaud, 1976; Wirth, 1992).

De qualquer modo, o pH dos Maranhos processados neste estudo continuou a não constituir uma barreira eficiente no controlo e prevenção do desenvolvimento microbiano, pelo que tem pouco interesse para a segurança e conservação deste produto. Por outro lado, o facto de o pH não variar significativamente ao longo do tempo, revela que a sua eventual utilização como critério de qualidade dos Maranhos não será possível (Leistner & Gorris, 1995; Hernández-Herrero *et al*, 1999).

4.4.2 - Actividade da água (a_w)

Os valores do a_w e a sua respectiva evolução estão representados no Gráfico 10, no qual não se observam diferenças notórias quer entre os distintos lotes, quer ao longo do tempo. No primeiro dia L_1 , L_2 , L_3 e L_4 detinham valores, respectivamente, de $0,948 \pm 0,027$, $0,943 \pm 0,028$, $0,946 \pm 0,026$ e $0,946 \pm 0,026$, que praticamente não diferiram dos valores homólogos $0,943 \pm 0,027$, $0,944 \pm 0,028$, $0,944 \pm 0,024$ e $0,944 \pm 0,029$ determinados ao vigésimo oitavo dia.

Assim, não foram notadas diferenças significativas que pudessem atribuir-se ao efeito dos tratamentos e/ou aos tempos de armazenamento.

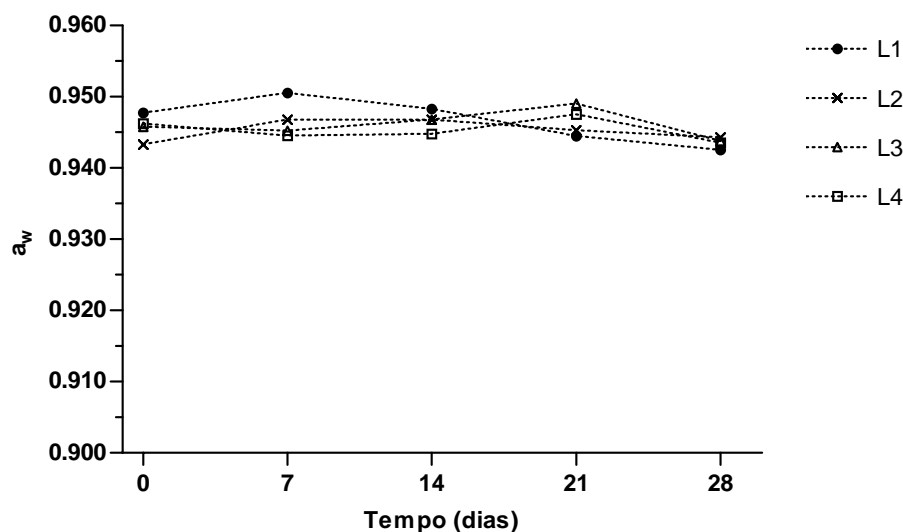


Gráfico 10 - Evolução média do valor de a_w nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

4.4.3 - Humidade

A humidade constitui, nos Maranhos como nos restantes produtos cárneos cozidos, um importante factor de qualidade que se reflecte nas propriedades organolépticas dos produtos e no rendimento obtido com a sua produção (Wirth, 1992; Varnam & Sutherland, 1995; Tilloca *et al.*, 2006).

Como pode ver-se no Gráfico 11, não houve praticamente diferenças no teor de humidade nos Maranhos dos diferentes lotes, que no dia 0 registavam para L₁, L₂, L₃ e L₄ os valores de $62,53 \pm 1,41\%$, $61,19 \pm 2,31\%$, $62,97 \pm 0,84\%$ e $63,10 \pm 0,94\%$, e se mantiveram quase inalterados praticamente não se alteraram até o final dos ensaios, quando se determinou que a humidade em L₁, L₂, L₃ e L₄ era de $62,78 \pm 2,85\%$, $62,36 \pm 2,08\%$, $62,06 \pm 1,92\%$ e $61,95 \pm 2,02\%$.

Ao analisar estatisticamente os resultados obtidos para o teor de humidade, não foi detectado qualquer efeito significativo que possa atribuir-se aos tratamentos, ao tempo ou às interações possíveis entre estes dois factores. A manutenção do teor de humidade nos Maranhos ao longo do período de tempo em que decorreu o armazenamento, ficou provavelmente a dever-se à estanqueidade da embalagem usada (Colaço do Rosário, 1989; Stöllman *et al.*, 1996; Poças & Oliveira, 1997).

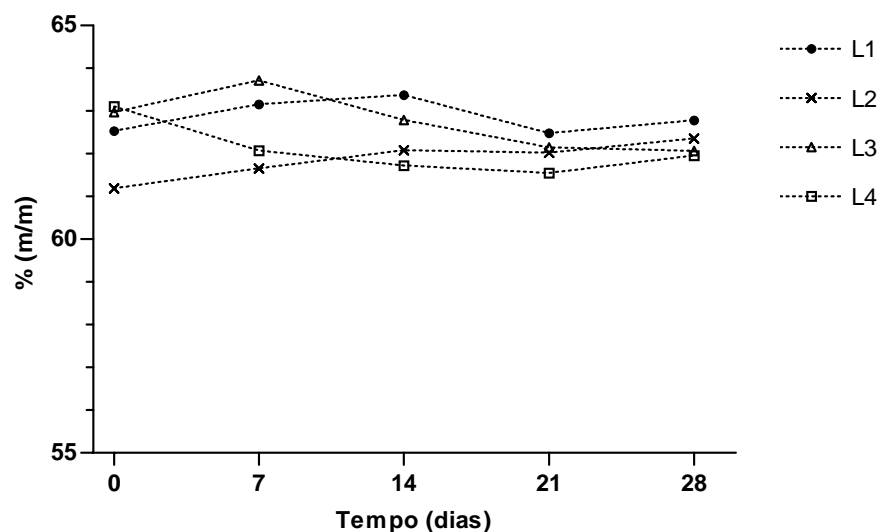


Gráfico 11 - Evolução média do teor de humidade nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

4.4.4 - Cinza total

Os resultados das determinações da cinza total nos Maranhos ensaiados, estão representados no Gráfico 12, onde se constata que os valores obtidos em todos os lotes ficaram muito próximos, com L₁, L₂, L₃ e L₄ a apresentarem no dia 0, respectivamente, $1,66 \pm 0,26\%$, $1,95 \pm 0,24\%$, $1,55 \pm 1,09\%$ e $1,77 \pm 0,25\%$, sem que se viesse a notar qualquer evolução marcada ao longo do tempo, pois os valores homólogos registados na última data foram de $1,57 \pm 0,36\%$, $1,85 \pm 0,25\%$, $1,47 \pm 0,20\%$ e $1,68 \pm 0,25\%$.

A estabilidade dos valores da cinza total ao longo do tempo pode atribuir-se ao efeito protector da embalagem que impediu de forma eficaz que se estabelecessem gradientes e consequentes migrações de humidade, mas há semelhança do que aconteceu nos cloretos, também aqui foi muito significativo o efeito do tratamento ($p < 0,01$), o que era de esperar visto existir uma correlação positiva grande entre a presença de sais nos alimentos e a sua percentagem de cinza total (Pearson, 1970; Colaço do Rosário, 1989; Li-Chan, 2006).

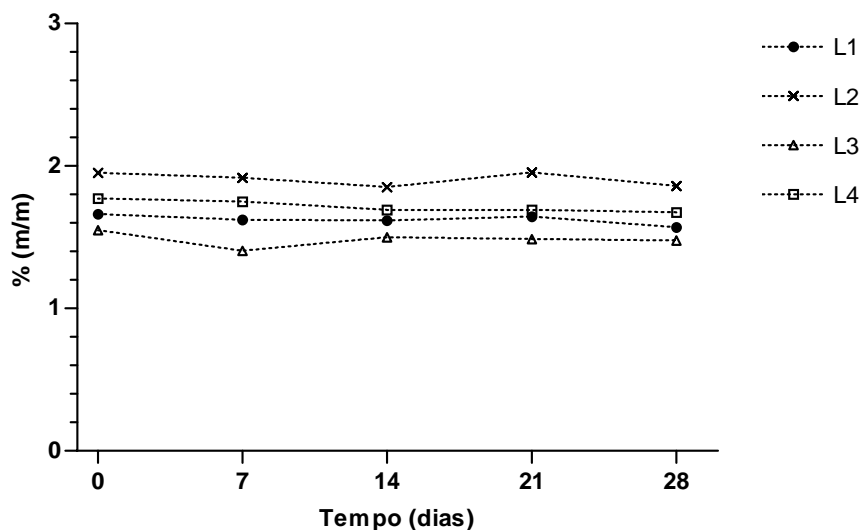


Gráfico 12 - Evolução média do teor de cinza total nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

4.4.5 - Proteína total

O conteúdo em proteína total foi praticamente igual em todos os lotes e assim se manteve durante o armazenamento, como seria de esperar.

Como se pode observar no Gráfico 13, no dia 0 em L₁, L₂, L₃ e L₄ obtiveram-se resultados de 14,55±1,71%, 14,06±1,29%, 14,21±1,69% e 14,21±2,44%, e no dia 28 de 13,63±1,77%, 13,65±1,62%, 14,36±1,89% e 14,64±2,12%.

Nem o tempo, nem o tratamento, nem as possíveis interações entre estes dois factores mostraram ter qualquer significado sobre os resultados obtidos, porém, mais uma vez, o facto de não se terem verificado migrações de humidade garantiu que o peso da fracção proteica nos Maranhos praticamente não se alterasse do princípio ao fim dos ensaios.

Nem o tempo, nem o tratamento, nem as possíveis interações entre estes dois factores mostraram ter qualquer significado sobre os resultados obtidos, porém, mais uma vez, o facto de não se terem verificado migrações de humidade garantiu que o peso da fracção proteica nos Maranhos praticamente não se alterasse do princípio ao fim dos ensaios.

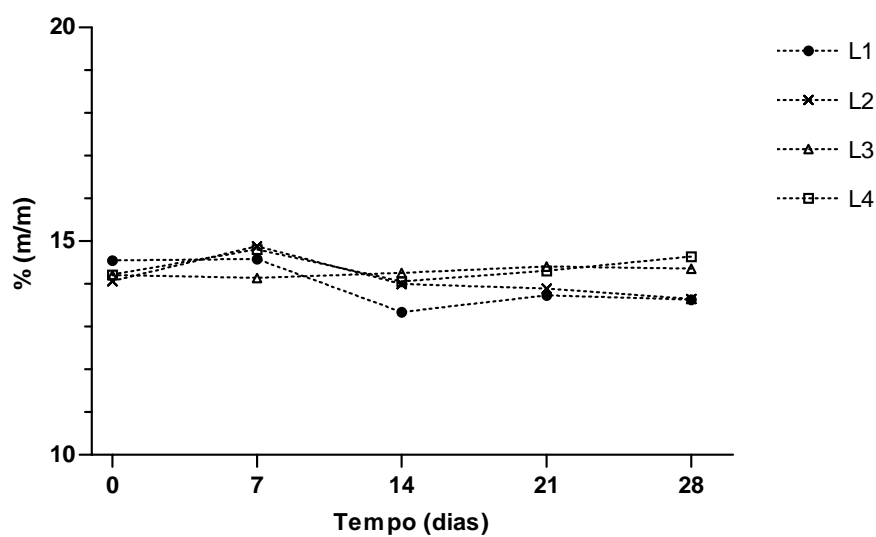


Gráfico 13 - Evolução média do teor de proteína total nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

4.4.6 - Matéria gorda livre

Também na matéria gorda livre, não se notaram diferenças dignas de reconhecimento nem entre os lotes nem ao longo do tempo, tendo L₁, L₂, L₃ e L₄ no dia 0 alcançado os resultados de 5,89±0,48%, 5,87±0,23%, 6,91±0,52% e 6,26±0,60%, que ao vigésimo oitavo dia eram respectivamente de 6,40±0,37%, 6,48±0,17%, 6,79±0,60% e 7,54±0,87% (Gráfico 14).

Como seria de prever o tempo, o tratamento e as possíveis interações entre estes dois factores não mostraram ter qualquer significado sobre os resultados obtidos, situação idêntica à discutida anteriormente para as determinações da humidade, cinzas e proteína total.

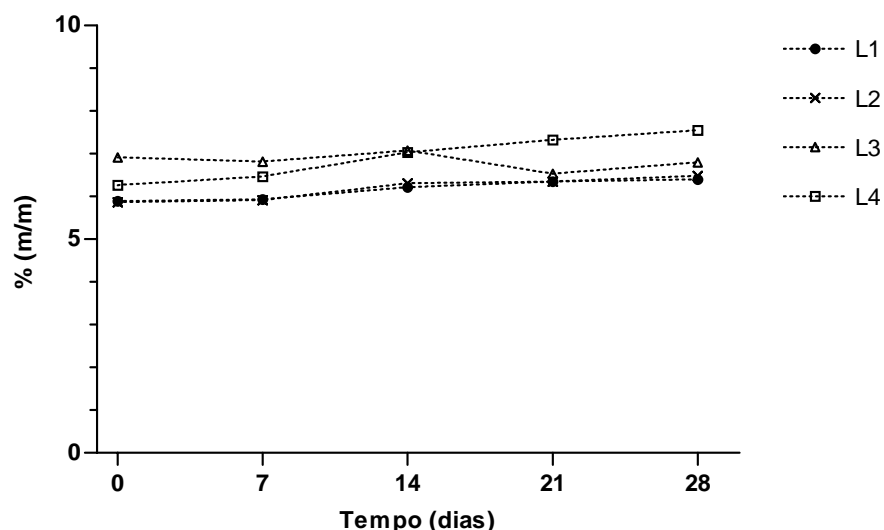


Gráfico 14 - Evolução média do teor de matéria gorda livre total nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

4.4.7 - Valor energético

A estabilidade das fracções calóricas dos Maranhos ao longo do período de armazenamento reflecte-se nos valores energéticos usados na construção do Gráfico 15, onde se constata que no dia 0, L₁, L₂, L₃ e L₄ apresentaram os resultados de 725,30±34,24 kJ/100g, 742,60±40,49 kJ/100g, 741,33±12,74 kJ/100g e 721,68±3,48 kJ/100g, valores muito próximos dos finais que foram, respectivamente, de 733,20±52,50 kJ/100g, 737,43±34,39 kJ/100g, 755,28±40,72 kJ/100g e 769,40±52,57 kJ/100g.

Também aqui, o tempo, o tratamento e as possíveis interacções entre estes dois factores não mostraram ter qualquer significado sobre os resultados obtidos, situação idêntica à relatada anteriormente para a humidade e que se repercutiu na estabilidade dos valores de cinza, proteína total e gordura total.

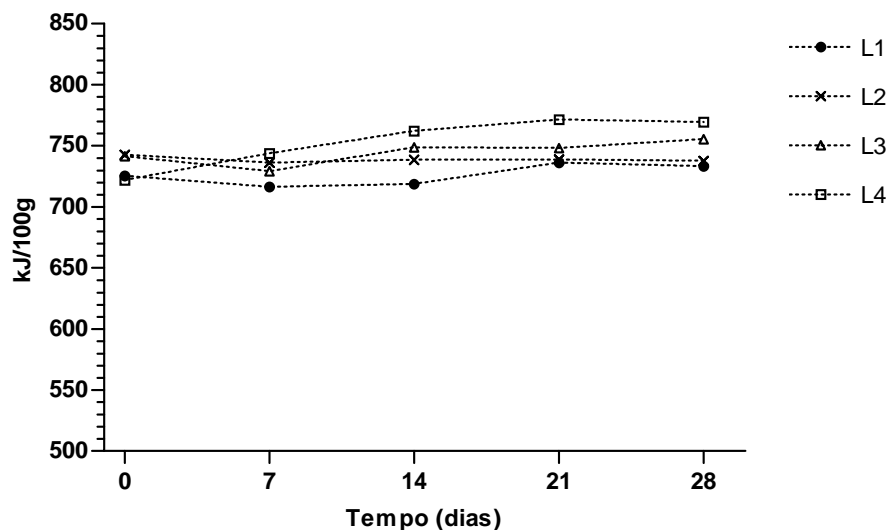


Gráfico 15 - Evolução média do valor energético nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

4.4.8 - Azoto básico volátil total (ABVT)

Os resultados deste índice de degradação proteica são apresentados no Gráfico 16. Como pode ver-se L₁, L₂, L₃ e L₄ tiveram valores de ABVT no dia 0 de, respectivamente, 21,79±5,93 mg NH₃/100g, 20,26±5,08 mg NH₃/100g, 20,65±6,04 mg NH₃/100g e 20,67±7,43 mg NH₃/100g.

Ao sétimo dia, L₁ destacava-se em relação aos restantes lotes com um valor de ABVT de 28,00±9,6 mg NH₃/100g, enquanto L₂, L₃ e L₄ permaneciam, respectivamente, com 21,84±5,076 mg NH₃/100g, 21,60±6,106 mg NH₃/100g e 22,91±5,646 mg NH₃/100g.

Porém, ao décimo quarto dia também L₃ atingiu o valor 27,14±4,43 mg NH₃/100g, valor superior aos verificados em L₂ e L₄ que se mantiveram respectivamente com 23,57±4,85 mg NH₃/100 g e 22,39±4,12 mg NH₃/100g.

Este distanciamento de L₁ e L₃ em relação aos restantes lotes terá sido consequência, de uma maior actividade microbiana registada nestes dois lotes, como se mostrará. Esta tendência manteve-se até ao final dos ensaios, altura em que L₁, L₂, L₃ e

L₄ detinham respectivamente 35,12±5,60 mg NH₃/100g, 19,01±3,24 mg NH₃/100g, 28,69±7,44 mg NH₃/100g e 21,83±8,71 mg NH₃/100g.

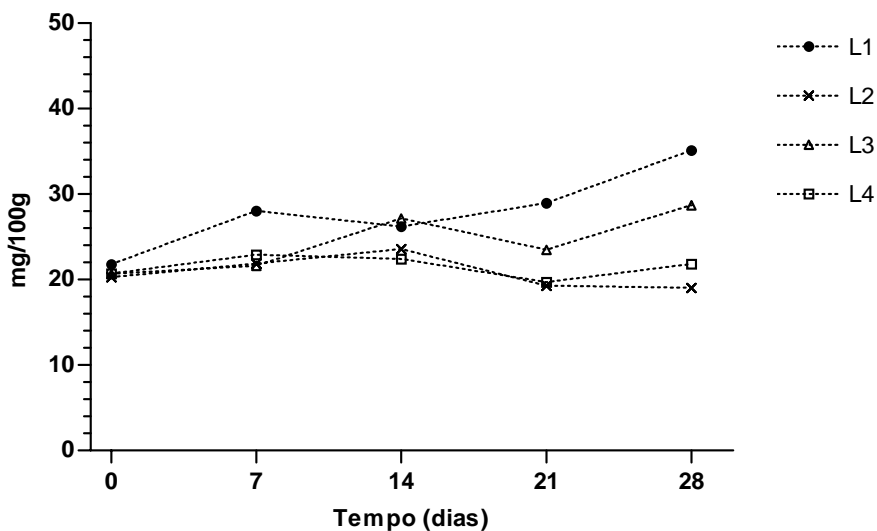


Gráfico 16 - Evolução média do ABVT nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

Para testar a interacção entre o tratamento e o efeito linear e quadrático do tempo no ABVT, realizou-se uma análise de co-variância que não obteve qualquer relação significativa.

Porém, o teste de interacção entre os tratamentos e o efeito linear do tempo mostrou que era significativo o efeito tempo ($p < 0,05$), e pouco significativo o efeito do tratamento vezes o tempo ($p < 0,01$), permitindo obter uma equação linear comum para a evolução do ABVT, cujos coeficientes são apresentados na Quadro 22.

De notar que em nenhum dos lotes, nem em nenhuma data se verificaram valores de ABVT superiores aos 60 mg NH₃/100g, considerados como limite máximo admissível nos produtos cárneos cozidos, o que denota que a degradação da fracção proteica dos Maranhos não constitui um factor preponderante na determinação da sua vida útil, à semelhança do que se passa com muitos outros produtos cárneos em que o final desse período é geralmente antecipado por outros critérios (IQA, 1981; Martins & Patarata, 1993; Barnett & Hie-Joon, 1998).

Quadro 22 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução do ABVT nos diferentes lotes em estudo.

	b_0	b_1
L_1	26,0321	
L_2	18,8081	0,1414
L_3	22,3336	
L_4	19,5181	

4.4.9 - Índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)

Os valores de TBA estão representados no Gráfico 17, verificando-se que L_1 e L_3 registaram os menores valores deste índice de oxidação lipídica, que no dia 0 era de respectivamente $0,40\pm 0,23$ mg de aldeído malónico/kg e $0,40\pm 0,20$ mg de aldeído malónico/kg em cada um destes lotes.

Foi em L_3 que se encontraram índices de TBA mais baixos e estáveis, tendo este lote terminado os ensaios em média com $0,35\pm 0,08$ mg de aldeído malónico/kg, valor praticamente idêntico ao que também foi determinado em L_1 na mesma data, $0,33\pm 0,15$ mg de aldeído malónico/kg. No entanto, neste caso já surge após um pico de $0,80\pm 0,90$ mg de aldeído malónico/kg ocorrido ao décimo quarto dia, e deve ser interpretado como sinal de uma fase mais adiantada de oxidação lipídica.

Em L_2 e L_4 os valores de TBA foram em média superiores, apresentando respectivamente $1,52\pm 0,76$ e $0,90\pm 0,21$ mg de aldeído malónico/kg no dia 0, com o pico de TBA a notar-se ao décimo quarto dia com $1,30\pm 1,27$ mg de aldeído malónico/kg em L_2 e $0,65\pm 0,36$ mg de aldeído malónico/kg e em L_4 , terminando respectivamente com $0,85\pm 0,86$ e $0,60\pm 0,16$ mg de aldeído malónico/kg (Gráfico 17).

No geral estes valores de TBA podem considerar-se baixos, inferiores a 5 mg de aldeído malónico/kg, valor associado a produtos rançosos já não edíveis, ainda que valores superiores a 0,5 mg de aldeído malónico/kg indiquem que já existe alguma oxidação, o que, a avaliar pelas reacções do painel de provadores, não parece ter

afectado a qualidade do produto (Wang *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2001; Al-Shubi & Al-Abdullah, 2002; Wang *et al.*, 2002; Nissen *et al.*, 2004) .

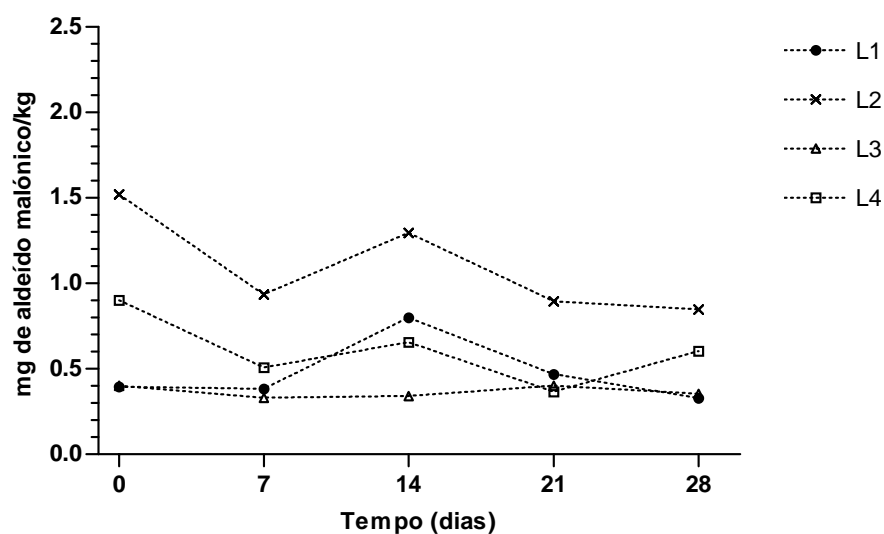


Gráfico 17 - Evolução média do TBA nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

Porém, o teste de interacção entre o tratamento e o efeito linear do tempo revelou ser muito significativo o efeito do tratamento ($p < 0,01$) e não significativo o efeito do tempo.

O que nos leva a supor que quando se utilizou o sorbato de potássio, como aconteceu em L₂ e L₄, se obtiveram valores mais altos de TBA devido à presença do ácido sórbico, mas que a utilização do nitrito juntamente com o ácido ascórbico, devido à sua acção sinérgica antioxidante, foi responsável pelos baixos valores obtidos em L₃ comparativamente com L₁, e em L₄ comparativamente a L₂ (Sofos & Busta, 1993; Bruun-Jensen *et al.*, 1996; Campos & Gerschenson, 1996).

4.4.10 - Índice de peróxidos (IP)

Os resultados do índice de peróxidos determinado com a finalidade de avaliar as primeiras fases de oxidação lipídica, estão representados no Gráfico 18. O esperado aumento inicial dos valores até se atingir um pico máximo após o qual estes deveriam

novamente descer, mas como é notório tal facto não corresponde ao aspecto do gráfico por nós obtido (Nawar, 1993, 1998; Gray *et al.*, 1996), não aconteceu nos ensaios efectuados.

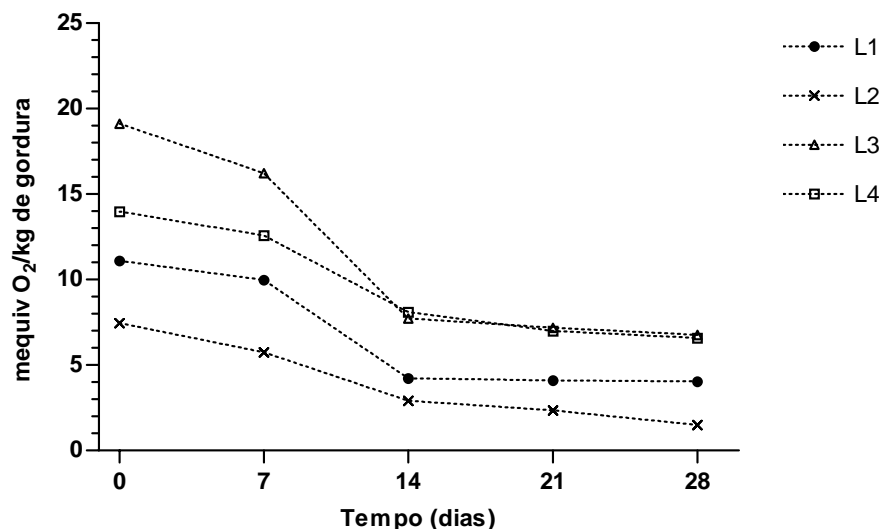


Gráfico 18 - Evolução média do IP nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

Verificou-se antes um constante declínio nos valores do IP desde o dia 0 quando L₁, L₂, L₃ e L₄ apresentavam 11,09±11,65 miliequivalente de oxigénio activo/kg, 7,46±8,71 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura, 19,11±22,94 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura e 13,97±10,83 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura, que posteriormente evoluíram para 4,03±3,34 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura, 1,50±1,74 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura, 6,76±4,44 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura e 6,56±5,32 miliequivalente de oxigénio activo/kg de gordura ao vigésimo oitavo dia.

A justificação para o sucedido poderá eventualmente relacionar-se com o facto dos intervalos de tempo entre análises serem demasiado largos, e conseqüentemente não se ter adquirido a informação analítica relativa ao pico de IP que hipoteticamente terá acontecido durante a primeira semana.

Deste modo, considerando que os valores mais elevados de IP correspondem a fases mais precoces da globalidade do processo oxidativo, talvez que nos lotes L₃ e L₄ a utilização do nitrito de sódio com o ácido ascórbico tenha contribuído para atrasar o

processo oxidativo dos Maranhos, e que a presença do ácido sórbico em L₂ tenha acelerado esse mesmo processo (Campos *et al.*, 1995; Campos & Gerschenson, 1996).

Esta convicção assenta no facto do teste de interacção entre os tratamentos e o efeito linear do tempo, ter reconhecido, embora como pouco significativo, o efeito do tratamento ($p < 0,10$), e como muito significativo o efeito do tempo ($p < 0,01$), o que permitiu estabelecer as equações lineares comuns cujos coeficientes estão apresentados no Quadro 23.

Quadro 23 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução do IP nos diferentes lotes em estudo.

	b_0	b_1
L ₁	11,1521	
L ₂	8,4591	-0,3194
L ₃	15,8671	
L ₄	14,1096	

4.4.11 - Índice de acidez da gordura

Também ao longo do processo de oxidação lipídica é de esperar um aumento da acidez da gordura, consequência de uma cada vez maior quantidade de ácidos gordos libertados por acção lipolítica (Nawar, 1993, 1998; Botsoglou *et al.*, 2003).

No Gráfico 19, está representada a forma como essa evolução decorreu nos diferentes lotes ao longo do tempo de armazenamento, verificando-se comportamentos próximos nos lotes L₁ e L₃ que no dia 0 detinham respectivamente $3,64 \pm 0,94$ % de ácido oleico e $2,77 \pm 0,47$ % de ácido oleico, tendo terminado os ensaios com $3,16 \pm 0,25$ % de ácido oleico e $3,14 \pm 0,59$ % de ácido oleico.

Já em L₂ e L₄ obtiveram-se valores superiores, $4,36 \pm 0,67$ % de ácido oleico e $4,52 \pm 1,89$ % de ácido oleico no dia 0, e $5,92 \pm 0,52$ % de ácido oleico e $4,98 \pm 0,82$ % de ácido oleico no último dia.

Estas diferenças serão, uma vez mais, como para o TBA e IP, devidas à utilização do ácido sórbico em L₂ e em L₄, pois foi muito significativo o efeito do tratamento ($p < 0,01$), revelado pelo teste de interação entre os tratamentos e o efeito linear do tempo (Sofos & Busta, 1993; Gray *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 2005).

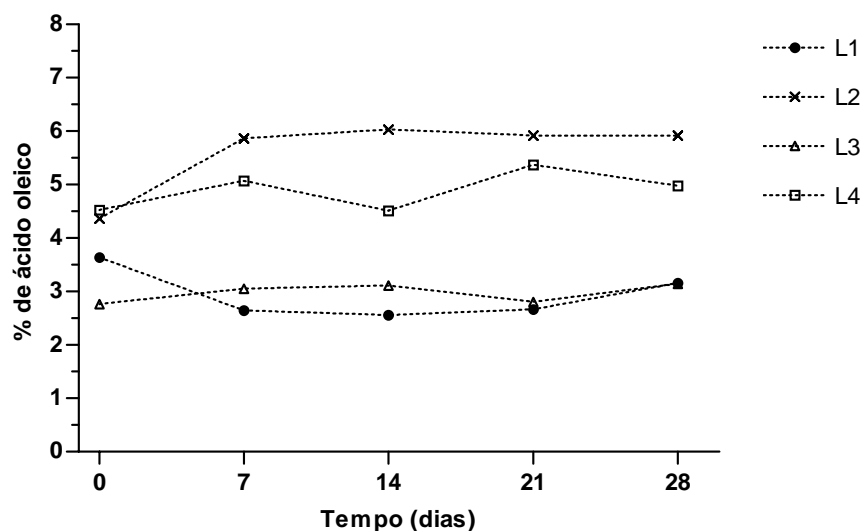


Gráfico 19 - Evolução média do índice de acidez da gordura nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

Por outro lado, o facto de não se notar uma significativa evolução do índice de acidez da gordura ao longo do tempo, estará relacionado com o baixo teor de gordura da carne de cabra e consequentemente dos Maranhos, o que pode também justificar os baixos valores dos índices de oxidação lipídica anteriormente avaliados, e levar a supor não ser este fenómeno oxidativo uma importante limitação para a vida útil dos Maranhos dentro do intervalo de tempo considerado (Gadiyaram & Kannan, 2004; Galipalli *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008^b).

4.4.12 - Teor de cloretos

Relativamente ao teor de cloretos nos Maranhos, cujos resultados estão patentes no Gráfico 20, foram observadas diferenças entre os valores determinados no dia 0 para os lotes L₁ e L₂ e os obtidos para L₃ e L₄, ou seja $1,10 \pm 0,15\%$, $1,10 \pm 0,10\%$, $0,88 \pm 0,03\%$

e $0,84 \pm 0,19\%$, números que praticamente permaneceram inalterados até ao vigésimo oitavo dia quando eram respectivamente de $1,00 \pm 0,19\%$, $1,05 \pm 0,18\%$, $0,87 \pm 0,14\%$ e $0,88 \pm 0,09\%$.

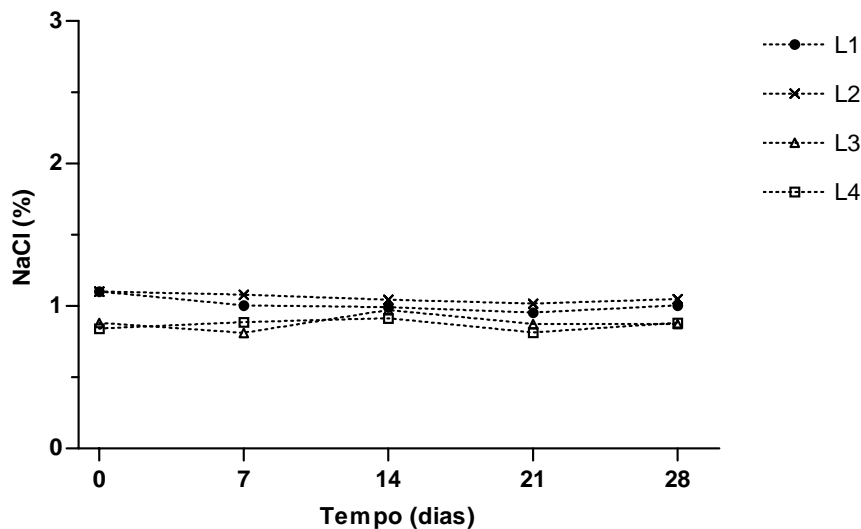


Gráfico 20 - Evolução média do teor em cloretos nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

Estes valores podem considerar-se baixos, com todos os benefícios e inconvenientes que já foram anteriormente referidos, e o facto de se ter utilizado uma embalagem estanque no acondicionamento dos Maranhos, capaz de impedir migrações de humidade entre o produto e o ambiente permitiu que os valores se mantivessem praticamente constantes ao longo do tempo de armazenamento (Colaço do Rosário, 1989; Ranken, 2000; Vaudagna *et al.*, 2008).

Já as diferenças muito significativas ($p < 0,01$) entre lotes, denotadas pela análise de co-variância realizada com o fim de testar a interacção entre o tratamento e o efeito linear do tempo, podem talvez ser justificadas pelo facto de em L₂ e em L₄ o sal utilizado ter sido preparado laboratorialmente, logo de proveniência distinta da do sal comum em uso na salsicharia que foi aplicado em L₁ e em L₃ e eventualmente teria uma densidade menor.

Este facto terá induzido em erro a operadora responsável pelo tempero dos Maranhos, pois que a pesagem dos ingredientes não é prática comum, ficando a

utilização da balança reservada quase exclusivamente para o momento da transação comercial do produto.

4.4.13 - Teor em nitritos

É no Gráfico 21 que estão representados os teores em nitritos verificados em cada um dos lotes e a forma como a sua presença foi evoluindo ao longo do tempo, verificando-se que em nenhum dos casos se ultrapassaram os 75 mg/kg estabelecidos como limite legal para a utilização deste conservante (Directiva 95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Fevereiro).

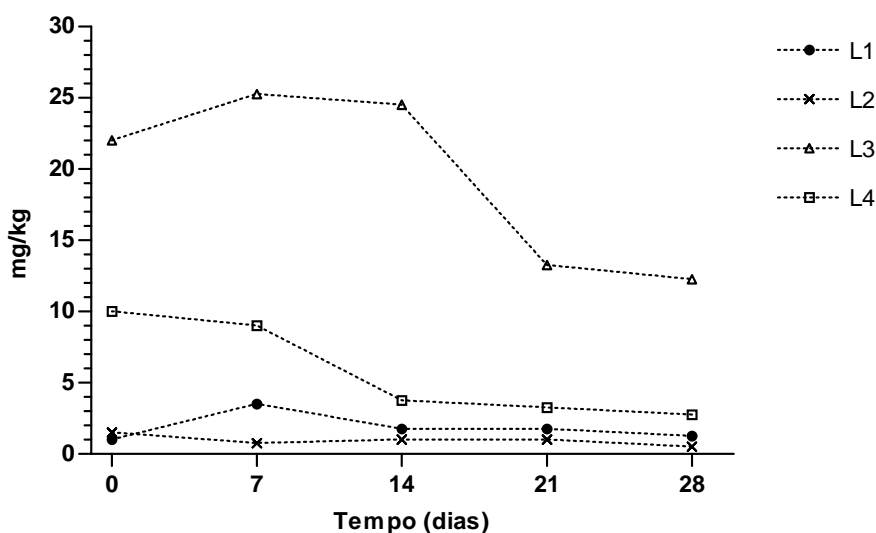


Gráfico 21 - Evolução média do teor em nitritos nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

Os valores obtidos comprometem mesmo a sua eficácia como agente de segurança dos produtos cárneos, mas parecem ser suficientes para fixar a cor a um nível desejável e contribuir para o desenvolvimento de um aroma mais agradável, tal como poderá posteriormente constatar-se pelos resultados das provas de análise sensorial realizadas.

Como seria de esperar uma vez que não houve adição intencional de nitritos, nos lotes L₁ e L₂ os valores obtidos foram residuais e não ultrapassaram respectivamente

1,00±0,00 mg/kg e 1,50±1,00 mg/kg no dia 0, mantendo-se praticamente constantes até ao último dia, quando L₁ tinha 1,75±0,26 mg/kg e L₂ 0,50±0,58 mg/kg.

Estes valores residuais deverão ter origem em contaminações do sal usado, nas matérias-primas, na actividade de alguns microrganismos com acção nitrificante, ou também na utilização de alguns produtos curados como o presunto e o chouriço, que como referido podem eventualmente ser usados na massa dos Maranhos (Colaço do Rosário, 1989; Schuddeboom, 1993; Tompkin, 1993).

Por outro lado, a utilização do sal nitritado no tempero dos Maranhos de L₃ e L₄, está bem patente nos valores registados nestes lotes, que no dia 0 apresentaram respectivamente 22,00±6,68 mg/kg e 10,00±8,91 mg/kg.

Estes valores iniciais foram depois, como era esperado, decaindo ao longo do tempo, facto que em L₄ foi visível logo a partir do sétimo dia, com 9,00±10,86 mg/kg, e que se prolongou até o final dos ensaios quando já só restavam em média 2,75±6,96 mg/kg.

Este declínio mais pronunciado em L₄ será devido ao facto do metabissulfito se combinar de forma irreversível com o nitrito e assim diminuir a sua presença, razão pela qual é desaconselhada a utilização combinada de nitritos e sulfitos quando se pretende o efeito conservante dos primeiros, ou inversamente é considerada uma forma de diminuir a quantidade de nitritos disponíveis para potencialmente formarem nitrosaminas (Tompkin *et al.*, 1980; Wedzicha, 1984; Ough, 1993; Tompkin, 1993).

Já em L₃ o declínio foi mais lento, só se notando a partir do décimo quarto dia quando o teor de nitritos era de 24,50±22,13 mg/kg, alcançando no último dia 12,25±15,34 mg/kg.

A análise de co-variâncias feita a fim de testar a interacção entre o tratamento e o efeito linear e quadrático do tempo não teve qualquer significado, porém o teste de interacção entre os tratamentos e o efeito linear do tempo mostrou que era muito significativo o efeito tratamento ($p < 0,01$), e significativo o efeito do tempo ($p < 0,05$).

Este facto permitiu estabelecer equações lineares comuns representativas da evolução do teor em nitritos para todos os lotes, cujos coeficientes são apresentados no Quadro 24.

Quadro 24 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução do teor em nitritos nos diferentes lotes em estudo.

	b_0	b_1
L ₁	4,5875	
L ₂	3,6875	-0,1955
L ₃	22,1875	
L ₄	8,4875	

4.4.14 - Teor em sulfitos totais

No Gráfico 22 está representada a evolução média do teor em sulfitos, não se registando ao longo do tempo quaisquer vestígios nos lotes onde não foram usados, L₁ e L₃.

Já os lotes L₂ e L₄ apresentaram valores muito próximos, respectivamente de 359,64±127,45 mg/kg e 387,65±92,16 mg/kg, que após um ligeiro aumento eventualmente devido à difusão dos sulfitos no interior do produto, decaíram progressivamente para valores de respectivamente 356,42±160,3 mg/kg em L₂ e 341,93±34,10 mg/kg em L₄, certamente devido à facilidade com que este conservante se combina com outras moléculas (Wedzicha, 1984; Ough, 1993; Fazio & Warner, 1990).

A análise de co-variância feita para testar a interacção entre o tratamento e o efeito linear e quadrático do tempo não teve qualquer significado, porém o teste de interacção entre os tratamentos e o efeito linear do tempo mostrou que era muito significativo o efeito tratamento ($p < 0,01$), sem contudo ser significativo o efeito do tempo.

Apesar de não estar prevista a utilização de sulfitos como aditivo neste tipo de produto cárneo, os valores alcançados foram sempre inferiores aos 450 ppm permitidos para as *Breackfast sausages*, *Burger-meat*, *Longaniza* e *Butifarra* fresca e salsicha fresca (Directiva 95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Fevereiro).

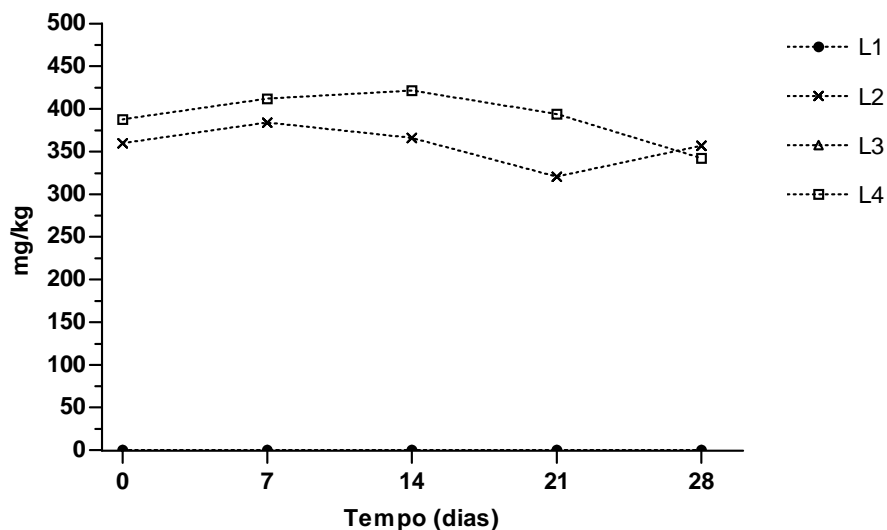


Gráfico 22 - Evolução média do teor em sulfitos nos diferentes lotes de Maranhos em estudo.

4.5 - Avaliação da evolução dos parâmetros microbiológicos

Apresentam-se, de seguida, os resultados dos parâmetros microbiológicos considerados relevantes para a avaliação do impacto das alterações tecnológicas experimentadas, com a finalidade de melhorar a qualidade higiénica dos Maranhos tradicionais e conseqüentemente o seu prazo de validade.

4.5.1 - Microrganismos

4.5.1.1 - Aeróbios totais a 30°C

No Gráfico 23 está representada a evolução das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C, nos vários lotes, ao longo dos 28 dias em que decorreu o armazenamento a 4°C.

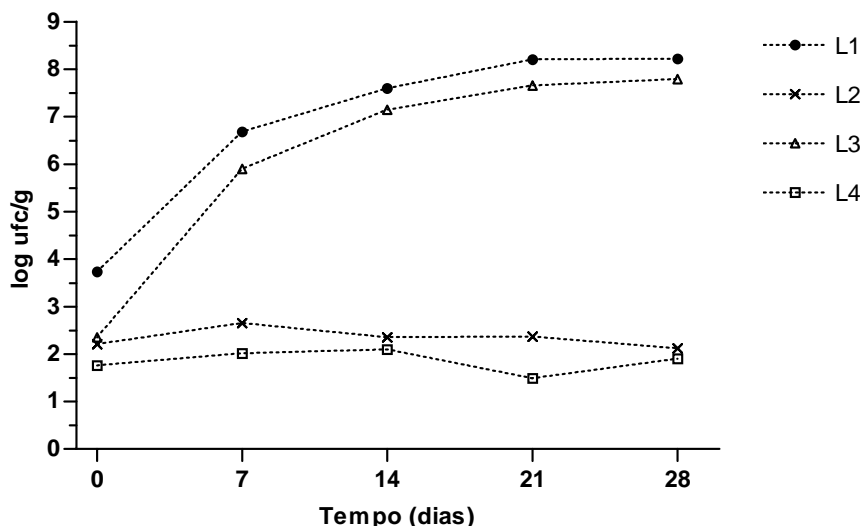


Gráfico 23 – Evolução das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4 °C.

Foi no lote testemunha, Maranhos L₁, que se verificaram logo desde o início as maiores contagens totais com $3,73 \pm 1,57$ log ufc/g, e em que ao sétimo dia já se contavam em média $6,68 \pm 0,76$ log ufc/g, valor acima do máximo aconselhado para este tipo de produtos que é de 5 log ufc/g (Mossel & Garcia, 1985; Anderson & Pascual, 2000).

Esta situação também se verificou em L₃, onde a adição de sal nitritado e ácido ascórbico não impediu que as contagens ao sétimo dia já atingissem os $5,89 \pm 0,70$ log ufc/g, apesar de inicialmente apenas se terem contado em média $2,35 \pm 1,70$ log ufc/g, resultado muito próximo dos $2,21 \pm 1,05$ log ufc/g verificados em L₂ no dia 0.

De facto, a utilização em L₂ da solução contendo sorbato de potássio e metabissulfito de sódio permitiu que estes Maranhos atingissem o final dos ensaios com contagens de microrganismos aeróbios a 30 °C que não ultrapassaram em média os $2,12 \pm 0,88$ log ufc/g, valor muito próximo dos melhores resultados obtidos com L₄ que ao vigésimo oitavo dia contava apenas $1,90 \pm 0,63$ log ufc/g, número ligeiramente acima dos iniciais $1,66 \pm 0,88$ log ufc/g.

Da análise de covariância feita aos resultados considerando a interação entre o efeito linear e quadrático do tempo com o tratamento, resultou significativo ($p < 0,05$) o efeito do tratamento e muito significativo ($p < 0,01$) o efeito do tempo, do tempo ao quadrado, do tempo vezes o tratamento e do tratamento vezes o tempo ao quadrado. O

que permitiu estabelecer 4 funções quadráticas independentes representativas do comportamento de cada um dos lotes estudados, cujos respectivos coeficientes são apresentados na Quadro 25.

Quadro 25 – Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C nos diferentes lotes em estudo.

	b_0	b_1	b_2
L₁	3,9059	0,4013	-0,0089
L₂	2,2760	0,0369	-0,0016
L₃	2,5623	0,4885	-0,0110
L₄	1,8505	0,0115	-0,0005

4.5.1.2 - Aeróbios termotróficos

Relativamente às contagens de microrganismos aeróbios termotróficos, cujos resultados se apresentam no Gráfico 24 voltou a ser L₁ o lote que piores resultados obteve, com $1,87 \pm 1,37$ log ufc/g contados no primeiro dia e $4,51 \pm 1,76$ log ufc/g no último dia.

Notou-se também que ao longo dos ensaios os valores contados corresponderam a sensivelmente metade dos valores obtidos nas contagens de aeróbios totais realizadas nas mesmas datas, o que se justifica pelo facto de muitos destes microrganismos serem mesófilos com capacidade para se desenvolverem em intervalos de temperatura mais amplos, o que lhes confere, como também sucedeu, a possibilidade de crescerem a temperaturas de refrigeração (Olson & Nottingham, 1980; Mossel *et al.*, 1995; Ross & Nichols, 2000).

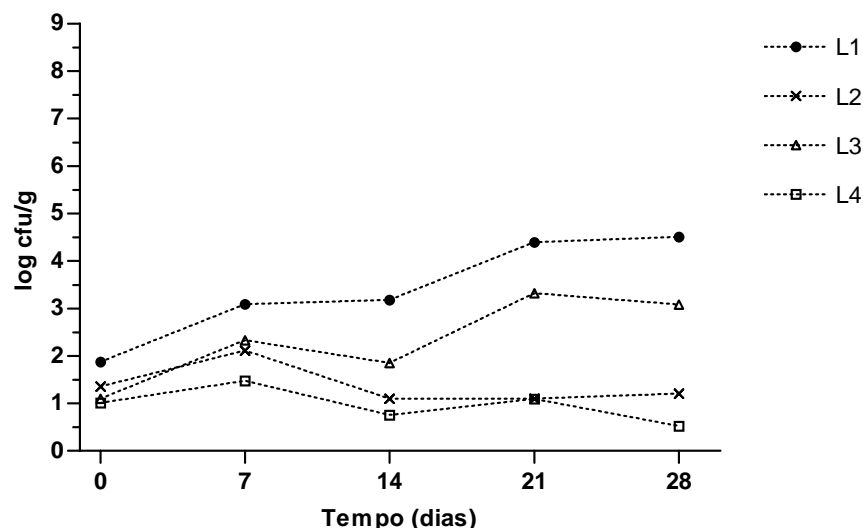


Gráfico 24 - Evolução das contagens de microrganismos aeróbios termotróficos nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.

As contagens obtidas no dia 0 em L₂, L₃, e L₄ ficaram muito próximas entre si, tendo respectivamente cada um dos lotes contabilizado $1,35 \pm 1,24$ log ufc/g, $1,10 \pm 1,27$ log ufc/g e $1,01 \pm 1,43$ log ufc/g, valores que aumentaram ligeiramente durante a primeira semana de armazenamento embora de forma menos acentuada que em L₄.

Porém, a partir do décimo quarto dia verificou-se um comportamento divergente de L₃ em relação a L₂ e a L₄, tendo L₃ alcançado os $3,32 \pm 1,30$ log ufc/g ao vigésimo primeiro dia, contrariando o sucedido em L₂ e L₄ que alcançaram a data final respectivamente com $1,20 \pm 0,83$ log ufc/g e $0,52 \pm 1,03$ log ufc/g.

Da análise de covariância feita para testar a interação entre o tratamento e o efeito linear e quadrático do tempo, não resultou qualquer função quadrática.

Porém, ao testar apenas a interação entre os tratamentos e o efeito linear do tempo, obtiveram-se diferenças significativas para o efeito do tempo ($p < 0,05$) e do tratamento vezes o tempo ($p < 0,05$). O que permitiu que, apesar do efeito simples do tratamento não ter sido significativo, se pudessem estabelecer equações lineares representativas da evolução destes microrganismos em cada um dos lotes estudados, recorrendo para tal aos coeficientes apresentados no Quadro 26.

Quadro 26 - Coeficientes das equações lineares ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução das contagens de microrganismos aeróbios termotróficos nos diferentes lotes em estudo.

	b_0	b_1
L_1	2,0885	0,0940
L_2	1,6380	-0,0188
L_3	1,3425	0,0710
L_4	1,2415	-0,0194

Parece pois que a utilização do sal nitritado e do ácido ascórbico, contribuiu também numa primeira fase para a diminuição das contagens dos microrganismos aeróbios termotróficos, prolongando ligeiramente a respectiva fase lag (Tompkin; 1993; Al-Shuibi & Al-Abdullah, 2002; Yetim *et al.*, 2004).

Já o efeito da utilização em L_2 e em L_4 do sorbato de potássio e do metabissulfito de sódio, contrariou efectivamente o desenvolvimento deste tipo de microrganismos eliminando-os de forma notória a partir do sétimo dia (Warner *et al.*, 2000; Al-Shuibi & Al-Abdullah, 2002; Machado *et al.*, 2006).

4.5.1.3 - Aeróbios psicrotróficos

Nas contagens de microrganismos aeróbios psicrotróficos, conforme se pode ver no Gráfico 25, foram uma vez mais os lotes L_1 e L_3 os que piores resultados obtiveram, tendo logo ao sétimo dia contado $6,94\pm 0,86$ log ufc/g e $6,21\pm 0,53$ log ufc/g, claramente acima dos $2,71\pm 0,90$ log ufc/g e dos $0,54\pm 1,07$ log ufc/g contados na mesma data em L_2 e em L_4 .

Os resultados destas contagens foram em todos os lotes muito semelhantes aos obtidos nas contagens de aeróbios totais a 30 °C, e a justificação para tal facto será, de novo, que os microrganismos aeróbios psicrotróficos contados são na sua grande maioria, mesófilos psicrotróficos (Olson & Nottingham, 1980; Mossel *et al.*, 1995; Ross & Nichols, 2000).

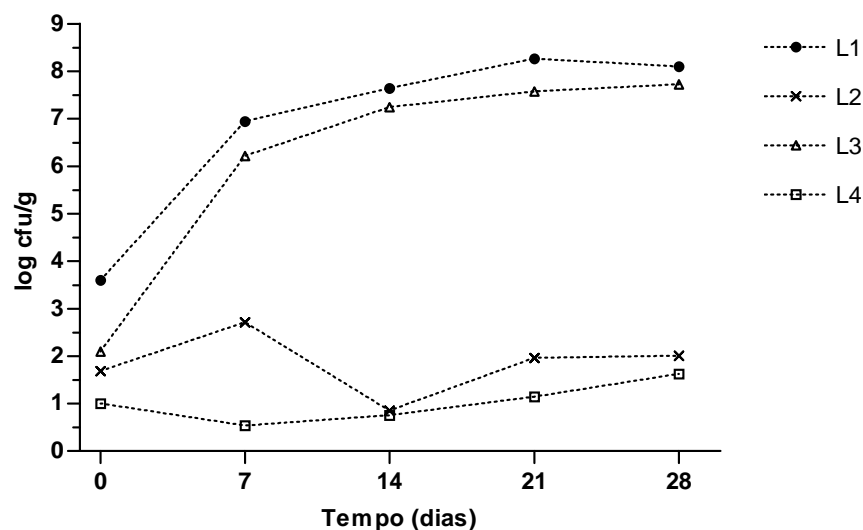


Gráfico 25 - Evolução das contagens de microrganismos aeróbios psicrotróficos nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.

Se se tiver em consideração a temperatura ambiente normal de laboração na indústria transformadora de carnes, será perceptível que a flora predominante neste tipo de estabelecimentos comportará uma grande quantidade de microrganismos que podem ser classificados como aeróbios psicrotróficos e que naturalmente irão contaminar em maior ou menor grau os produtos cárneos, de acordo com o nível de higiene das instalações, equipamentos e cuidados postos pelo pessoal na manipulação do produto, especialmente após o processamento térmico, quando exista (Varnam & Sutherland, 1995; Ranken, 2000; Blanchfield, 2005).

Embora não se tenha estudado directamente o efeito da embalagem a vácuo sobre o desenvolvimento microbiano ocorrido nos Maranhos, pois todos os lotes foram embalados de forma idêntica na mesma data, não parece que esta tenha constituído uma importante barreira no controlo dos microrganismos aeróbios psicrotróficos presentes, eventualmente porque este grupo poderá ser, neste caso, maioritariamente formado por microaerófilos ou anaeróbios facultativos (Mossel *et al.*, 1995; Rompf & Jahn, 2000; O'Mahony *et al.*, 2004).

De facto, se os $2,10 \pm 2,01$ log ufc/g contados no dia 0 em L₃ podem atribuir-se ao efeito da utilização do sal nitritado e do ácido ascórbico, ficando próximos dos

1,69±0,79 log ufc/g contados em L₂, o posterior crescimento destes microrganismos foi limitado apenas nos tratamentos que contemplaram a utilização de sorbato de potássio e metabissulfito de sódio, tendo no último dia L₂ e L₄ contabilizado respectivamente 2,01±0,80 log ufc/g e 1,62±0,53 log ufc/g, valores muitíssimo inferiores aos 8,09±0,25 log ufc/g e 7,72±0,24 log ufc/g contados em L₁ e L₃, onde a embalagem a vácuo não parece ter sido suficiente para impedir o desenvolvimento ocorrido.

A análise de covariância realizada às contagens de microrganismos aeróbios psicrotróficos considerando a interacção entre o efeito linear e quadrático do tempo com o tratamento, revelou que os efeitos do tratamento, do tempo, do tempo ao quadrado, do tempo vezes o tratamento e do tratamento vezes o tempo ao quadrado foram todos muito significativos ($p < 0,01$), possibilitando a obtenção de 4 funções quadráticas independentes representativas do comportamento de cada lote, cujos respectivos coeficientes são apresentados na Quadro 27.

Quadro 27 - Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de microrganismos aeróbios psicrotróficos nos diferentes lotes em estudo.

	b₀	b₁	b₂
L₁	3,8273	0,4373	-0,0103
L₂	2,0094	-0,0430	0,0015
L₃	2,4138	0,5327	-0,0126
L₄	0,9354	-0,0579	0,0030

4.5.1.4 - Anaeróbios psicrotróficos

Ao observar o Gráfico 26 onde estão representados os resultados relativos às contagens de microrganismos anaeróbios psicrotróficos, quase não se reconhecem diferenças em relação ao Gráfico 25 relativo aos aeróbios psicrotróficos. Este facto reforça a convicção de que efectivamente a maioria dos microrganismos que se desenvolveram eram microaerófilos ou anaeróbios facultativos, e portanto também com

capacidade para crescer se incubados em anaerobiose (Mossel *et al.*, 1995; Rompf & Jahn, 2000).

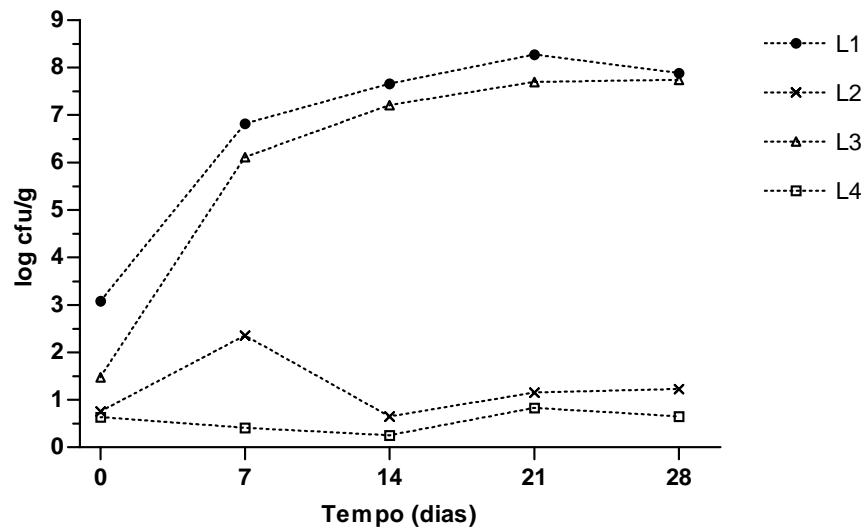


Gráfico 26 - Evolução das contagens de microrganismos anaeróbios psicrotróficos nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.

Os lotes L₂ e L₄ voltaram a destacar-se pela positiva também no que diz respeito ao desenvolvimento deste grupo de microrganismos, que pelas suas características não vê o seu crescimento limitado pela embalagem a vácuo nem pela temperatura de refrigeração. Ao vigésimo oitavo dia L₂ e L₄ mostravam contagens de, respectivamente, $1,22 \pm 0,85$ log ufc/g e $0,65 \pm 0,75$ log ufc/g, quando L₁ e L₃ já tinham atingido respectivamente, $6,81 \pm 0,82$ ufc/g e $6,11 \pm 0,58$ ufc/g logo no sétimo dia de armazenamento.

Também neste caso a análise de covariância realizada considerando a interação entre o efeito linear e quadrático do tempo com o tratamento, revelou que os efeitos do tratamento, do tempo, do tempo ao quadrado, do tempo vezes o tratamento e do tratamento vezes o tempo ao quadrado foram todos muito significativos ($p < 0,01$), o que permitiu obter 4 funções quadráticas independentes representativas do comportamento dos microrganismos anaeróbios psicrotróficos em cada um dos lotes estudados, utilizando para esse efeito os coeficientes apresentados na Quadro 28.

Quadro 28 - Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de microrganismos anaeróbios psicrotróficos nos diferentes lotes em estudo.

	b_0	b_1	b_2
L_1	3,3166	0,5039	-0,0124
L_2	1,1581	0,0309	-0,0012
L_3	1,8200	0,6010	-0,0143
L_4	0,5839	-0,0272	0,0012

4.5.1.5 - Bolores

O facto de os bolores serem microrganismos aeróbios estritos certamente teve influência nos resultados apresentados no Gráfico 27, em que independentemente dos lotes, se verificaram sempre valores muito baixos nas contagens, que resultaram do efeito do processamento térmico e dos posteriores cuidados na manipulação do produto cozido, mas provavelmente também porque os Maranhos foram embalados a vácuo (Mossel *et al.*, 1995; Filtenborg *et al.*, 1996; Khachatouranis & Arora, 2000).

Assim, contaram-se no dia 0 em L_1 , L_2 , L_3 e L_4 respectivamente $0,87\pm 0,62$ log ufc/g, $1,10\pm 0,86$ log ufc/g, $0,83\pm 0,57$ log ufc/g e $1,05\pm 0,79$ log ufc/g, valores que no último dia não foram além dos $0,25\pm 0,50$ log ufc/g, $0,00\pm 0,00$ log ufc/g, $0,25\pm 0,50$ log ufc/g e $0,00\pm 0,00$ log ufc/g, que podem considerar-se satisfatórios em todos os lotes.

A análise de covariância feita a fim de testar a interacção entre o tratamento e o efeito linear e quadrático do tempo não teve qualquer significado, e o teste de interacção entre os tratamentos e o efeito linear do tempo mostrou que apenas era muito significativo o efeito do tempo ($p < 0,01$).

Este facto permitiu, apesar do efeito do tratamento e do tratamento vezes o tempo não serem significativos, estabelecer uma equação linear comum representativa da evolução dos bolores em todos os lotes e cujos coeficientes são apresentados na Quadro 29.

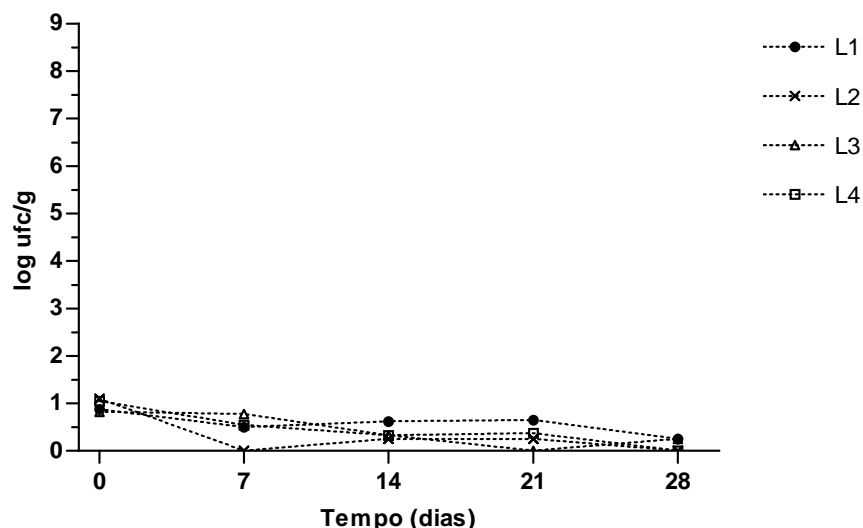


Gráfico 27 - Evolução das contagens de bolores nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.

Quadro 29 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução das contagens de bolores nos diferentes lotes em estudo.

	b_0	b_1
L ₁	0,9386	
L ₂	0,6806	-0,0258
L ₃	0,7971	
L ₄	0,8196	

4.5.1.6 - Leveduras

Contrariamente aos bolores, as leveduras adaptam-se bem a condições ambientais com baixa pressão de oxigénio, e a embalagem a vácuo não constitui portanto uma barreira tão eficaz no controlo do seu desenvolvimento como sucede nos bolores. Existe pois necessidade de recorrer a outro tipo de barreira, razão da utilização do sorbato de potássio em complemento da acção do metabissulfito de sódio (Miller, 1979 ; Sofos & Busta, 1993; Khachatouranis & Arora, 2000; Thomas, 2000).

No Gráfico 28, são apresentados os resultados das contagens de leveduras em cada um dos lotes ao longo do tempo de armazenamento. Uma vez mais pode constata-se que nos lotes L₁ e L₃ os resultados foram menos interessantes, e apesar de L₃ no dia 0 ter contado 0,92±0,70 log ufc/g, cerca de uma unidade logarítmica abaixo do valor registado por L₁ que foi de 1,95±0,77 log ufc/g, no sétimo dia já ambos apresentavam contagens praticamente idênticas, com 3,23±0,31 log ufc/g em L₁ e 3,03±0,80 log ufc/g em L₃.

Nos lotes L₂ e L₄, que inicialmente tiveram contagens tão similares às verificadas em L₃, respectivamente 0,54±1,07 log ufc/g e 0,50±0,58 log ufc/g, os valores mantiveram-se baixos até o final, altura em que L₂ contava 1,09±1,39 log ufc/g e L₄ 0,58±1,15 log ufc/g, tornando-se evidente, especialmente neste último lote, a acção específica do sorbato de potássio sobre o desenvolvimento das leveduras.

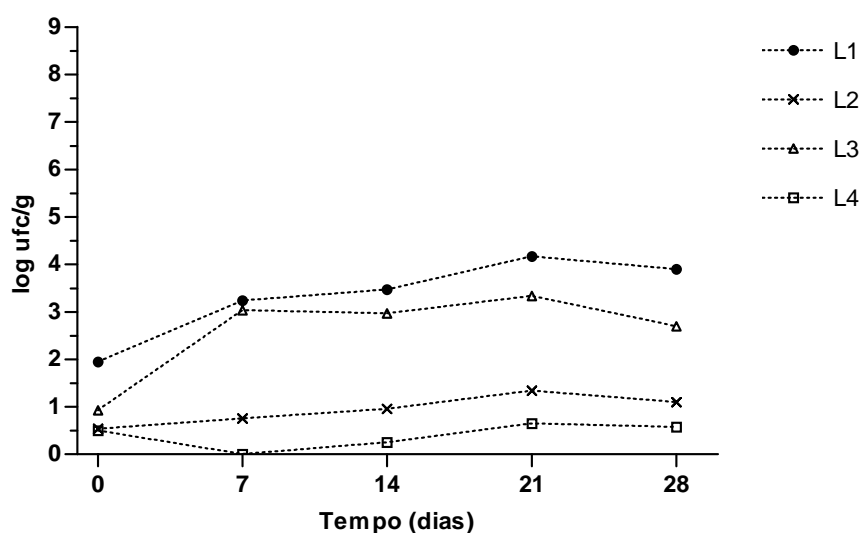


Gráfico 28 - Evolução das contagens de leveduras nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.

Também para estes microrganismos a análise de covariância realizada a fim de testar a interacção entre o tratamento e o efeito linear e quadrático do tempo não obteve qualquer significado, mas o teste de interacção entre os tratamentos e o efeito linear do tempo mostrou que eram muito significativos os efeitos do tratamento e do tempo ($P < 0,01$), sem contudo ser significativo o efeito do tratamento vezes o tempo.

Na Quadro 30 estão representados os coeficientes das equações lineares comuns relativos à contagem de leveduras.

Quadro 30 - Coeficientes das equações lineares comuns ($y=b_0+b_1x$) relativas à evolução das contagens de leveduras nos diferentes lotes em estudo.

	b₀	b₁
L₁	2,7840	
L₂	0,3770	0,0399
L₃	2,0310	
L₄	-0,1640	

4.5.1.7 - Enterobacteriaceae

As contagens de microrganismos pertencentes à família das Enterobacteriaceae são apresentadas no Gráfico 29, podendo constatar-se que os Maranhos de L₄ foram claramente os que melhores resultados obtiveram, pois do primeiro ao último dia de armazenamento nunca se obteve a contagens de unidades formadoras de colónias deste tipo de microrganismos.

Já em L₁ e em L₃ os resultados foram menos bons, tendo cada um destes lotes contabilizado no dia 0 respectivamente $1,56 \pm 1,80 \log \text{ ufc/g}$ e $0,78 \pm 1,56 \log \text{ ufc/g}$, valores aceitáveis mas que evoluíram logo ao sétimo dia de armazenamento para $4,69 \pm 1,35 \log \text{ ufc/g}$ e $3,38 \pm 0,91 \log \text{ ufc/g}$, eventualmente reflexo de contaminações ocorridas após o processamento térmico que as condições de armazenamento não conseguiram contrariar.

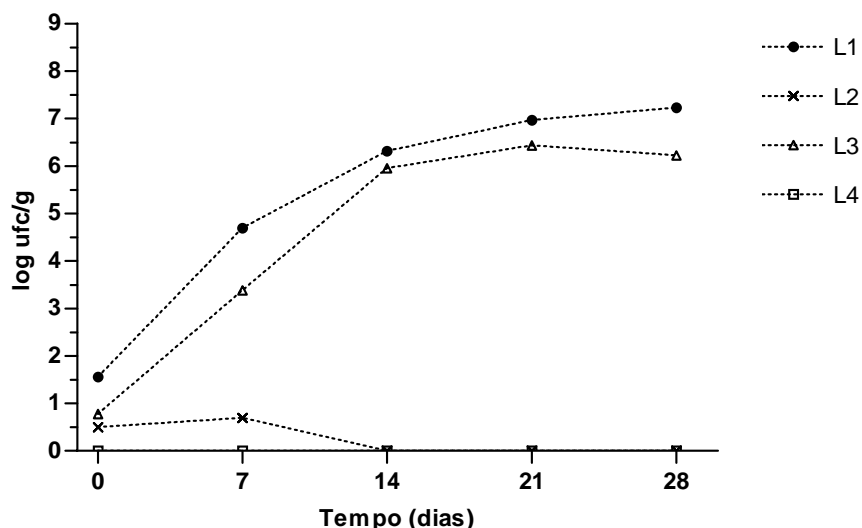


Gráfico 29 - Evolução das contagens de Enterobacteriaceae nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.

Também em L₂ se obtiveram contagens iniciais de Enterobacteriaceae de $0,78 \pm 1,56$ log ufc/g, porém a acção do metabissulfito de sódio com o sorbato de potássio mostrou ser eficaz no seu controlo, e a partir do décimo quarto dia já não se obtiveram contagens, o que pode ser atribuído à conhecida acção inibitória dos sulfitos sobre o desenvolvimento destes microrganismos (Banks & Board, 1982; Wedzicha, 1984; Ranken, 2000).

Pela análise de covariância realizada às contagens de microrganismos pertencentes à família das Enterobacteriaceae considerando a interacção entre o efeito linear e quadrático do tempo com o tratamento, ficou a saber-se que o efeito do tratamento foi significativo ($p < 0,05$), e que os efeitos do tempo, do tempo ao quadrado, do tempo vezes o tratamento e do tratamento vezes o tempo ao quadrado foram todos muito significativos ($p < 0,01$), o que permitiu obter 4 funções quadráticas independentes representativas do comportamento de cada lote, cujos respectivos coeficientes estão patentes na Quadro 31.

Quadro 31 - Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de Enterobacteriaceae nos diferentes lotes em estudo.

	b_0	b_1	b_2
L₁	1,6690	0,4680	-0,0098
L₂	0,6216	-0,0367	0,0004
L₃	0,6626	0,5139	-0,0112
L₄	0,0000	0,0000	0,0000

4.5.1.8 - Bactérias ácido lácticas

As BAL são, juntamente com as Enterobacteriaceae, os principais tipos de microrganismos responsáveis pela deterioração dos produtos cárneos cozidos e embalados a vácuo, pelo que é conveniente manter o seu teor em níveis tão baixos quanto possível durante toda a vida útil destes produtos (Franz & von Holy, 1996; Čurda, 2000; Guerrero & Chabela, 2000; Gram, 2006).

No dia 0, como se pode ver no Gráfico 30, a presença de BAL foi muito baixa em todos os lotes analisados, não se verificando mesmo qualquer contagem em L₂ e em L₄, que praticamente assim se mantiveram até o final dos ensaios, com algumas flutuações irrelevantes nas datas intercalares mas que em nenhum caso atingiu sequer 1,00 log ufc/g; novamente, a mistura de sorbato de potássio com o metabissulfito de sódio revelou interferir drasticamente no desenvolvimento deste tipo de bactérias.

Já em L₁ e em L₃ constatou-se um aumento progressivo das contagens destes microrganismos, que foram respectivamente desde os iniciais 0,99±0,70 log ufc/g e 0,25±0,50 log ufc/g até os 7,27±0,17 log ufc/g e 6,91±1,23 log ufc/g contados na última data, relativos a Maranhos já visivelmente deteriorados.

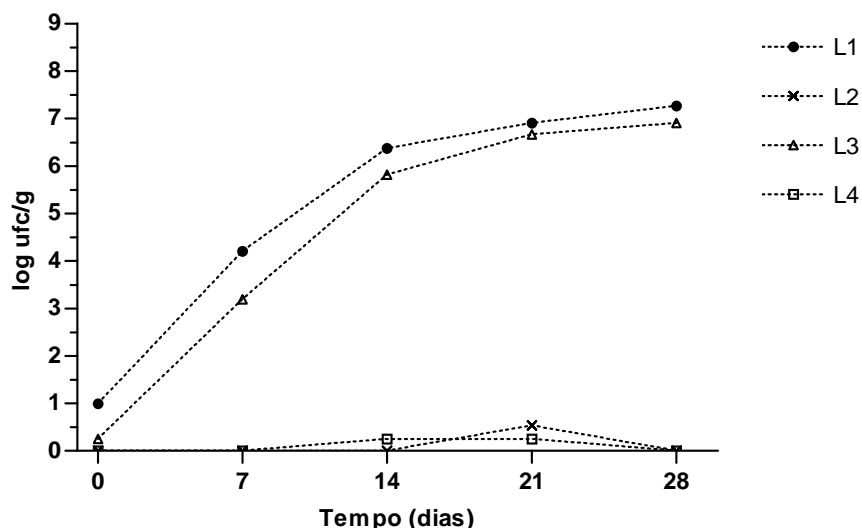


Gráfico 30 - Evolução das contagens de BAL nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.

Apesar da análise de covariância realizada às contagens de BAL considerando a interação entre o efeito linear e quadrático do tempo com o tratamento, ter considerado o efeito simples do tratamento não significativo, os efeitos do tempo, do tempo ao quadrado, do tempo vezes o tratamento e do tratamento vezes o tempo ao quadrado foram todos muito significativos ($p < 0,01$), permitindo obter 4 funções quadráticas independentes representativas do comportamento de cada lote, que têm os seus coeficientes afixados na Quadro 32.

Quadro 32 - Coeficientes das funções quadráticas ($y=b_0+b_1x+b_2x^2$) relativas à evolução das contagens de BAL nos diferentes lotes em estudo.

	b_0	b_1	b_2
L ₁	1,0493	0,5176	-0,0107
L ₂	-0,0767	0,0296	-0,0008
L ₃	0,1839	0,5326	-0,0105
L ₄	-0,0571	0,0342	-0,0011

4.5.1.9 - *Escherichia coli*

As contagens de *E. coli* foram em todos os lotes e em todas as datas nulas, o que nos permite assegurar a eficiência do processamento térmico, e validar as boas práticas de manufactura aplicadas na laboração dos lotes de Maranhos especialmente feitos para a realização destes ensaios.

4.5.1.10 - Esporos de clostrídios sulfito-redutores

Também as pesquisas efectuadas aos esporos de clostrídios sulfito-redutores em 1g de produto, obtiveram 100% de resultados negativos em todos os lotes e em todas as datas.

Este facto reforça a convicção de que o processamento térmico usado na cozedura dos Maranhos constitui uma barreira de grande importância e suficiente para eliminar os perigos normalmente associados a estes microrganismos, desde que se usem matérias-primas pouco contaminadas, e se evitem novas contaminações durante a embalagem, que se deseja asséptica, do produto processado.

4.5.1.11 - *Staphylococcus aureus*

As práticas de manufactura aplicadas nos lotes de Maranhos analisados não impediram a presença de *S. aureus*, que como pode ver-se no Gráfico 31 teve resultados positivos em 0,1g de produto em 50% das amostras de L₁ analisadas no dia 0.

Este facto revela que os cuidados na manipulação dos Maranhos após o processamento térmico não foram suficientes para evitar a sua contaminação com este microrganismo, sendo esta uma situação onde a correcta utilização de luvas esterilizadas e de máscara buco-nasal se justifica enquanto o produto não está embalado.

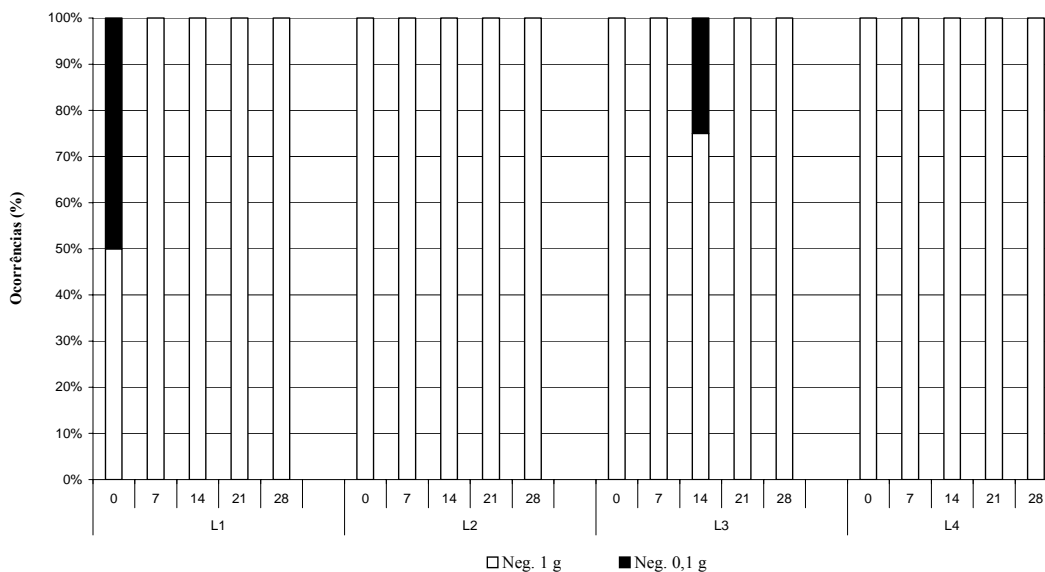


Gráfico 31 - Ocorrência de *Staphylococcus aureus* coagulase + nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.

Já os resultados posteriormente obtidos em L₁, com 100% de análises negativas em 1g de produto desde o sétimo dia até a data final dos ensaios, serão provavelmente reflexo da impossibilidade do *S. aureus* se desenvolver a temperaturas inferiores a 7 °C, o que em condições normais de arrefecimento seguido de refrigeração será suficiente para evitar problemas. Esta situação é melhorada em condições de anaerobiose, pois aumenta para 15 °C a temperatura abaixo da qual este microrganismo não tem capacidade para produzir toxinas (Young, 1991; ACMSF, 1993; Harvey & Gilmour, 2000).

Em L₂ e em L₄ todos as análises realizadas foram negativas em 1g de produto, o que poderá também ser reflexo do efeito bactericida exercido pela mistura de metabissulfito de sódio com o sorbato de potássio, que não tendo sido usada em L₃ será eventualmente a justificação para que 25% dos Maranhos analisados ao décimo quarto dia fossem negativos apenas em 0,1g de produto.

4.5.1.12 - *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. em 25g de produto foi sempre negativa em todas as situações.

O processamento térmico empregue na cozedura dos Maranhos foi aparentemente suficiente para garantir também a morte deste microrganismo patogénico, caso estivesse presente, sendo os cuidados de manipulação do produto após o processamento térmico fundamentais para eliminar as hipóteses da sua posterior presença.

4.5.1.13 - *Listeria monocytogenes*

A presença de *L. monocytogenes*, detectada conforme se pode ver no Gráfico 32 em 25% das amostras de L₁ no sétimo e no décimo quarto dia, e em 25% das amostras de L₃ também ao décimo quarto dia, significará que há semelhança do que aconteceu com o *S. aureus*, os cuidados na manipulação do produto após o processamento térmico não foram os suficientes para garantir a sua ausência do produto acabado.

A presença deste microrganismo patogénico de especial cuidado em REPFEDs, pelo facto de se desenvolver mesmo a temperaturas próximas da congelação, não pode ser encarada da mesma forma que a presença de *S. aureus* nos mesmos lotes, pois nem a embalagem nem a temperatura de armazenamento vão constituir barreiras eficazes ao seu desenvolvimento (Batt, 2000^c; Guerra *et al.*, 2001; Fraqueza *et al.*, 2006).

Tratando-se de um microrganismo ubíquo no ambiente, a garantia da sua ausência no produto acabado passará pela criação, nas unidades de produção, de uma zona de alto risco, associada a procedimentos de higiene e acessibilidade muito controlados, em que o produto é tratado após o processamento térmico (ACMSF, 1993; Martin & Fisher, 2000).

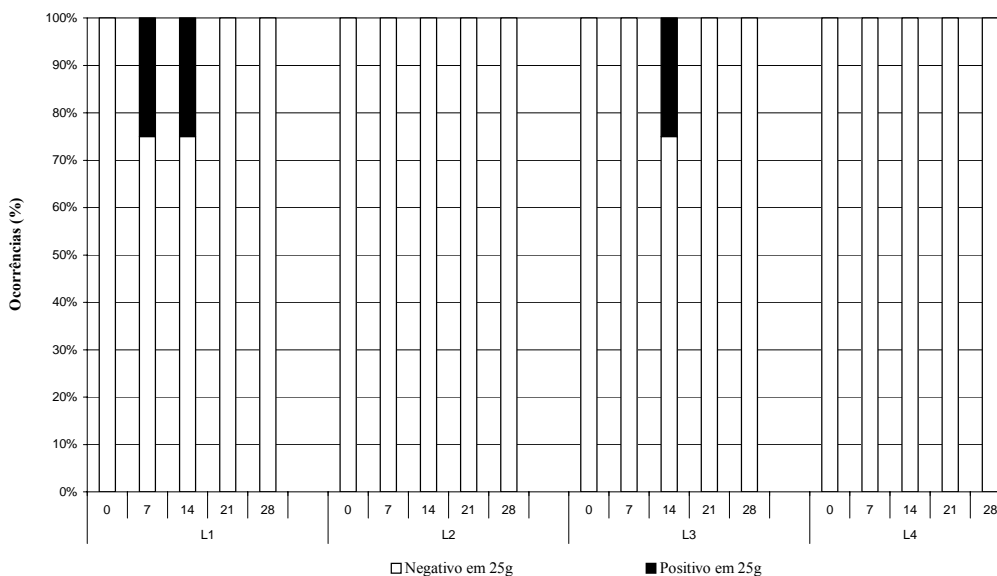


Gráfico 32 - Ocorrência de *Listeria monocytogenes* nos diferentes lotes em estudo, conservados a 4°C.

Alternativamente, cedendo alguma vantagem comercial, pode atribuir-se no caso concreto dos Maranhos já cozinhados, uma validade não superior a sete dias, a fim de diminuir a probabilidade da *L. monocytogenes* atingir níveis de presença considerados perigosos, o que nunca sucedeu em L₂ nem em L₄ durante todo o tempo em que decorreram os ensaios, possivelmente devido ao efeito bactericida da solução de metabissulfito de sódio com sorbato de potássio.

4.6 - Análise sensorial

Tendo em vista complementar os resultados obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas dos Maranhos ao longo dos ensaios, fez-se também a análise sensorial do produto nos diferentes lotes em estudo, classificando em categorias a intensidade dos atributos aspecto geral e cor no produto embalado a vácuo, recém retirado da refrigeração, e cor ao corte, cheiro, sabor e textura no produto aquecido, fatiado e pronto a ser consumido.

4.6.1 - Aspecto geral

O aspecto geral de um produto alimentar constitui um atributo de fundamental importância para o seu sucesso comercial, já que é responsável pela primeira impressão causada no consumidor e influencia a sua tomada de decisão no momento da eleição e compra de um produto para a satisfação das suas necessidades (Mason *et al.*, 1990; Hansen *et al.*, 1995; Resurrecion, 2003).

No caso dos Maranhos, mesmo não se tendo comparado a este nível o produto cru com o produto já cozinhado, parece consensual que para além da conveniência e das vantagens de ordem higiénica e de segurança do alimento, o seu processamento térmico e a posterior embalagem a vácuo lhes conferem uma notória melhoria do aspecto geral e os torna mais apelativos.

Pela apreciação do Gráfico 33, verifica-se que desde o primeiro dia a preferência do painel de provadores recaiu sobre os Maranhos L₄, classificados com 5 valores em 28% das amostras avaliadas, com 4 valores em 50% e com 3 valores os restantes 22%, não tendo nenhuma delas sido classificada abaixo deste valor.

Já no L₁ no dia 0, apenas 6% dos Maranhos avaliados alcançaram a classificação máxima, valor idêntico aos que obtiveram a classificação mínima, tendo 11% sido classificados com nota 2 e 33% com nota 3. Este foi, em oposição ao L₄, claramente o lote que piores classificações obteve no que diz respeito ao aspecto geral do produto.

Com o evoluir do tempo, verificou-se em todos os lotes uma tendência generalizada para o aumento do número de amostras a que foram atribuídas classificações mais baixas, o que reflecte o carácter percível deste tipo de produtos, nos quais o efeito do tempo não se reveste de qualquer interesse na evolução das suas características organolépticas, cuja expressão máxima se atinge imediatamente após a sua confecção (Mason *et al.*, 1990; Hansen *et al.*, 1995).

É também notório que os lotes que inicialmente tiveram classificações mais elevadas foram os que ao longo do tempo mantiveram essa performance, como as amostras pertencentes a L₄, que apesar de a partir do vigésimo primeiro dia deixarem de receber a classificação máxima, alcançaram o final dos ensaios com, em média, 77% das amostras classificadas com nota superior ou igual a 3.

Igualmente, L₃ alcançou o final dos ensaios com percentagens elevadas de amostras bem classificadas, tendo no vigésimo primeiro dia apenas 11% das amostras classificadas com nota 2, valor que manteve no vigésimo oitavo dia apesar de ter aumentado 6% o número de amostras com a classificação mínima, mas que ainda assim não comprometeram os 83% de amostras classificadas com nota superior ou igual a 3, superando mesmo o sucedido em L₄.

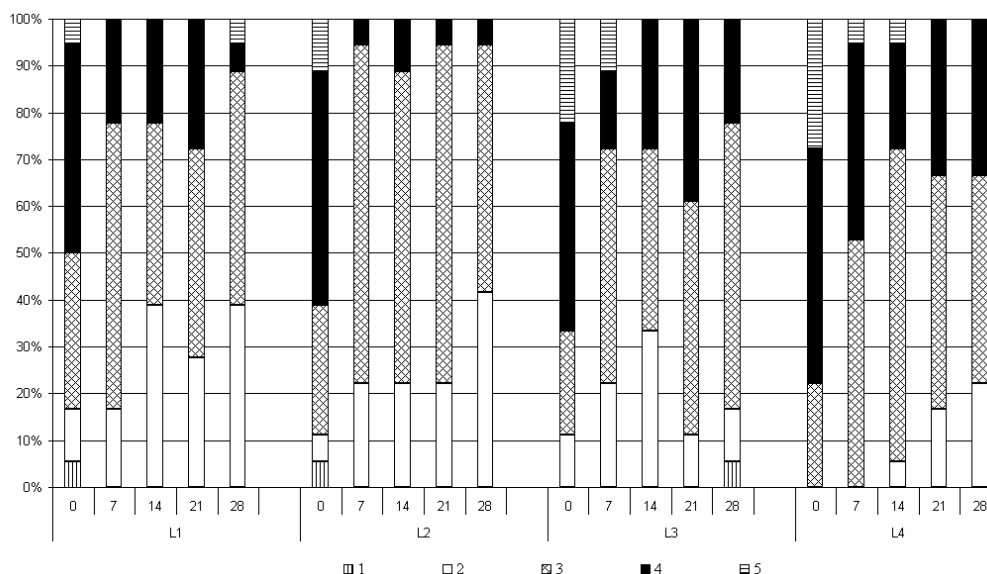


Gráfico 33 – Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente ao aspecto geral.

4.6.2 - Cor

Para além da embalagem e do padrão da tripa, que varia entre o alveolado típico do retículo e o acamurçado, a cor dos Maranhos é parte fundamental do seu aspecto e contribui para as primeiras sensações causadas no consumidor e respectivas consequências procedentes dessa interação (Martins, 1990; Ranken, 2000; Ressurrecion, 2003).

Há semelhança do que se verificou na avaliação do aspecto geral, a cor dos Maranhos foi mais premiada nos lotes L₃ e L₄, como se pode observar no Gráfico 34, no qual no dia 0, a percentagem de amostras destes lotes classificadas com 3 ou mais

valores foi de 94%, ambos com 28 % de amostras classificadas com 5 valores, apesar de 44% das amostras do L₄ estarem classificadas com 4 valores contra apenas 31% em L₃ onde foi maior a percentagem de amostras classificadas com 3 valores.

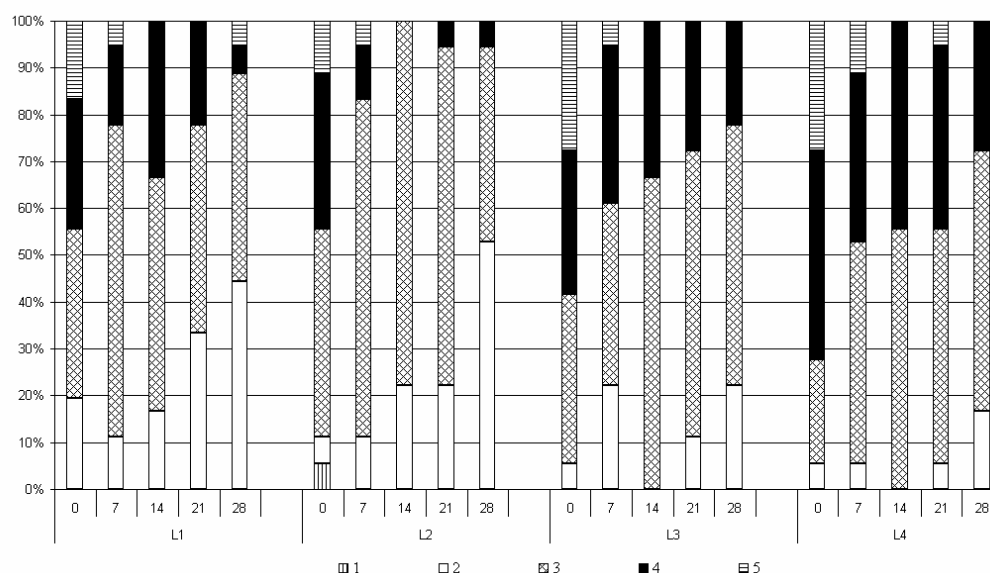


Gráfico 34 - Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente à cor.

L₁ e L₂ voltaram a ser os lotes com piores classificações médias também para este atributo, tendo ao vigésimo oitavo dia apresentado respectivamente 44% e 53% de amostras com classificações inferiores a 3, o que nos casos de L₃ e de L₄ não ultrapassou os 22% e os 17%.

A este respeito note-se que em L₂ seria de esperar que a acção branqueadora do metabissulfito de sódio se revelasse mais interessante, mas resultou em Maranhos descorados mais claros do que o habitual e portanto fora do padrão tradicional procurado pelos provadores, que premiaram o tom menos pálido dos Maranhos L₃ e L₄, verificando-se que neste último lote a acção do nitrito de sódio sobre cor da carne no interior dos Maranhos contrabalançou o efeito branqueador do metabissulfito de sódio na tripa que constitui o invólucro.

Também a cor sofreu o efeito depreciativo do tempo, mais acentuado nos lotes à partida pior classificados, o que não será surpresa ou não existisse uma importante relação de proximidade entre a cor e a percepção dos provadores para a avaliação do aspecto geral.

4.6.3 - Cor ao corte

Numa segunda fase, quando os Maranhos são preparados para serem servidos em ambiente doméstico ou hoteleiro, a cor ao corte constitui, provavelmente em simultâneo com o cheiro, um importante atributo que influencia a percepção do consumidor relativamente à qualidade organoléptica do produto que lhe é dado.

Sendo conhecido o efeito do ião nitrito na formação e estabilização da cor em produtos cárneos e o facto de originalmente este não fazer parte da formulação dos Maranhos, não deixa de ser extraordinária a receptividade do painel de provadores a esta alteração, responsável pela diferença observada em relação ao padrão tradicional do produto.

Este facto está bem patente no Gráfico 35, em que se constata que as classificações obtidas pelos Maranhos a que se adicionou o nitrito de sódio, que correspondem respectivamente aos lotes L₃ e L₄ obtiveram no primeiro dia 100% de classificações maiores ou iguais a 3, tendo em L₄ todas as classificações ficado acima dos 4 valores.

Foi ainda nestes dois lotes que se verificaram as melhores classificações deste atributo ao longo de todo o tempo de ensaio, pois desde cedo surgiram Maranhos em L₁ enquanto L₂ com classificações inferiores a 3, facto que se agravou a partir do décimo quarto dia quando a percentagem de amostras com classificação negativa superou os 50%, com L₁ a receber a nota de 1 valor em 6% e 2 valores em 56% das amostras, e L₂ obteve respectivamente 11% e 44% de Maranhos classificados de forma idêntica.

Ficou bem evidente que a cor rosácea da carne devido ao nitrito, confere aos Maranhos um aspecto mais apelativo relativamente ao tom pardo típico da carne cozida, pelo que embora a quantidade residual de nitrito não seja suficiente para garantir por si só a segurança microbiológica do produto, foi importante do ponto de vista organoléptico porque melhorou muito a cor ao corte dos Maranhos.

Além disso, o facto de na última data de prova L₃ e L₄ terem obtido, respectivamente, 100% e 95% das amostras com classificação positiva, permite pensar que a baixa quantidade de nitrito empregue foi suficiente para a manutenção da cor da carne, e suspeitar também de que o recurso ao metabissulfito de sódio teve um efeito microbida complementar que permitiu que em L₄ só a partir do vigésimo primeiro dia

tenham surgido as primeiras amostras com classificação negativa, o que nos restantes lotes aconteceu logo no primeiro ou no sétimo dia.

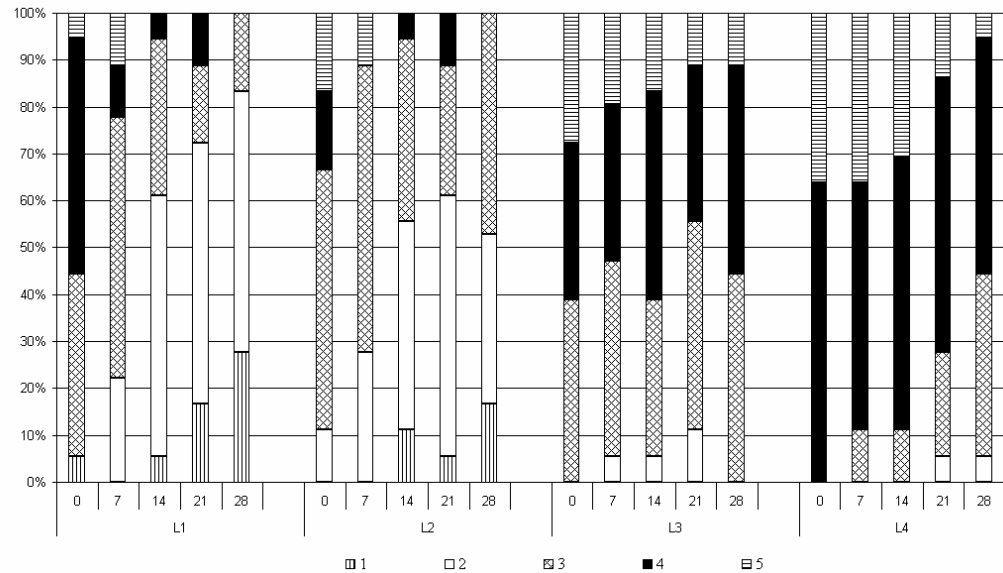


Gráfico 35 – Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente à cor ao corte.

4.6.4 - Cheiro

O olfacto é o sentido que nos permite avaliar também o cheiro dos alimentos e daí retirar prazer ou eventualmente concluir acerca da sua qualidade e ou segurança, já que cheiros menos agradáveis estão quase sempre relacionados com más condições do produto e correspondem a atrasos ou putrefacção que tornam menos próprio para o consumo (Martins, 1990; Ranken, 2000; Guerrero & Chabela, 2000) .

No Gráfico 36 pode observar-se que ao longo do tempo de armazenamento os resultados das provas organolépticas para este atributo foram sempre piorando, mas que nos lotes L₁ e L₂ esse declínio foi mais acentuado desde o início da contagem do tempo, com L₁ a apresentar 33% das amostras com classificação negativa logo no sétimo dia e L₂ com 39% dos resultados abaixo de 3 no décimo quarto dia de armazenamento.

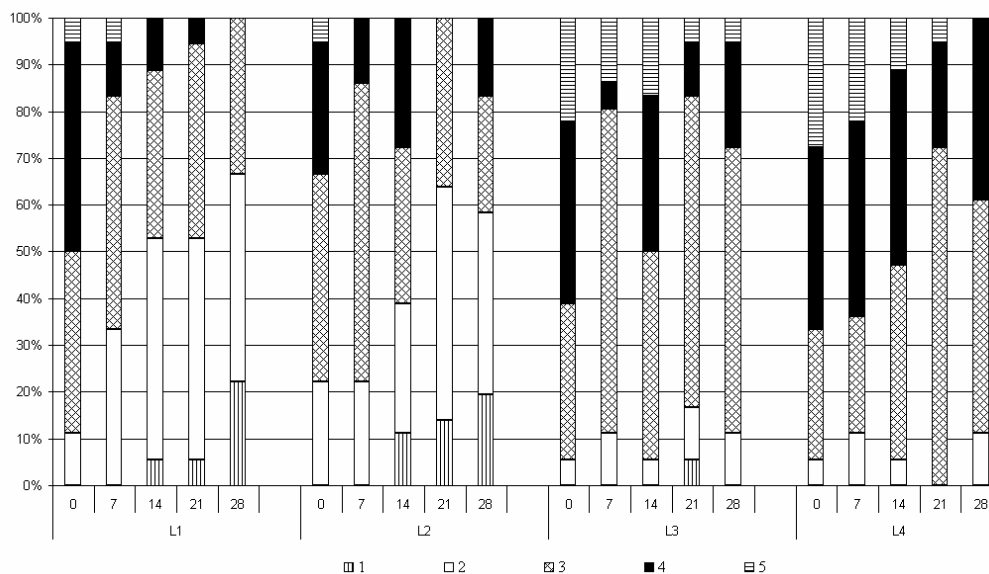


Gráfico 36 - Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente ao cheiro.

Os maus odores resultantes da deterioração dos produtos cárneos devem-se essencialmente aos metabolitos voláteis produzidos pela actividade da flora saprófita no alimento, com conseqüente degradação da sua fracção proteica e aos fenómenos de oxidação lipídica responsáveis pelo ranço; assim, não parecerá estranho que os melhores resultados tenham sido alcançados em L₄ que no final dos ensaios teve apenas 11% das amostras classificadas abaixo de 3 (Bauer, 1995; Varnam & Sutherland, 1995; Guerrero & Chabela, 2000).

Porém, considerando os resultados relativos à evolução da flora microbiana nos diferentes lotes de Maranhos e os respectivos índices de degradação proteica e lipídica, coloca-se a dúvida relativamente ao cheiro em L₃ que praticamente acompanhou a dinâmica de L₄, tendo contudo piores resultados microbiológicos que L₂ e de forma menos evidente também nos índices de degradação analisados.

Talvez que a acção do pouco nitrito adicionado, embora não tenha efectivamente actuado sobre o desenvolvimento microbiano, tenha influenciado a cor mas também tenha tido reflexo no desenvolvimento do odor dos Maranhos, o qual agradou ao painel de provadores desde o primeiro dia em que atribuíram a nota máxima a 22% das amostras de L₃.

4.6.5 - Sabor

Ao colocar os alimentos na boca impressionam-se as papilas gustativas e causam-se diferentes sensações de que se pode gostar mais ou menos conforme a personalidade do provador, e que variam entre o doce, o amargo, o ácido, o salgado e para alguns especialistas também o umami, palavra japonesa que significa “com um bom sabor a carne” e que se associa à frequente presença de glutamatos em alimentos proteicos como a carne, produtos cárneos e alguns queijos (Martins, 1990; Mason *et al.*, 1990; Bruun-Jensen *et al.*, 1996).

O sabor de um alimento dependendo essencialmente das características das matérias-primas utilizadas na sua formulação, é também afectado pela forma como estão presentes e interagem entre si no produto podendo, tal como se verifica com o cheiro, os desvios de sabor alertar o consumidor para o pior estado de conservação de um determinado alimento que desta forma passa a ser rejeitado.

No Gráfico 37 são apresentados os resultados obtidos ao longo do tempo para o sabor nos diferentes lotes de Maranhos, e tal como se verificou com os restantes atributos, foram os lotes L₃ e L₄ os que melhores classificações obtiveram, desde sempre, apresentando ambos os lotes 89% das amostras com classificação positiva.

Tal como no cheiro, também a evolução do sabor dos alimentos se fica a dever a alterações microbiológicas e oxidativas, e uma vez mais, a justificação para os resultados obtidos em L₂ e L₃, será talvez, o nitrito adicionado também contribuiu para a formação do sabor dos Maranhos tal como acontece em muitos outros produtos curados.

Já em L₁ apesar de no primeiro dia de provas 89% das amostras serem classificadas com valores superiores ou iguais a 3, ao sétimo dia a percentagem de amostras com baixa classificação já atingia os 36%.

Pior foi o ocorrido em L₂ em que logo no primeiro dia 28% das amostras obtiveram classificações negativas, tendo mesmo 6% das amostras obtido a classificação mínima de 1, e apesar do painel de provadores não ter feito um reparo especial acerca do sabor deste lote, tal facto pode talvez dever-se ao sabor e ou cheiro a choco ou ovos podres que frequentemente os compostos sulfurados conferem aos alimentos, mas que assim sendo não foram detectados em L₄.

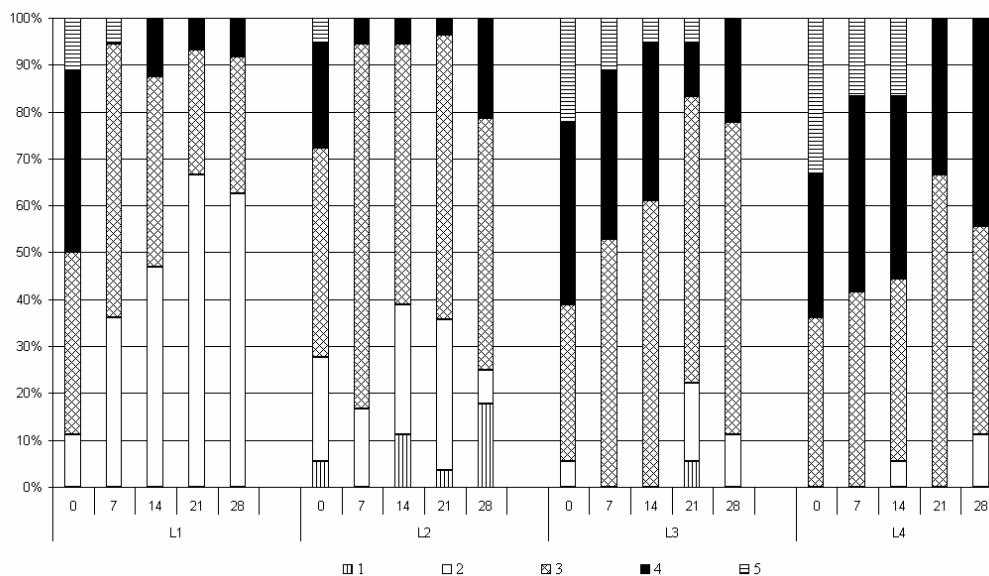


Gráfico 37 – Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente ao sabor.

Pior foi o ocorrido em L₂ em que logo no primeiro dia 28% das amostras obtiveram classificações negativas, tendo mesmo 6% das amostras obtido a classificação mínima de 1, e apesar do painel de provadores não ter feito um reparo especial acerca do sabor deste lote, tal facto pode talvez dever-se ao sabor e ou cheiro a choco ou ovos podres que frequentemente os compostos sulfurados conferem aos alimentos, mas que assim sendo não foram detectados em L₄.

4.6.6 - Textura

A textura é, em termos sensoriais, uma importante característica dos alimentos sólidos, reflexo de um conjunto de propriedades mecânicas, geométricas e de superfície que resultam da interacção molecular entre os diferentes constituintes dos alimentos e que são detectáveis principalmente pelo tacto, mas também pela visão e pela audição (Dransfield, 1996; Martins, 1990; Hansen *et al.*, 1995).

Na carne e nos produtos cárneos a textura constitui um factor crítico na avaliação sensorial e na respectiva aceitação, e está directamente relacionada com a espécie, maneo produtivo, tipo de músculo, tipo de processamento e composição, sendo

neste último caso especialmente importante a sua capacidade de retenção de água e o seu teor em gordura.

Os resultados obtidos estão patentes no Gráfico 38, verificando-se os lotes L₃ e L₄ voltam a manifestar uma superior preferência por parte do painel de provadores.

Esta situação não será totalmente explicável, já que todos os lotes foram fabricados a partir da mesma mistura base de matérias-primas, sujeitos às mesmas condições de processamento térmico, embalagem e armazenamento, diferindo apenas nos aditivos utilizados e dos quais não se esperava qualquer efeito directo sobre a textura dos Maranhos.

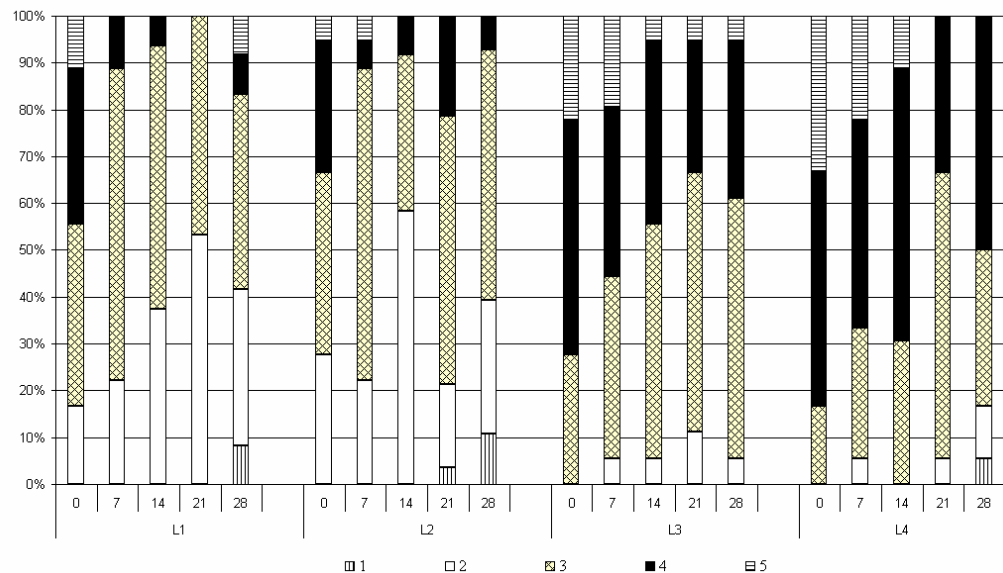


Gráfico 38 - Distribuição dos resultados por lote e por tempo relativamente à textura.

Um maior desenvolvimento microbiano com produção de visco, poderia eventualmente ser responsável por uma diminuição da textura nos lotes em que os microrganismos saprófitas se exprimiram com maior relevância, mas comparando L₂ com L₃ verifica-se que tal não parece ser a causa das diferenças apontadas, pelo que, provavelmente os membros do painel terão sido sugestionados pelas sensações anteriormente adquiridas na avaliação dos restantes parâmetros, o que condicionou os resultados obtidos aqui.

De notar, no entanto, que alguns estudos mostraram que a textura das salsichas elaboradas com carne de cabra é comparável à de outras elaboradas com outros géneros

de carne, o que deixa lugar a um enorme potencial para inclusão de carne de cabra em produtos cárneos processados, com baixo teor de gordura, sem que se comprometam as características de textura típicas destes produtos de salsicharia (Gadiyaram & Kannan, 2004).

5 - Conclusões e perspectivas futuras

Do confronto entre os objectivos que inicialmente nos propusemos alcançar com a elaboração deste trabalho e os resultados que tivemos oportunidade de apresentar e discutir ao longo desta tese, concluímos com satisfação que o balanço final é positivo.

Sentimos que para além do nosso enriquecimento intelectual contribuímos de forma activa para o conhecimento e a preservação da identidade deste invulgar produto da salsicharia portuguesa, e simultaneamente fomos capazes de sugerir caminhos para a implementação de melhorias tecnológicas a fim de minimizar alguns problemas relacionados com a produção e distribuição dos Maranhos.

Numa região tão periférica e parca de recursos que lhe permitam concorrer com as regiões mais desenvolvidas de Portugal e da Europa, a natureza e a identidade cultural do povo da Beira Baixa constituem valores que urge preservar e dignificar, a fim de minorar os problemas crescentes de desertão da população que tão necessária é para a adequada manutenção da região.

Com a crescente valorização e procura por parte das populações urbanas, muitas vezes com ligações ancestrais ao meio rural, de produtos tradicionais distintos dos géneros alimentícios que constituem a sua dieta quotidiana, podem os Maranhos ter a oportunidade de ocupar um lugar no seio dos produtos de nicho tradicional que até agora não têm conseguido conquistar.

Uma das primeiras conclusões que tiramos deste trabalho é o facto de os Maranhos serem um produto cárneo que permite valorizar matérias-primas de muito pouco interesse económico, como é a carne proveniente das rezes adultas de caprinos.

Porém, esta vantagem dilui-se ao termos confirmado a baixa qualidade higiénica da versão fresca, como pôde verificar-se através da elevada presença de microrganismos indesejáveis nas amostras recolhidas para análise, o que para além de tornar este produto uma potencial fonte de contaminações cruzada, eventualmente de microrganismos patogénicos, limita terminantemente o seu prazo de validade que em nosso entender não deve ir além do dia de fabrico.

Fica deste modo muito comprometida a distribuição dos Maranhos para outros mercados fora da sua região de origem, facto que é agravado pela pouca apresentação

do produto na sua versão fresca e pela morosidade do seu processamento culinário que obriga a uma cozedura prolongada por mais de uma hora, não compatíveis com as exigências e disponibilidades de tempo do consumidores modernos.

Estas lacunas na qualidade dos Maranhos podem eventualmente vir a ultrapassar-se com o desenvolvimento de uma nova forma de apresentação que se enquadre no conceito dos REPFEDs, cuja procura não pára de aumentar nos países desenvolvidos, e passar a disponibilizar o produto já cozinhado, refrigerado e com a vida útil prolongada.

Como os Maranhos não são um produto estável em virtude das características físico-químicas, torna-se pois importante estabelecer uma tecnologia de produção que contemple a segurança e a longevidade pretendidas para esta nova versão dos Maranhos, e conhecer com exactidão o efeito das diferentes barreiras utilizadas, para sem comprometer as características tradicionais do produto se alcançarem os objectivos pretendidos.

O processamento térmico dos Maranhos, para além de os cozinhar, mostrou ser uma barreira fundamental para a melhoria da qualidade higiénica e segurança do produto final, capaz de garantir uma redução de 6D para os esporos das estirpes psicrotróficas não proteolíticas de *C. botulinum* do tipo B, que são considerados o maior perigo microbiológico para a segurança dos alimentos do tipo REPFEDs.

Porém, a compreensível ausência de condições de ambiente asséptico para a posterior manipulação dos Maranhos processados termicamente, aumenta o perigo de contaminações após o processamento com microrganismos saprófitas e ou patogénicos, capazes de se desenvolverem apesar das barreiras materializadas pela manutenção do produto a temperaturas inferiores a 4°C, e pela embalagem a vácuo.

O recurso aos conservantes de fácil e económica utilização, pareceu-nos então uma forma de atingir os objectivos pretendidos, tendo-se para o efeito experimentado as combinações preconizadas nos lotes L₂, L₃ e L₄ e comparado a sua evolução qualitativa ao longo do tempo com a testemunha L₁.

Em L₁ e em L₃ o final da vida útil dos Maranhos foi determinado pelo crescimento microbiano verificado e essencialmente constituído por BAL, Enterobacteriaceae e leveduras, que ao sétimo dia de armazenamento comprometiam já a qualidade do produto. A este respeito a utilização em L₃ do nitrito de sódio e do ácido

ascórbico não mostrou ser uma barreira capaz de garantir os resultados objectivados por este trabalho.

Já o recurso ao metabissulfito de sódio juntamente com o ácido sórbico que foi experimentado nos lotes L₂ e L₄, mostrou ser muito eficaz e contrariou o crescimento microbiano ao longo do tempo, o que permitiu que no final dos ensaios estes Maranhos ainda se encontrassem com a qualidade desejada, e se estabelecesse um prazo de validade de pelo menos 3 semanas conforme as exigências da moderna distribuição.

Note-se que em L₄ estes resultados foram mais acentuados, possivelmente pela existência de um efeito sinérgico proveniente da utilização também do nitrito de sódio e do ácido ascórbico, cujas responsabilidades nas boas notas obtidas junto do painel de provadores de Maranhos foram por demais evidentes em todos os aspectos considerados.

Os resultados satisfatórios alcançados não nos permitem porém dar por terminado este assunto, pois legalmente não está prevista a utilização de sulfitos nos Maranhos, e apesar de a sua presença ter sido sempre inferior aos valores máximos autorizados para outros produtos cárneos, obriga a que havendo vontade de prosseguir por esta opção tecnológica se façam os respectivos estudos toxicológicos a fim de garantir a inocuidade do produto final.

Procurar outras soluções sem o recurso a aditivos alimentares, como a dupla pasteurização ou a pasteurização a altas pressões, que permitam que este produto cárneo tradicional, com baixo teor em gordura e baixo teor em sal possa ser mais bem aproveitado em termos comerciais por uma região que precisa de explorar de forma mais eficaz os recursos que tem disponíveis.

6 - Bibliografia

- ACMSF (1993) – Report on vacuum packaging and associated processes. ACMSF: Advisory committee on the microbiological safety of food. Working group on vacuum packaging and associated processes. London. January. ISBN 0-11-321558-4. 69 p.
- Adams, M.; Baker, T. & Forrest, C. (1987) – A note on shelf life extension of British fresh sausage by vacuum packaging. *Journal of Applied Bacteriology*. Volume 63, Issue 3, September. pp. 227-232.
- Ahn, D. & Min, B. (2007) – Packaging and storage. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 289-300.
- Ahuya, C.; Okeyo, A.; Njuru, M. & Peacock, C. (2005) – Developmental challenges and opportunities in the goat industry: The Kenian experience. *Small Ruminant Research*. Volume 60, Issue 1-2, October. pp. 197-206.
- Almeida, G.; Gibbs, P.; Hogg, T. & Teixeira, P. (2006) – Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection. *BMC Infectious Diseases*. Volume 6, Issue 153, October. Disponível on-line no dia 26/4/08 : <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/153>.
- Almeida, V. (2008) – *Salmonella* – State of the art. In: *Handouts of Salmonella - Surveillance & Control, Concepts and Examples*. Faculdade de Medicina Veterinária / Universidade Técnica de Lisboa - Faculty of Life Sciences / University of Copenhagen. Lisbon, Portugal, 29 April. 8 p.
- Al-Shuibi, A. & Al-Abdullah, B. (2002) - Substitution of nitrite by sorbato and the effect on properties of mortadella. *Meat Science*. Volume 62, Issue 4, December, pp. 473-478.
- Alur, M. (2000) – Metabolic pathways. Release of energy (Anaerobic). In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1279-1288.
- Alzamora, S. & Salvatori, D. (2006) – Minimal processing: fundamentals and applications. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 118.1-118.16.
- Ambrosini, V.; Gusils, C.; Gonzalez, S. & Oliver, G. (2000) – Classification of bacteria - traditional. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food*

- microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 173-178.
- Anderson, M. & Pascual, V. (2000) – Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª Edición. Madrid: Díaz de Santos, S.A.. ISBN 84-7978-424-5. 441 p.
- Andrés, A.; Barat, J.; Grau, R. & Fito, P. (2007) – Principles of drying and smoking. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 37-48.
- Añíbarro, B.; Caballero, M.; García-Ara, M.; Díaz-Pena, J. & Ojeda, J. (1992). Asthma with sulfite intolerance in children: A blocking study with cyanocobalamin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 9, Issue 1, July. pp. 103-109.
- AOAC Official Method 990.28. (1994) - Sulfites in Foods. Optimized Monier-Williams Method. In: Horwitz, W. (2000) - Official Methods of Analysis of AOAC International. Volume II. Food composition; Additives; Natural contaminants. 17th Ed. Maryland: AOAC International. Chapter 47, pp. 29-30.
- Ash, M. & Ash, I. (1995) – Handbook of food additives. International guide for more than 7000 products by trade name, chemical, function and manufacturer. 1st Ed. Gower Publishing Limited. ISBN 0-566-07592-x. 1025 p.
- Aymerich, T.; Picouet, P. & Monfort, J. (2008) – Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*. Volume 78, Issue 1-2, January-February, pp. 114-129.
- Azevedo, I.; Regalo, M.; Mena, C.; Almeida, G.; Carneiro, L.; Teixeira, P.; Hogg, T. & Gibbs, P. (2005) – Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control*. Volume 16, Issue 2, February. pp. 121-124.
- Azizi, A. (2000) – Heat treatment of foods: thermal processing required for canning. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1008-1023.
- Banks, J. & Board, R. (1982) – Sulfite-inhibition of *Enterobacteriaceae* including *Salmonella* in British fresh sausage and in culture systems. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 45, Issue 14, December 1982, pp. 1292-1297.
- Banskalieva, V.; Sahlu, T. & Goetsch, A. (2000) – Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: a review. *Small Ruminant Research*. Volume 37, Issue 3, August. pp. 255-268.
- Barnett, R. E. & Hie-Joon, K. (1998) - Protein instability. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. - Food storage stability. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-2646-X. pp. 75-88.

- Barreto, A. (1992) – Um novo alimento completo para cães. Tecnologias combinadas para a valorização de vísceras e carnes rejeitadas. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. 297 f. Tese de doutoramento.
- Batt, C. (2000^a) – *Bacillus cereus*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 119-124.
- Batt, C. (2000^b) – *Lactobacillus*. Introduction. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1134-1136.
- Batt, C. (2000^c) – *Listeria*. Introduction. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1195-1198.
- Batt, C. (2000^d) – *Escherichia coli*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 633-640.
- Bauer, F. (1995) – Chemical changes during storage and spoilage of meat and meat products. In: Bauer, F & Burt, S. - Shelf life of meat and meat products: Quality aspects, chemistry, microbiology, technology. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-04-5. p 31-46.
- Bauer, F. (1996) – Chemical analysis to monitor the quality of meat and meat products. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F.- Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 183-194.
- Beales, N. & Smith, J. (2004) – Antimicrobial preservative-reduced foods. In: Smith, J. – Technology of reduced additive foods. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2004. ISBN 0-632-05532-4. pp. 84-105.
- Bell, R.; Penney, N.; Gilbert, K.; Moorhead, S. & Scott, S. (1996) – The chilled storage and retail display performance of vacuum and carbon dioxide packed hot deboned beef striploins. Meat Science. Volume 42, Issue 4, April, pp. 371-386.
- Bellwood, P. (2001) – Early agriculturalist population. Diasporas? Farming, languages and genes. Annual Review of Anthropology. Volume 30, Issue 1, October. pp. 181-207.
- Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer., L. (2002) – Biochemistry. Fifth Edition, International Edition. W.H. Freeman and Company. New York. ISBN 0-8342-1287-0. pp. 40-76.
- Bergdoll, M. (2000) – Detection of staphylococcal enterotoxins. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2076-2083.

- Bernat, E. (1996) – Los “nuevos consumidores” o las nuevas relaciones entre campo y ciudad a través de los “productos de la tierra”. *Agricultura y Sociedad* n.º 80-81, pp. 83-116.
- Betts, G. & Gaze, J. (1995) – Growth and heat resistance of psychrotrophic *Clostridium botulinum* in relation to “sous vide” products. *Food Control*. Volume 6, Issue 1. pp. 57-63.
- Bezirtzoglou, E.; Maipa, V.; Voidarou, C.; Tsiotsais, A. & Papapetropoulou, M. (2000) – Food-borne intestinal bacterial pathogens. *Microbial Ecology in Health and Disease*. Suppl 2, pp. 96-104.
- Bhaduri, S. (2000) – *Yersinia enterocolitica*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2350-2358.
- Blair, I.; McMahon, M. & McDowell, D. (2000) – *Aeromonas*. Introduction. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 25-30.
- Blakistone, B. (1999) – Meats and poultry. In: Parry, R. & Blakistone, B. – *Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods*. 2nd Edition. Gaithersburg: An Aspen Publication. ISBN 0-8342-1682-5. pp. 240-290.
- Blanchfield, J. (2005) – Good manufacturing practice (GMP) in food industry. In: Lelieveld, H.; Mostert, M. & Holah, J. – *Handbook of hygiene control in the food industry*. First Edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. ISBN 0-8493-3439-X. pp. 324-347.
- Blaschek, H. (2000^a) – *Clostridium*. Introduction. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 428-433.
- Blaschek, H. (2000^b) – *Clostridium perfringens*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 433-438.
- Blond, G.; Champion, D. & Le Meste, M. (2006) – Principles of frozen storage. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 116.1-116.19.
- Borch, E.; Kant-Muermans, M. & Blixt, Y. (1996) – Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 33, Issue 1, November. pp. 103-120.
- Botsoglou, N., Grigoropoulou, S., Botsoglou, E., Govaris, A. & Papageorgiou, G. (2003) – The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigeration. *Meat Science*. Volume 65, Issue 3, November. pp. 1193-1200.

- Bourne, M. (1987) – Effects of water activity on textural properties of food. In: Rockland, L. & Beuchat, L. – Water activity: theory and applications to food. Institute of food technologists, Chicago: Marcel Dekker. ISBN 0-8247-7759-X. pp. 75-100.
- Bourrier, T. (2006) – Intolérances et allergies aux colorants et additifs. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. Volume 46, Issue 2, March. pp. 68-79.
- Branen, A. (1993) – Introduction to use of antimicrobials. In: Davidson, P. & Branen, A. - Antimicrobials in foods. 2nd Ed. Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc.. ISBN 0-8247-8906-7. pp. 1-9.
- Bratt, L. (1999) – El tratamiento térmico. In : Footitt, R. & Lewis, A. - Enlatado de pescado y carne. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0872-9. pp. 193-228.
- Brewer, M. (2000) – Traditional preservatives – sodium chloride. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1723-1728.
- Brewer, S. (2004) – Irradiation effects on meat colour. *Meat Science*. Volume 68, Issue 1, September. pp. 1-17.
- Brody, A. (2000) – Packaging of foods. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1611-1623.
- Bruun-Jensen, L.; Skovgaard, M.; Madsen, E.; Skibsted, L. & Bertelsen, G. (1996) – The combined effect of tocopherols, L-ascorbyl palmitate and L-ascorbic acid on the development of warmed-over flavour. *Food Chemistry*, Volume 55, Issue 1, pp. 41-47.
- Caldentey, P. & Gómez, A. (1996) – Productos típicos, territorio y competitividad. *Agricultura y Sociedad* n.º 80-81, pp. 57-82.
- Camou-Arriola, J.; Zamorano-Garcia, L.; Luque-Alcaraz, A. & González-Mendez (2006) – Frozen meat: processing equipment. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 163.1-163.5.
- Campos, C. & Gerschenson, L. (1996) – Effect of certain additives on sorbate stability. *Food Research International*. Volume 29, Issue 2, March. pp. 147-154.
- Campos, C.; Alzamora, S. & Gerschenson, L. (1995) – Sorbic acid stability in meat products of reduced water activity. *Meat Science*, Volume 41, Issue 1. pp. 37-46.
- Candlish, A.; Pearson, S.; Aidoo, K.; Smith, J.; Kelly, B. & Irvine, H. (2001) - A survey of ethnic foods for microbial quality and aflatoxin content. *Food Additives and Contaminants*. Volume 18, Issue 2, November-December. pp. 129-136.

- Cardello, A. (1998) – Perception of food quality. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. - Food storage stability. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-2646-X. pp. 1-37.
- Carlin, F.; Broussolle, V.; Perelle, S.; Litman, S. & Fach, P. (2004) – Prevalence of *Clostridium botulinum* in food raw materials used in REPFEDs manufactured in France. International Journal of Food Microbiology. Volume 91, Issue 2, March. pp. 141-145.
- Carvalho, G. (1999) – Aromas e sabores de tradição da região dos Templários. 1ª ed. Região de Turismo dos Templários: SIG – Sociedade Industrial Gráfica, Lda.. ISBN 972-98350-0-4. 118 pp.
- Casp, A. & Abril, J. (1999) – Procesos de conservación de alimentos. Colección Tecnología de Alimentos. 1º ed. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente. ISBN 84-89922-23-3. 494p.
- Cattaeno, C.; Balzaretto, C.; Palma, A.; d'Aubert, S. (1991) - Sanguinacci piemontesi e lombardi: dati sulla composizione chimica e batteriologica. Ingegneria Alimentare, 6, pp. 9-18.
- Cavaco, C. (1995) - Famílias agrícolas: diversidade de ocupações e rendimentos. In: 20 valores do mundo rural. Lisboa: Ministério da Agricultura. pp. 74-78.
- Chabela, M. & Mateo-Oyague, J. (2006) – Frozen meat: quality and shelf life. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 115.1-115.9.
- Chambolle, M. (2002^a) – Substances ajoutées aux aliments et intérêt des consommateurs. In: Multon, J. – Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Sciences & Techniques Agroalimentaires. 3^{ème} Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 65-73.
- Chambolle, M. (2002^b) – Estimation des consommations d'additifs alimentaires. In: Multon, J. – Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Sciences & Techniques Agroalimentaires. 3^{ème} Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 75-102.
- Cheftel, J.; Cuq, J. & Lorient, D. (1993) - Aminoácidos, peptídeos y proteínas. In : Fennema, O. – Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acirbia. ISBN 84-200-0733-1. pp. 275-414.
- Choi, J.; Choi, W.; Cha, D.; Chinnan, M.; Park, J.; Lee, D. & Park, M. (2005) – Diffusivity of potassium sorbate in K-carrageenan based antimicrobial film. LWT- Food Sciences and Technology, Volume 38, Issue 4, June. pp. 417-423.
- Choi, S. & Chin, K. (2003) – Evaluation of sodium lactate as a replacement for conventional chemical preservatives in comminuted sausages inoculated with *Listeria monocytogenes*. Meat Science. Volume 65, Issue 1, September. pp. 531-537.

- Christian, J. (1980) – Actividad de agua reducida. In: Siliker, J.; Elliott, R.; Baird-Parker, A.; Bryan, F.; Christian, J.; Clark, D.; Olson, J. & Roberts, T. - Ecología microbiana de los alimentos. Volumen I. Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. 1ª Edición Española. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.. ISBN 84-200-0519-3. pp. 74-96.
- Chu, Y. & Hwang, L. P. (2002) – Food lipids. In: Zdzisław, E. & Sikorski, E. - Chemical and functional properties of food components. Chemical and functional properties of food components series, Vol. 3. 2ª ed. Gdansk University of Technology, Poland: CRC Press. ISBN 1-5871-6149-4. pp. 115-132.
- Chung, D.; Papadakis, S. & Yam, K. (2006) – Thermal processing of packaged foods. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 134.1-134.9.
- Cleland, A. (1996) – Package design for refrigerated food: The need for multidisciplinary project teams. Trends in Food Science & Technology. Volume 7, Issue 8, August. pp. 269-271.
- Clydesdale, F. (1998) – Color: origin, stability, measurement, and quality. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. - Food storage stability. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-2646-X. pp. 175-190.
- Colaço do Rosário, M. (1989) – Efeito de aditivos químicos nas características do salpicão tradicional de Vila Real ao longo do processo de cura. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 228 f. Tese de doutoramento.
- Coma, V. (2006) – Perspectives for the active packaging of meat products. In: Nollet, L. & Toldrá, F. – Advanced technologies for meat processing. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-587-1. pp. 449-472.
- Coma, V. (2008) - Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. Meat Science. Volume 78, Issue 3, Jan.-Feb.. pp. 90-103.
- Comissão das Comunidades Europeias (2001) – Relatório da comissão relativo à ingestão de aditivos alimentares no âmbito do regime alimentar na União Europeia. Bruxelas: Comissão das Comunidades Europeias, 1/10/2001, COM 542 final.
- Conti, M. (1997) - The content of heavy metals in food packaging paper boards: an atomic absorption spectroscopy investigation. Food Research International. Volume 30, Issue 5, November. pp. 343-348.
- Coppet, V. & Christean, S. (2004) – Altérations microbiennes liées aux bactéries lactiques hétérofermentaires dans le jambon cuit supérieur. Rapport final. ADIV - Association pour le développement de l'Institut de la Viande/OFIVAL - Office National Interprofessionnel de viande, de l'élevage et de l'aviculture. Office de l'Élevage. Etudes techniques. Qualité des viandes. 38 p. Disponible on-line no dia 18/4/08 : <http://www.office-elevage.fr/dei/f728b.pdf>

- Corredig, M. (2006) – Protein-protein interactions in food. In: Gaonkar, A. & McPherson, A.. – Ingredient interactions - Effects on food quality. Second Edition. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 0-8247-5748-3. pp. 283-308.
- Correia, A. & Correia, J. (1985) – Bioquímica animal. 2ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1249 pp.
- Cousin, M. (2000) – *Pseudomonas*. Introduction. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1864-1867.
- Cox, J. (2000^a) – *Salmonella*. Introduction. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1928-1937.
- Cox, J. (2000^b) – *Salmonella typhi*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1943-1947.
- Cross, N. (2006) – USDA safety and security guidelines for the transportation and distribution of meat, poultry and egg products. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 4. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 201.1-201.11.
- Culbertson, J. (2006) – Food Protein Functionality. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 7.1-7.13.
- Čurda, L. (2000) – Lactics and other bacteria. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 580-588.
- Cuvelier, M. & Martel, P. (2002) – Additifs antioxygènes. In: Multon, J. – Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Sciences & Techniques Agroalimentaires. 3^{ème} Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 207- 235.
- Cybulska, B. & Doe, P. (2002) – Water and food quality. In : Zdzisław, E. & Sikorski, E. - Chemical and functional properties of food components. Chemical and functional properties of food components series, Vol. 3. 2^a ed. Gdansk University of Technology, Poland: CRC Press, 2002. ISBN 1-5871-6149-4. pp. 35-50.
- Dahl, M. (2000) – *Bacillus*. Introduction. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 113-118.
- Dalgaard, P. (2006) – Microbiology of marine muscle food. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 53.1-53.20.

- Damodaran, S. (2006) – Protein: Denaturation. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 6.1-6.14.
- Day, B. (2000) – Chilled storage of foods. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 403-410.
- Dekker, M. & Linnemann, A. (1998) – Product development in the food industry. In: Jongen, W. & Meulenber, M. – Innovation of food production systems. Product quality and consumer acceptance. Wageningen: Wageningen Pers. ISBN 90-74134-51-3. pp. 67-86.
- Del Torre, Della Corte, M. & Stecchini, M. (2001) – Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. International Journal of Food Microbiology. Volume 63, Issue 3, February. pp. 199-207.
- Del Torre, M.; Stecchini, M.; Braconnier, A. & Peck, W. (2004) – Prevalence of *Clostridium* species and behaviour of *Clostridium botulinum* in gnocchi, a REPFED of Italian origin. International Journal of Food Microbiology. Volume 96, Issue 2, November. pp. 115-131.
- Demeyer, D. (2006) – Meat fermentation: principles and applications. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 2. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 0-8493-9848-7. pp. 65.1-65.11.
- Dennis, S.; Miliotis, M. & Buchanan, R. (2002) – Hazard characterization/dose-response assessment. In: Brown, M. & Stringer, M. – Microbiological risk assessment in food processing. 1st ed. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited & CRC Press LLC. ISBN 0-8493-1537-9. p 77-99.
- Desmarchelier, P. (2000) – *Vibrio*. Introduction, including *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2237-2242.
- Dias, M. (1989) – Aditivos alimentares: problemática da sua utilização. Revista Portuguesa de Nutrição. I, 1, 1989, pp.45-63.
- Diehl, J. (2002) – Principais riscos químicos contidos nos alimentos. Alimentação Animal. n.º41. pp.24-32.
- Dinis, M. (1995) - Os produtos tradicionais de qualidade e o desenvolvimento rural: A denominação de origem do "Queijo Serra da Estrela". Lisboa: Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa. 94 f. Tese de mestrado.
- Directiva da Comissão 2000/51/CE de 26 de Julho de 2000. Jornal Oficial n.º L 198 de 04/08/2000, pp. 41-43.

Directiva da Comissão 2000/63/CE de 5 de Outubro de 2000. Jornal Oficial n.º L 277 de 30/10/2000, pp. 1-61.

Directiva da Comissão 2001/30/CE de 2 de Maio de 2001. Jornal Oficial n.º L 146 de 31/05/2001, pp. 1-23.

Directiva da Comissão 2001/50/CE de 3 de Julho de 2001. Jornal Oficial n.º L 190 de 12/07/2001, pp. 14-17.

Directiva da Comissão 2001/52/CE de 3 de Julho de 2000. Jornal Oficial n.º L 190 de 12/07/2001, pp. 18-20.

Directiva da Comissão 2002/82/CE de 15 de Outubro de 2002. Jornal Oficial n.º L 292 de 28/10/2002, pp. 1-28.

Directiva da Comissão 2003/95/CE de 27 de Outubro de 2003. Jornal Oficial n.º L 283 de 31/10/2003, pp. 71-77.

Directiva da Comissão 2004/45/CE de 16 de Abril de 2004. Jornal Oficial n.º L 113 de 20/04/2004, pp. 19-23.

Directiva da Comissão 2004/46/CE de 16 de Abril de 2004. Jornal Oficial n.º L 114 de 21/04/2004, pp. 15-17.

Directiva da Comissão 2004/47/CE de 16 de Abril de 2004. Jornal Oficial n.º L 113 de 20/04/2004, pp. 24-27.

Directiva da Comissão 2006/128/CE de 8 de Dezembro de 2006. Jornal Oficial n.º L 346 de 09/12/2006, pp. 6-14.

Directiva da Comissão 2006/129/CE de 8 de Dezembro de 2006. Jornal Oficial n.º L 346 de 09/12/2006, pp. 15-25.

Directiva da Comissão 2006/33/CE de 20 de Março de 2006. Jornal Oficial n.º L 82 de 21/03/2006, pp. 10-13.

Directiva da Comissão 95/31/CE de 5 de Julho de 1995. Jornal Oficial n.º L 178 de 28/07/1995, pp. 1-19.

Directiva da Comissão 95/45/CE de 26 de Julho de 1995. Jornal Oficial n.º L 226 de 22/09/1995, pp. 1-45.

Directiva da Comissão 96/77/CE de 2 de Dezembro de 1996. Jornal Oficial n.º L 339 de 30/12/1996, pp. 1-69.

Directiva da Comissão 98/66/CE de 4 de Setembro de 1998. Jornal Oficial n.º L 257 de 19/09/1998, pp. 35-36.

Directiva da Comissão 98/86/CE de 11 de Novembro de 1996. Jornal Oficial n.º L 334 de 09/12/1998, pp. 1-63.

Directiva da Comissão 99/75/CE de 22 de Julho de 1999. Jornal Oficial n.º L 206 de 05/08/1999, pp. 19-21.

Directiva do Conselho da Comunidade Europeia 89/107/CEE de 21 de Dezembro 1988. Jornal Oficial n.º L 40, de 11/02/1989, pp.27-33.

Directiva do Conselho da Comunidade Europeia 90/496/CEE de 24 de Setembro 1990. Jornal Oficial n.º L 276, de 06/10/1990, pp.40-44.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 2000/13/CE de 20 de Março de 2000. Jornal Oficial n.º L 108 de 06/05/2000, pp. 29-42.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 2001/5/CE de 12 de Fevereiro de 2001. Jornal Oficial n.º L 55 de 24/02/2001, pp. 59-61.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 2003/114/CE de 22 de Dezembro de 2003. Jornal Oficial n.º L 24 de 29/1/2004, pp. 58-64.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 2003/115/CE de 22 de Dezembro de 2003. Jornal Oficial n.º L 24 de 29/01/2004, pp. 65-71.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 2003/52/CE de 18 de Junho de 2003. Jornal Oficial n.º L 178 de 17/7/2003, pp. 23.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 2006/52/CE de 5 de Julho de 2006. Jornal Oficial n.º L 204 de 26/07/2006, pp. 10-22.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 94/34/CEE de 30 de Junho de 1994. Jornal Oficial n.º L 237 de 10/09/1994, pp. 1-2.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 94/35/CEE de 30 de Junho de 1994. Jornal Oficial n.º L 237 de 10/09/1994, pp. 3-12.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 94/36/CEE de 30 de Junho de 1994. Jornal Oficial n.º L 237 de 10/09/1994, pp. 13-29.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 95/2/CE de 20 de Fevereiro de 1995. Jornal Oficial n.º L 61 de 18/3/1995, pp. 1-40.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 96/83/CEE de 19 de Dezembro de 1996. Jornal Oficial n.º L 48 de 19/02/1997, pp. 16-19.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 96/85/CE de 19 de Dezembro de 1996. Jornal Oficial n.º L 86 de 28/03/1997, pp. 4.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho 98/72/CE de 15 de Outubro de 1998. Jornal Oficial n.º L 295 de 4/11/1998, pp. 18-30.

- Doores, S. (1993) – Organic acids. In: Davidson, P. & Branen, A. - Antimicrobials in foods. 2nd Ed. Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc.. ISBN 0-8247-8906-7. pp. 95-136.
- Dransfield, E. (1992) – Optimisation of tenderization, ageing and tenderness. In: Proceedings of the 38th International Congress on Meat Science and Technology. Clermont-Ferrand, France. Volume 1, pp. 71-78.
- Dransfield, E. (1996) – The texture of meat: conditioning and ageing. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 65-87.
- Durand, P. (2002) – Produits carnés, charcuteries, salaisons, plats cuisinés et produits dérivés de la viande. In: Multon, J. – Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Sciences & Techniques Agroalimentaires. 3eme Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 537 - 585.
- Dzudie, T.; Ndjouenkeu, R. & Okubanjo, A. (2000) - Effect of cooking methods and rigor state on the composition, tenderness and eating quality of cured goat loins. Journal of Food Engineering. Volume 44, Issue 3, November. pp. 149-153.
- Earle, R. & Earle, M. (2004) – Unit operations in food processing. The New Zealand Institute of Food Science & Technology (Inc.). Web Edition. Disponible on-line no dia 24/3/2008: <http://www.nzifst.org.nz/unitoperations/>.
- Eburne, R. & Prentice, G. (1996) – Modified atmosphere packed ready to cook and ready to eat meat products. In: Man, C. & Jones, A. - Shelf life evaluation of foods. London: Blackie Academic & Professional. ISBN 0-7514-0033-5. pp. 156-178.
- ECFF (1996) – Guidelines for good hygienic practice in the manufacture of chilled foods. European chilled food federation. 69 p.
- EFSA (2003) – Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. European Food Safety Authority. The EFSA Journal, 14. pp.1-34.
- Eifert, J.; Arritt III, F. & Kang, D. (2006) – Microbiology of food systems. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 50.1-50.12.
- Ellis, M. (1996) – The methodology of shelf life determination. In: Man. C. & Jones, A. – Shelf life evaluation of foods. London: Blackie Academic and Professional. ISBN 0-7514-0033-5. pp. 27-39.
- Escargueil, P. (2002^a) – Définitions et classement. In: Multon, J. – Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Sciences & Techniques Agroalimentaires. 3^{eme} Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 25 - 48.

- Escargueil, P. (2002^b) – Législations française et européenne. Travaux internationaux de la FAO/OMS et du Codex. In: Multon, J. – Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Sciences & Techniques Agroalimentaires. 3^{ème} Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 117- 130.
- Esteves, A. (2005) - Perigos microbiológicos em alheira: Principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 258 f. Tese de doutoramento.
- Fagan, J. & Gormley, T. (2005) – Effect of sous vide cooking, with freezing, on selected quality parameters of seven fish species in a range of sauces. European Food Research and Technology. Volume 220, Issue 3-4, March. pp. 299-304.
- Fazio, T. & Warner, C. (1990) - A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. Food Additives and Contaminants. Volume 7, Issue 4, July-August. pp. 433–454.
- Fennema, O. & Tannenbaum, S. (1993) – Introducción a la química de los alimentos. In : Fennema, O. – Química de los alimentos. 2^a ed. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0733-1. pp. 3-27.
- Fennema, O. (1993) – Agua y hielo. In : Fennema, O. – Química de los alimentos. 2^a ed. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0733-1. pp. 29-79.
- Fernández, P. & Peck, M. (1999). A predictive model that describes the effect of prolonged heating at 70 to 90°C and subsequent incubation at refrigeration temperatures on growth from spores and toxigenesis by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in the presence of lysozyme. Applied and Environmental Microbiology. Volume 65, Issue 8, August. pp. 3449-3457.
- Ferreira, M. (2000) – Contribuição para o estudo do controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco tradicional. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. 281 f. Tese de doutoramento.
- Ferreira, M.; Oliveira, M.; Ferreira, I. & Andrade, P. (1994) – Aditivos dos produtos cárneos. 1. Aditivos azotados: Características e metodologias de doseamento. Revista portuguesa de nutrição. VI, 3. pp. 44-45.
- Ferreira, V.; Barbosa, J.; Silva, J.; Felício, M.; Mena, C.; Hogg, T.; Gibbs, P. & Teixeira, P. (2007) – Characterisation of alheiras, a traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. Food Control. Volume 18, Issue 5, May. pp. 426-440.
- Filtenborg, O.; Frisvad, J. & Thrane, U. (1996) – Moulds in food spoilage. International Journal of Food Microbiology. Volume 33, Issue 1, November. pp. 85-102.
- Flores, J. (1997) – Mediterranean vs. northern Europe meat products. Processing technologies and main differences. Food Chemistry, Volume 59, Issue 4, August. pp. 505-510.

- Fonseca, H. (1991) - Nitrito – Nitrato: Necessidade e controvérsia. Agricultura 92. 32-33, Out.-Nov. p. 44.
- Fournaud, J. (1976) – La microbiologie du saucisson sec. L'aliment et la vie. Volume 64, Issue 2-3. pp. 82-92.
- Francis, F. (1993) – Pigmentos y otros colorantes. In : Fennema, O. – Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0733-1. pp. 616-657.
- Franz, C. & von Holy, A. (1996) – Bacterial populations associated with pasteurized vacuum-packed Vienna sausages. Food Microbiology. Volume 13, Issue 2, April. pp. 165-174.
- Fraqueza, M. (2006) – Estudo das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de carne de peru embalada em atmosfera modificada. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. 506 f. Tese de doutoramento.
- Fraqueza, M.; Barreto, A.. & Ribeiro, M. (2007) – HACCP. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek; J.; Silveira, E.; Stahnke; L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 513-534.
- Fraqueza, M.; Ferreira, M. & Barreto, A. (2006) – Comportamento da *Listeria monocytogenes* na carne de peru embalada em atmosfera modificada com misturas de gases contendo árgon ou monóxido de carbono. Revista Portuguesa de Nutrição. Ano XIII, N.º 1. pp.19-35.
- Friedman, M. (1996) – Food browning and its prevention: an overview. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volume 44, Issue 3, March. pp. 631-653.
- Gadiyaram, K. & Kannan, G. (2004) - Comparison of textural properties of low-fat chevon, beef, pork and mixed-meat sausages. The South African Journal of Animal Science. Volume 34 (Supplement 1), Issue 5, pp. 212-214.
- Galipalli, S.; Gadiyaram, K.; Kouakou, B.; Pringle, T. & Kannan, G. (2004) – Oxidative stability of chevon as influenced by dietary Tasco supplementation in Boer goat bucks. The South African Journal of Animal Science. Volume 34 (Supplement 1), Issue 5, pp. 201-203.
- Gandemer, G. (2002) – Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. Meat Science. Volume 62, Issue 3, November. pp. 309-321.
- García-López, M.; Santos, J & Otero, A. (2000) – *Micrococcus*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1344-1350.

- Garriga, M. & Aymerich, T. (2007) – The microbiology of fermentation and ripening. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 125-135.
- Gibney, M., Moloney, M., Shelley, E. (1989) – The Kilkenny project: Food and nutrient intakes in randomly selected healthy adults. *British Journal of Nutrition*. Volume 61, Issue 2, March. pp. 129-137.
- Gill, C. (1996) – Extending the storage life of raw chilled meats. *Meat Science*. Volume 43, Supplement 1, September. pp. 99-109.
- Gimmel, R., Gimmel, P., Muhl, M. (1996) - Guía sobre tecnología de medición de pH. 1ª ed. Lenzkirch: Testo GmbH & Co.. 47pp.
- Goddard, M. (1996) – The storage of thermally processed foods in containers other than cans. In: Man, C. & Jones, A. - Shelf life evaluation of foods. London: Blackie Academic & Professional. ISBN 0-7514-0033-5. pp. 256-274.
- Gorris, L. (2000) – Hurdle technology. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1071-1076.
- Gould, G. (1988) - Interference with homeostasis-food. In: Whittenbury, R.; Gould, G.; Banks, J.G. & Board, R.. Homeostatic Mechanisms in Microorganisms. Bath: Bath University Press. pp. 220–228.
- Gould, G. (1996) – Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 33, Issue 1, November. pp. 51-64.
- Gould, G. (1999) – Sous vide foods: conclusions of an ECFF Botulinum Working Party. *Food Control*. Volume 10, Issue 1, February. pp. 47-51.
- Gould, G.; Abee, T.; Granum, P. & Jones, M. (1995) – Physiology of food poisoning microorganisms and problems in food poisoning control. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 28, Issue 2, December. pp. 121-128.
- Goulet, V.; Hedberg, C.; Le Monnier, A. & Valk, H. (2008) – Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases*. Volume 14, Issue 5, May. pp. 734-740.
- Gram, L. & Vogel, B. (2000) – *Shewanella*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2008-2015.
- Gram, L. (2006) – Microbial food spoilage. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 51.1-51.16.

- Gray, J; Gommaa, E. & Buckley, D. (1996) – Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*. Volume 43, Issue 3, November. pp. 485-495.
- Greer, G. & Dilts, B. (2004) – Competitive inhibition of meat spoilage bacteria. In: *Proceedings of the 50th International Congress on Meat Science and Technology*. Helsinki, Finland, 8-13 August. 4 p.
- Guerra, M. & Bernardo, F. (2004) – O risco de listeriose e a identificação do perigo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Volume XCIX, N.º 550, Abril – Junho. pp. 69-76.
- Guerra, M.; McLauchlin, J. & Bernardo, F. (2001) – *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods in Portugal. *Food Microbiology*. Volume 18, Issue 4, August. pp. 423-429.
- Guerrero, I. & Chabela, L. (2000) – Meat and Poultry. Spoilage of cooked meats and meat products. Problems caused by bacteria. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1266-1272.
- Guizani, N. & Mothershaw, A. (2006) – Fermentation: general principles. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Volume 2. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 0-8493-9848-7. pp. 63.1-63.28.
- Haard, N. (1998) – Foods as cellular systems: impact on quality and preservation. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. - *Food storage stability*. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-2646-X. pp. 39-74.
- Hamilton, R. (1994) – The chemistry of rancidity in foods. In: Allen, J. & Hamilton, R. – *Rancidity in foods*. London: Blackie Academic & Professional. ISBN 0-8342-1287-0. pp. 1-21.
- Hammack, T. & Andrews, W. (2000) – *Salmonella enteritidis*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1937-1943.
- Hammer, G. (1992) – Sustancias aditivas y aditivos. In: Wirth, F. – *Tecnología de los embutidos escaldados*. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0723-4. pp. 83-105.
- Hansen, K. & Bautista, D. (2000) – Spoilage problems. Problems caused by bacteria. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2051-2056.
- Hansen, T.; Knochel, S., Juncher, D. & Bertelsen, G. (1995) – Storage characteristics of sous vide cooked roast beef. *International Journal of Food Science and Technology*. Volume 30, Issue 3, June. pp. 365-378.
- Hart, R. (1995) – La carne como materia prima. In: Footitt, R. & Lewis, A. - *Enlatado de pescado e carne*. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0872-9. 49-65 p.

- Hartman, A., Brown, C., Palmgren, J. (1990) – Variability in nutrient and food intakes among older middle-aged men. *American Journal of Epidemiology*. Volume 132, Issue 5, November. pp. 999-1012.
- Harvey, J. & Gilmour, A. (2000) – *Staphylococcus aureus*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2066-2071.
- Hau-Yang, T. (2000) – Detection of enterotoxins of *E. coli*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 640-645.
- Henry, C. (1997) – New food processing technologies: from foraging to farming to food technology. *Proceedings of the nutrition society*. Volume 56, Issue 3, November. pp.855-863.
- Hernández-Herrero, M.; Roig-Sagués, A.; López-Sabater, E.; Rodríguez-Jerez, J. & Mora-Ventura, M. (1999) – Influence of storage temperature on the quality of beef liver; pH as a reliable indicator of beef liver spoilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 79, Issue 14, October. pp. 2035-2039.
- Hernández-Muñoz, P., Catalá, R. & Gavara, R. (2002) – Simple method for the selection of the appropriate food stimulant for the evaluation of a specific food/packaging interaction. *Food Additives and Contaminants*. Volume 19, Supplement, April. pp. 192-200.
- Hoellinger, H. (2002) – Les additifs alimentaires. In: Multon, J. – *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*. Sciences & Techniques Agroalimentaires. 3^{ème} Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 1-21.
- Holley, R. (2000) – *Brochothrix*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 314-318.
- Holley, R.; Guan, T.; Peirson, M. & Yost, C. (2002) – *Carnobacterium viridans* sp. nov, an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Volume 52, Issue 5, April. pp. 1881-1885.
- Holzappel, W. H., Geisen, R. & Schillinger, U. (1995) - Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 24, Issue 3; January. pp. 343-362.
- Honikel, K. (1996) – Meat for processing. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - *Meat quality and meat packaging*. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 107-124.

- Honikel, K. (2007) – Principles of curing. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 17-30.
- Honikel, K. (2008) – The use and control of nitrate for processing of meat products. Meat Science. Volume 78, Issue 1-2, January-February. pp. 68-76.
- Houben, J. & van Dijk, A. (2002) – Dietary vitamin E supplementation, an ascorbic acid preparation, and packaging effects on colour stability and lipid oxidation in mince made from previously frozen beef. Meat Science. European Food Research and Technology. Volume 214, Number 3, March. pp.186-191.
- Howel, N. (2006) – Interactions of proteins with selected small molecules. In: Gaonkar, A. & McPherson, A.. – Ingredient interactions - Effects on food quality. Second Edition. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 0-8247-5748-3. pp. 309-341.
- HST-19823 (1973) - Peroxide number determination. Food test methods. Budapest: Hungarian Standards Institution.
- Huang, L. (2003) – Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. Food Microbiology. Volume 20, Issue 5, October. pp. 549-559.
- Hubbert, W.; Hagstad, H.; Spangler, E.; Hinton, M. & Hughes, K. (1996) – Food safety and quality assurance: foods of animal origin. Second Edition. Iowa: Iowa State University Press. ISBN 0-8138-0714-X.
- Huis in't Veld, J. (1996) – Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. International Journal of Food Microbiology. Volume 33, Issue 1, November. pp. 1-18.
- Hulse, J. (2004) – Biotechnologies: past history, present state and future prospects. Trends in Food Science & Technology. Volume 15, Issue 1, January. pp. 3-18.
- Hultin, H. (1993) – Características del tejido muscular. In : Fennema, O. – Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0733-1. pp. 815-888.
- Humphreys, P. (1996) – Vacuum packaging for fresh meat an overview. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 285-293.
- Hyttiä-Trees, E.; Skyttä, E.; Morkkila, M.; Kinnunen, A.; Lindström, M.; Lähteenmäki L.; Ahvenainen, R. e Korkeala, H. (2000) - Safety evaluation of sous vides processed products with respect to nonproteolytic *Clostridium botulinum* by use of challenge studies and predictive microbiological models. Applied and Environmental Microbiology. Volume 66, Issue 1, January. pp. 223-229.

- IARC (1997) – Occupational exposure to mists and vapours from strong inorganic acids; and other industrial chemical. Summary of data reported and evaluation. IARC - International Agency Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 54, 1997. 14 p. Disponível on-line no dia 12/2/2008 em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol54/volume54.pdf>.
- Ibrahim, S.; Yang, H. & Seo, C. (2008) – Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7. Food Chemistry, Volume 109, Issue 1, July. pp. 137-143.
- ICMSF (1996) – Microorganisms in foods. Microbiological specifications of food pathogens. 1st Ed. Great Britain: International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies. ISBN 0-412-47350-X. 513 p.
- Ingram, M. & Roberts, T. (1980) – Radiación ionizante. In: Siliker, J.; Elliott, R.; Baird-Parker, A.; Bryan, F.; Christian, J., Clark, D.; Olson, J. & Roberts, T. - Ecología microbiana de los alimentos. Volumen I. Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. 1ª Edición Española. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.. ISBN 84-200-0519-3. pp. 48-73.
- International Standard ISO 6658 (1985) – Sensory analysis. Methodology. General guidance. International Organization for Standardization. Switzerland.
- International Standard ISO/DIS 11290-1 (1995) – Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. International Organization for Standardization. Switzerland.
- IQA (1981) – Controlo de qualidade. Azoto básico volátil total. Interpretação de resultados. Regra técnica P.O.A. n.º 1/81. Lisboa: IQA.
- Iyengar, R. & McEvily, A. (1992) - Anti-browning agents: Alternative to the use of sulfites in foods. Trends in Food Science and Technology. Volume 3. pp. 60–64.
- James, S. (1996) – Chilling and freezing of read meat. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 45-64.
- James, S. (2006) – Principles of food refrigeration and freezing. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 112.3-112.13.
- Johnson, E. (2000) – *Clostridium botulinum*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 458-463.
- Jorgensen, D. (1982) – The need of additives in industry. In: Graham, H. - Safety of foods. Second edition. Westport: AVI Publishing Company. ISBN 0-87055-337-2. pp.652-677.

- Jouve, J.; Carlier, V. & Rozier, J. (1980) – Les effets antimicrobiens des nitrites dans les produits carnés. *Annales de la Nutrition et de l'alimentation*. 34 (5-6). pp. 807-826.
- Kanatt, S., Chander, R. & Sharma, A. (2008) – Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, Volume 107, Issue 2, March. pp. 845-852.
- Kandeepan, G. & Biswas, S. (2007) – Effect of low temperature preservation on quality and shelf life of buffalo meat. *American Journal of Food Technology*. Volume 2, Issue 3. pp. 126-135.
- Kanner, J.; Harel, S. & Granit, R. (1992) – Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. In: *Proceedings of the 38th International Congress on Meat Science and Technology*. Clermont-Ferrand, France, 23 August - 28 September. Volume 1, pp. 111-125.
- Khachatouranis, G. & Arora, D. (2000) – Biochemical and modern identification techniques. Food spoilage flora (Yeasts and Moulds). In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 228-237.
- Kilara, A. (2006) – Interactions of ingredients in food systems: An introduction. In: Gaonkar, A. & McPherson, A.. – *Ingredient interactions - Effects on food quality*. Second Edition. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 0-8247-5748-3. pp. 1-20.
- Knodel, L. (1997) – Potential health hazards of sulfites. *Toxic Substances Mechanisms*. Volume 16, Issue 3, July- September. pp. 309-311.
- Komolprasert, V. (2006) – Food packaging: new technology. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 130.1-30.10.
- Konstantinus, K.; Geornaras, I. & Sofos, J. (2006) – Microbiology of land muscle foods. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 52.1-52.43.
- Koohmaraie, M. (1992) – Muscle proteinases and meat aging. In: *Proceedings of the 38th International Congress on Meat Science and Technology*. Clermont-Ferrand, France, 23 August - 28 September, Volume 1, pp. 61-69.
- Koohmaraie, M. (1994) – Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*. Volume 36, Issue 1, pp. 93-104.
- Korkeala, H., Alanko, T., Mäkelä, P., Lindroth, S. (1989) – Shelf-life of vacuum-packed ring sausage. *International Journal of Food Microbiology*. 9. pp. 237-247.

- Korkeala, H., Lindroth, S., Ahvenainen, R. & Alanko, T. (1987) – Interrelationship between microbial numbers and other parameters in spoilage of vacuum-packed ring sausage. *International Journal of Food Microbiology* . pp. 311-321.
- Krist, K., Nichols, D. & Ross, T. (2000) – Ecology of bacteria and fungi in foods. Influence of available water In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 539-547.
- Küplülü, Ö.; Göncüoğlu, M.; Özdemir, H. & Koluman, A. (2006) – Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. *Food Control*. Volume 17, Issue 3, March. pp. 222-224.
- Labadie, J. (2007) – Spoilage microorganisms: risks and control. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 421-426.
- Lawrie, R. (1998) – The eating quality of meat. In: Lawrie, R. - *Lawrie's meat science*. 6th ed. Woodhead Publishing: Cambridge. ISBN 978-1-85573-395-4. pp. 212-226.
- Le Maguer, M. (1987) – Mechanics and influence of water binding on water activity. In: Rockland, L. & Beuchat, L. – *Water activity: theory and applications to food*. Institute of food technologists, Chicago: Marcel Dekker. ISBN 0-8247-7759-X. pp. 1-25.
- Le Meste, M.; Roudaut, G.; Champion, D.; Blonde, G. & Simatos, D. (2006) – Interaction of water with food components. In: Gaonkar, A. & McPherson, A.. – *Ingredient interactions - Effects on food quality*. Second Edition. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 0-8247-5748-3. pp. 87-138.
- Lebert, I.; Dussap, C. & Lebert, A. (2005) – Combined physico-chemical and water transfer modelling to predict bacterial growth during food processes. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 102, Issue 3, July. pp. 305-322.
- Leclercq, C.; Molinaro, M.; Piccinelli, R.; Baldini, M.; Arcella, D. & Stacchini, P. (2000) – Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. *Food Additives and Contaminants*. Volume 17, Issue 12, December. pp. 979-989.
- Lee, J. & Schwartz, S. (2006) – Pigments in plant foods. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 14.1-14.13.
- Lee, J.; Kannan, G.; Eega, K.; Kouakou, B. & Getz, W. (2008^a) – Nutritional and quality characteristics of meat from goats and lambs finished under identical

- dietary regime. *Small Ruminant Research*. Volume 74, Issue 1-3, January. pp. 255-259.
- Lee, J.; Kouakou, B. & Kannan, G. (2008^b) – Chemical composition and quality characteristics of chevon from goats fed three different post-weaning diets. *Small Ruminant Research*. Volume 75, Issue 2-3, March. pp. 177-184.
- Legarreta, I. (2006) – Thermal processing of meats. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Boca Raton: Taylor & Francis. Volume 4. ISBN 1-57444-552-9. pp. 162.1 –162.9.
- Leisner, J. & Gram, L. (2000) – Spoilage of fish. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 813-820.
- Leistner, L. & Gorris, L.. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*. Volume 6, Issue 2, February. pp. 41-46.
- Leistner, L. & Gould, G. (2002) – Hurdle technologies - Combination treatments for food stability, safety and quality. *Food engineering series*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. 194 p.
- Leistner, L. (1986) – Nitrite (nitrite curing salt) and meat products situation in West Germany. *Die Fleischerei (Industrieausbele Englisch)*. 37 (4). 11-13.
- Leistner, L. (2000) – Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 55, Issue 1-3, April. pp. 181-186.
- Lenovich, L. (1987) - Survival and death of microorganisms as influenced by water activity. In: Rockland, L. & Beuchat, L. – *Water activity: theory and applications to food*. Institute of food technologists, Chicago: Marcel Dekker. ISBN 0-8247-7759-X. pp. 119-136.
- Lich, N. & Blanquat, G. (2002) – Procédures légales d'outorisation d'emploi d'additifs alimentaires, d'auxiliaires technologiques, de matériaux et objets destinés à être en contact avec les denrées alimentaires. In: Multon, J. – *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*. Sciences & Techniques Agroalimentaires. 3^{eme} Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 131-155.
- Li-Chan, E. (2006) – Analysis of chemical composition of foods. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 42.1-42.18.
- Lim, M.; McFertridge, J. & Liesebach, J. (2006) – Frozen food: components and chemical reactions. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 114.1-114.10.

- Lindsay, R. (1993) – Aditivos alimentarios. In : Fennema, O. – Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0733-1. pp. 709-773.
- Liu, S. (2006) – Modeling of thermal processing of foods. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp110.1-110.12.
- Lonvaud-Funel, A. (2000) – *Leuconostoc*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1183-1194.
- Lopes, M.; Cunha, A.; Clemente, J.; Carrondo, M. & Crespo, M. (1999) – Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 51, Issue 2, February. pp. 249-254.
- Lopes, M.; Leitão, A.; Regalla, M.; Marques, J.; Carrondo, M. & Crespo, M. (2002) – Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. International Journal of Food Microbiology. Volume 76, Issue 1-2, June. pp. 107-115.
- López-Díaz, T.; Alfonso, C.; Román, C.; Garcia-López, M. & Moreno, B. (2000) – Lactic acid bacteria isolated from hand-made blue cheese. Food Microbiology. Volume 17, Issue 1, February. pp. 23-32.
- Lourenço, F. (1998) - Os Sabores de Proença: À descoberta dos sabores da gastronomia do Concelho de Proença-a-Nova. Proença-a-Nova: Câmara Municipal de Proença-a-Nova, Portugal.
- Lourenço, F. (2001) – Agricultura e ruralidade: Algumas reflexões sobre desenvolvimento rural. In: Comunicações ao 1º Congresso de Estudos Rurais. Vila Real, Portugal, 16 a 18 de Setembro de 2001. Recolhido em <http://home.utad.pt/~des/cer/CER/DOWNLOAD/1016.PDF>. a 25/1/2006 na World Wide Web.
- Lund, B. (1990) – Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium species*. Lancet. Volume 336, Issue 8721, October. pp. 982-986.
- Luppens, S.; Reij, M.; van der Heijden, R.; Rombouts, F. & Abee, T. (2002) - Development of a standard test to asses the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. Applied and Environmental Microbiology. Volume 68, Issue 9, September. pp. 4194-4200.
- Machado, R.; Toledo, M. & Vicente, E. (2006) – Sulphites in foods. Brazilian Journal of Food Technology, Volume 9, Issue 4, October-December. pp. 265-275.
- Mahan, L. & Escott-Stump, S. (1998) – Energia. In: Mahan, L. & Escott-Stump, S. - Alimentos, Nutrição & Dietoterapia. São Paulo: Roca. ISBN 85-7241-240-9. pp. 17-29.

- Man, D. (2002) – Shelf life. Food industry briefing series. 1^a ed. London: Blackwell Science.. ISBN 0-632-05674-6. 113 p.
- Mano, S.; Pereda, J. & Fernando, G. (2002) – Aumento da vida útil e microbiologia da carne suína embalada em atmosfera modificada. *Ciência e Tecnologia Alimentar*. Volume 22, Issue 1, Janeiro-Abril. pp. 1-10.
- Marks, B. (2006) – Thermal processing of foods: principles and applications. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Volume 3. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 107.1-107.14.
- Martens, T. (1996) – The “sous vide” process. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - *Meat quality and meat packaging*. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 335-345.
- Marth, E. H. (1998) - Extended shelf life refrigerated foods: Microbiological quality and safety. A scientific status summary of the institute of food technologists expert panel on food safety and nutrition. *Food Technology*. Volume 52, Issue2, 1998. pp. 57-62.
- Martin, S. & Fisher, C. (2000) – *Listeria monocytogenes*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1228-1238.
- Martin, S. & Landolo, J. (2000) – *Staphylococcus*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2062-2065.
- Martinez, M. & Whitaker, J. (1995) – The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*. Volume 6, Issue 6, June. pp. 195–200.
- Martins, C. & Patarata, L. (1993) – Análises físico-químicas de carne e produtos cárneos. Protocolos de apoio às aulas práticas de tecnologia dos produtos animais. Série Didáctica Ciências Aplicadas, 32. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 100 pp.
- Martins, C. (1990) – Análise sensorial de alimentos. Série Didáctica Ciências Aplicadas, 7. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 39 pp.
- Martins, S.; Wim, M. & Boekel, M. (2001) – A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*. Volume 11, Issue 9-10, September. pp. 363–373.
- Mason, L.; Church, I.; Ledward, A. & Parson, A. (1990) – Review: the sensory quality of foods produced by conventional and enhanced cook-chill methods. *International Journal of Food Science and Technology*. Volume 25, Issue 3, June.. pp. 247-259.

- Mathews, S.; Singhal, R. & Kulkarni, P. (1990) – Chemical indices of food decomposition. *Trends in Food Science & Technology*. Volume 1, October.. pp. 89-91.
- McClane, B. (1996) – An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon*. Volume 34, Issue 11-12, November-December. pp. 1335-1343.
- McEvily, A.; Iyengar, R. & Otwell, W. (1992) - Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Review of Food Science Nutrition*. Volume 32. pp. 253-273
- McLauchlin, J. (1996) – The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*. Volume 7, Issue 4-5, August –October. pp. 187-193.
- McLauchlin, J.; Grant, K. & Little, C. (2006) – Food-borne botulism in the United Kingdom. *Journal of Public Health*. Volume 28, Issue 4, December. pp. 337-342.
- Mead, P. & Griffin, P. (1998) – *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*. Volume 352, Issue 9135, October. pp. 1207-1212.
- Mélédié, J. (2002) – Rôle et intérêt des additifs en technologie alimentaire. In: Multon, J. – Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. *Sciences & Techniques Agroalimentaires*. 3^{ème} Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 49-64
- Membré, J., Kan-King-Yu, D. & C. Blackburn (2008) – Use of sensitivity analysis to aid interpretation of a probabilistic *Bacillus cereus* spor lag time model applied to heat-treated chilled foods (REPFEDs). *International Journal of Food Microbiology*. Article in press, corrected proof. Disponible on-line no dia 3/7/2008: <http://www.sciencedirect.com>
- Mena, C.; Almeida, G.; Carneiro, L.; Teixeira, P.; Hogg, T. & Gibbs, P. (2004) – Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*. Volume 21, Issue 2, April. pp. 213-216.
- Messer, J. & Clifford, J. (2000) – Total viable counts. Pour plate technique. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2154-2158.
- Miller, M. W. (1979). Yeasts in food spoilage: an update. *Food Technology*. Volume 33, Issue 2. pp. 76-80.
- Miller, S. (1984). The role of food safety in health and development. WHO Technical Report Ser. 705. Geneva: World Health Organization.
- Mintz, S. & Du Bois, C. (2002) – The anthropology of food and eating. *Annual Review of Anthropology*, Volume 31, Issue 1, October. pp. 99-119.

- Mondry, H. (1996) – Packaging systems for processed meat. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. (1996) - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST.. ISBN 90-75319-14-2. pp. 323-333.
- Morris, C.; Brody, A. & Wicker, L. (2007) – Non-thermal food processing/prevention technologies: A review with packaging implications. Packaging Technology and Science. Volume 20, Issue 4, July. pp. 275-286.
- Moss, M. (2000) - Spoilage problems. Problems caused by Fungi. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2056-2062.
- Mossel, D. & Garcia, B. (1985) – Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. 1ª ed. Española. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.. ISBN 84-200-0561-4. 375 p.
- Mossel, D., Corry, J., Struijk, C. & Baird, R. (1995) - Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies. England: John Wiley and Sons Ltd.. ISBN 0-471-93036-9. 699 p.
- Muller, H. & Tobin, G. (1986) - Nutrición y ciencia de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0585-1. 321 p..
- Murphy, R.; Hanson, R.; Duncan, L.; Feze, N. & Lyon, B. (2005) – Considerations for post-lethality treatments to reduce *Listeria monocytogenes* from fully cooked bologna using ambient and pressurized steam. Food Microbiology. Volume 22, Issue 4, August. pp. 359-365.
- Nauta, M.; Litman, S.; Barker, G. & Carlin, F. (2003) – A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology. Volume 83, Issue 2, June. pp. 205-218.
- Nawar, W. (1993) – Lipidos. In : Fennema, O. – Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0733-1. pp. 157-274.
- Nawar, W. (1998) – Biochemical processes: Lipid instability. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. - Food storage stability. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-2646-X. p 89-103.
- Nicholas, J. (1995) – Higiene de los alimentos. Directrices para profesionales de hostelería, restauración y catering. 2ª Edición Española. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.. ISBN 84-200-0894-X. 375 p.
- Nickerson, J. & Ronsivalli (1982) – Elementary food science. Second printing. Westport: AVI Publishing Company. ISBN 0-87055-194-9. 368 p.
- Nicoli, M.; Elizalde, B.; Piotti, A. & Lericci, C. (1991) – Effect of sugars and Maillard reaction products on poliphenol oxidase and peroxidase activity in food. Journal of Food Biochemistry. Volume 15, Issue 3, September. pp. 169–184.

- Nissen, L.; Byrne, D.; Bertelsen, G & Skibsted, L. (2004) – The antioxidive activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Science*. Volume 68, Issue 3, November. pp. 485-495.
- Nissen, L.; Rosnes, J.; Brendehaug, J. & Kleiberg (2002) – Safety evaluation of sous vide-processed ready meals. *Letters in applied microbiology*. Volume 35, Number 5, November 2002, pp. 433-438.
- Noronha, J. (1996) – Improved procedures for designing, evaluating and optimising in-pack thermal processing of foods. *Wetenschappen: Faculteit Landbouwkundige en Toegepast Biologische - Katholieke Universiteit Leuven*. 186 f. Tese de doutoramento.
- Nørrung, B. (2000) – Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special considerations of risk assessment approaches. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 62, Issue 3, December. pp. 217-221.
- Notermans, S. & Barendsz, A. (2002) – The evolution of microbiological risk assessment. In: Brown, M. & Stringer, M. – *Microbiological risk assessment in food processing*. 1st ed. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited & CRC Press LLC. ISBN 0-8493-1537-9. p 5-43.
- Notermans, S. (2000) – Food poisoning outbreaks. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 835-840.
- Novak, J. & Juneja, V. (2002) – *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Volume 3, Issue 2, June. pp. 127-132.
- NP-1224 (2002) - Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação da matéria gorda livre. Método de referência. Lisboa: IPQ. 6 p.
- NP-1612 (1979) - Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de azoto total. Método de referência. Lisboa: IPQ. 6 p.
- NP-1614 (2002) - Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação da humidade. Processo de referência. Lisboa: IPQ. 5 p.
- NP-1615 (2002) - Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação da cinza total. Processo de referência. Lisboa: IPQ. 6 p.
- NP-1735 (1986). Aditivos alimentares. Definição, classificação e princípios de aplicação. Lisboa: IPQ. 52 p.
- NP-1736 (1986). Géneros alimentícios e aditivos admissíveis. Lisboa: IPQ. 110 p.
- NP-1845 (1982). Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de cloretos. Método corrente. Lisboa: IPQ. 2 p.

- NP-1846 (1987) - Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de nitritos. Processo de referência. Lisboa: IPQ. 8 p.
- NP-1848 (1987) - Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor em azoto básico volátil total. Método das células de Conway. Lisboa: IPQ. 6 p.
- NP-1933 (1982) – Microbiologia alimentar. Regras gerais para pesquisa de *Salmonella*. Lisboa: IPQ. 15 p.
- NP-1995 (1982) – Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos a 30°C. Lisboa: IPQ. 5 p.
- NP-2077 (1985) - Microbiologia alimentar. Carne e produtos cárneos. Contagem de bolores e leveduras. Lisboa: IPQ. 9 p.
- NP-2079 (1989) – Microbiologia alimentar. Regras gerais para análise microbiológica. Lisboa: IPQ. 21 p.
- NP-2260 (1986) – Microbiologia alimentar. Regras gerais para pesquisa de *Staphylococcus aureus*. Lisboa: IPQ. 11 p.
- NP-2262 (1986) – Microbiologia alimentar. Regras gerais para pesquisa de esporos de clostrídios sulfito- -reductores. Lisboa: IPQ. 8 p.
- NP-2307 (1987) – Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos psicrotróficos. Lisboa: IPQ. 7 p.
- NP-3005 (1985) – Microbiologia alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica. Lisboa: IPQ. 8 p.
- NP-3356 (1990) - Pescado. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (T.B.A.). Método espectrofotométrico. Lisboa: IPQ. 5 p.
- NP-3441 (1990) - Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do pH. Processo de referência. Lisboa: IPQ. 8 p.
- NP-4137 (1991) – Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de *Enterobacteriaceae*. Lisboa: IPQ. 11 p.
- NP-4396 (2002) – Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de *Escherichia coli*. Método corrente. Lisboa: IPQ. 10 p.
- Nunes, C. & Baptista, A. (2001) – Implicações da reacção de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. Volume XCVI, N.º 538, Abril – Junho. pp. 53-59.
- Nychas, G. & Drosinos, E. (2000) – Meat and Poultry. Spoilage of meat. Problems caused by bacteria. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1253-1260.

- Nychas, G. & Tassou, C. (1997) – Spoilage processes and proteolysis in chicken as detected by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 74, Issue 2, June. pp. 199-208.
- Nychas, G.; Dillon, R. & Board, V. (1988) – Glucose, the key substrate in the microbiological changes occurring in meat and certain meat products. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. Volume 10, Issue 3, June. pp. 203-231.
- O'Mahony, F.; O'Riordan, C.; Papkovskaia, N.; Ogurstov, V.; Kerry, J. & Papkovsky, D. (2004) – Assessment of Oxigen levels in convenience style muscle-based sous vide products through optical means and impact on shelf-life stability. *Packaging Technology and Science*. Volume 17, Issue 4, July - August. pp. 225-234.
- Ockerman, H. & Basu, L. (2007) – Production and consumption of fermented meat products. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek; J.; Silveira, E.; Stahnke; L. & Talon, R. – *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 9-15.
- Oliveira, M. & Guimarães, I. (1991) – Aditivos alimentares: Sua importância nos produtos comercializados entre nós. *Revista Portuguesa de Nutrição*. III, 1, 1991, pp.29-38.
- Oliveira, M. (1996) - Aditivos dos produtos cárneos. *Alimentar, Revista portuguesa de alimentação*. 10, 42, Mar/Abr. pp. 15-17.
- Olson, J. & Nottingham, P. (1980) – Temperatura. In: Siliker, J.; Elliott, R.; Baird-Parker, A.; Bryan, F.; Christian, J., Clark, D.; Olson, J. & Roberts, T. - *Ecología microbiana de los alimentos*. Volume I. Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. 1ª Edición Española. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.. ISBN 84-200-0519-3. pp. 1-38.
- Ordóñez, J. & Hoz, L. (2007) – Mediterranean products. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek; J.; Silveira, E.; Stahnke; L. & Talon, R. – *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 333-347.
- Osawa, M. (1995) – The measurement of the meat pigments by fibre-optic reflectance spectrophotometry using the Kubelka-Munk equation. *Meat Science*. Volume 40, Issue 1, pp. 63-77.
- Oteiza, J.; Chinen, I.; Miliwebsky, E. & Rivas, M. (2006) – Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). *Food Microbiology*. Volume 23, Issue 3, May, pp. 283-288.
- Oteiza, J.; Giannuzzi, L. & Califano, A. (2003) – Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* isolated from morcilla as affected by

- composition of the product. Food Research International. Volume 36, Issue 7, August, pp. 703-712.
- Ough, C. (1993) – Sulfur dioxide and sulfites. In: Davidson, P. & Branen, A. - Antimicrobials in foods. 2nd Ed. Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc.. ISBN 0-8247-8906-7. pp. 137-190.
- Ozaki, A., Yamaguchi, Y., Fujita, T., Kuroda, K. & Endo, G. (2004) - Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. Food and Chemical Toxicology, Volume 42, Issue 8, August, pp. 1323-1337.
- Pan, G. & Melton, L. (2007) – Nonenzymatic browning of lactose and caseinate during dry heating at different relative humidities. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volume 55, Issue 24, October. pp. 10036-10042.
- Pandey, A.; Joshi, V.; Nigam, P. & Soccol, C. (2000) – Enterobacteriaceae, coliforms and *E. coli*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 604-610.
- Parent-Massin, D. & Blanquat, G. (2002) – Évaluation des risques toxicologiques et nutritionnels liés à l'utilisation des additifs et auxiliaires de fabrication. In: Multon, J. – Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Sciences & Techniques Agroalimentaires. 3^{ème} Edition. Paris: Editions TEC & DOC. ISBN 2-7430-0436-3. pp. 103-115.
- Patarata, L. (1995^a) – Conservação de produtos de salsicharia tradicional: relatório de uma aula teórico-prática. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 72 pp..
- Patarata, L. (1995^b) – Avaliação de parâmetros de conservação (actividade da água e pH) e pesquisa de *Staphylococcus aureus* em produtos de salsicharia tradicional. Protocolo de um trabalho prático. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 25 pp..
- Pearson, D. (1970) – The chemical analysis of foods. Sixth edition. London: J. & A. Churchill. ISBN 0-7000-1457-8. 604pp.
- Peck, M. & Stringer, S. (2005) – The safety of pasteurised in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. Meat Science. Volume 70, Issue 3, July. pp. 461-475.
- Peck, M.; Goodburn, K.; Betts, R. & Stringer, S. (2008) – Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled. Trends in Food Science & Technology. Volume 19, Issue 4, April. pp. 207-216.

- Peirson, M.; Guan, T. & Holley, R. (2003) – Thermal resistances and lactate and diacetate sensitivities of bacteria causing bologna discolouration. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 86, Issue 3, September. pp. 223-230.
- Petäjä-Kanninen, E. & Puolanne, E. (2007) – Principles of meat fermentation. In: Toldrá, F.; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 31-36.
- Petit, L.; Gibert, M. & Popoff, M. (2000) – Detection of enterotoxin of *Clostridium perfringens*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 438-445.
- Pivnic, H. (1980) – Sales de curado y sustancias análogas. In: Siliker, J.; Elliott, R.; Baird-Parker, A.; Bryan, F.; Christian, J., Clark, D.; Olson, J. & Roberts, T. - *Ecología microbiana de los alimentos*. Volumen I. Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. 1ª Edición Española. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.. ISBN 84-200-0519-3. pp. 143-167.
- Pizza, A.; Pedrielli, R.; Quintavalla, S.; Bergamaschi, M.; Franceshini, M.; Barbieri, G. & Larini, A. (2004) – Effect of mild chemical and physical hurdles on the shelf life of vacuum-packed portions of Italian mortadella sausages. In: *Proceedings of the 50th International Congress on Meat Science and Technology*. Helsinki, Finland, 8-13 August. 4 p.
- Poças, M. & Oliveira (1997) - *A embalagem de produtos alimentares*. Lisboa: F.I.P.A. - Federação das Indústrias Portuguesas Agro-alimentares. 40 pp. ISBN 972-8076-27-4.
- Prates, J. (1999) – Contribuição para o estudo do papel da actividade peptido hidrolásica (EC3.4) na maturação da carne refrigerada. Estudo experimental no coelho (*Oryctolagus cuniculus L.*). Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. 528 f. Tese de doutoramento.
- Pujol, D. (1997) – A organização colectiva de uma fileira para a valorização local dos recursos agrícolas: o exemplo da produção de queijo. *Inovação em Meio Rural*, Caderno N.º 1, Observatório Europeu LEADER/AEIDL. 27pp.
- Rajkovic, A.; Uyttendaele, M.; Courtens, T.; Heyndrickx, M. & Debevere, J. (2006) – Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in vacuum packed potato puree. *International Journal of Food Science and Technology*. Volume 41, Issue 8, October. pp. 878-884.
- Ramírez, M.; Morcuende, D.; Estévez, M. & Cava, R. (2004) – Effects of the type of frying with culinary fat and refrigerated storage on lipid oxidation and colour of fried pork loin chops. *Food Chemistry*, Volume 88, Issue 1, November. pp. 85-94.

- Ranken, M. (2000) – Handbook of meat product technology. Oxford: Blackwell Science. ISBN 0-632-05377-1. 212 pp.
- Regulamento (CE) N.º 1882/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Setembro de 2003. Jornal Oficial n.º L 284 de 13/10/2004, pp. 1-53.
- Regulamento (CE) N.º 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Outubro de 2004. Jornal Oficial n.º L 338 de 13/11/2004, pp. 4-17.
- Regulamento (CE) N.º 50/2000 do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de Janeiro de 2003. Jornal Oficial n.º L 6 de 11/01/2000, pp. 15-17.
- Reid, D. (1998) – Freezing preservation of fresh foods: quality aspects. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. - Food storage stability. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-2646-X. p 387-398.
- Reinoso, E.; El-Sayed, A.; Lämmler, C.; Bogni, C. & Zschöck, M. (2008) – Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. Microbiological Research. Volume 163, Issue 3, May. pp. 314-322.
- Resurreccion, A. (2003) – Sensory aspects of consumer choice for meat and meat products. Meat Science. Volume 66, Issue 1, June, pp. 531-541.
- Ribeiro, M. & Martins, C. (1996) – La certificación como estrategia de valorización de productos agroalimentarios tradicionales: la alheira, um embutido tradicional de Trás-os-Montes. Agricultura y Sociedad n.º 80-81, pp. 313-334.
- Ribera, D.; Jonker, D.; Narbonne, J.; O'Brien, J. & Antignac, E. (2001) – Absence of adverse effects of sodium metabisulphite in manufactured biscuits: results of subacute (28-days) and subchronic (85-days) feeding studies in rats. Food Additives and Contaminants. Volume 18, Issue 2, February. pp. 103-114.
- Richards, M. (2006) – Lipid chemistry and biochemistry. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 8.1-8.21.
- Robinson, A.; Gibson, A & Roberts, A. (1982) – Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurised meat. V. Prediction of toxin production. Journal of Food Technology. 17, pp. 727-744.
- Roller, S. (1999) – Physiology of food spoilage organisms. International Journal of Food Microbiology. Volume 50, Issue 1-2, September. pp. 151-153.
- Rompf, A. & Jahn, D. (2000) – Ecology of bacteria and fungi in foods. Influence of redox potential and pH. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 556-563.

- Roncalés, P. (2007) – Additives. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek; J.; Silveira, E.; Stahnke; L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 77-86.
- Rooney, M. & Yam, K. (2004) – Novel food packaging. In: Smith, J. – Technology of reduced additive foods. Oxford: Blackwell Science Ltd.. ISBN 0-632-05532-4. pp. 61-83.
- Ross, T. & Nichols, D. (2000) – Ecology of bacteria and fungi in foods. Influence of temperature. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 547-556.
- Rowe, M. & Madden, R. (2000) – *Campylobacter*. Introduction. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 335-341.
- Ruiz, J. (2007) – Ingredients. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek; J.; Silveira, E.; Stahnke; L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 59-76.
- Ruusunen, M. & Puolanne, E. (2005) – Reducing sodium intake from meat products. Meat Science. Volume 70, Issue 3, July. pp. 531-541.
- Rybka-Rodgers, S. (2001) – Improvement of food safety design of cook-chill foods. Food Research International. Volume 34, Issue 5, November. pp. 449-455.
- Sablani, S.; Kasapis, S. & Rahman, M. (2007) – Evaluating water activity and glass transition concepts for food stability. Journal of Food Engineering. Volume 78, Issue 1, January. pp. 57-62.
- Salavessa, J. (2000) – Contributo para a caracterização do queijo de cabra Pinhal. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa. 125 f. Tese de mestrado.
- Salvat, G.; Toquin, M. & Colin, M. (1995) – Control of *Listeria monocytogenes* in delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. International Journal of Food Microbiology. Volume 25, Issue 1, March. pp. 75-81.
- Sanders, T. (1994) - Nutricional aspects of rancidity. In: Allen, J. & Hamilton, R. – Rancidity in foods. London: Blackie Academic & Professional. ISBN 0-8342-1287-0. pp. 128-140.
- Santos, M.; Zaritzky, N. & Califano, A. (2008) – Modeling heat transfer and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in precooked meat products in Argentina using the finite element method. Meat Science. Volume 79, Issue 3, December. pp. 595-602.

- Sarbhoy, A. & Kulshrestha, M. (2000) – Food-borne Fungi. Estimation by classical cultural techniques. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 854-860
- Schuddeboom, L. (1993) – Nitrates and nitrites in foodstuff. Council of Europe Press, Publishing and Documentation Service. ISBN 92-871-2424-6. 124 p..
- Scotter, M. & Castle, L. (2004) – Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. Food Additives & Contaminants. Volume 21, Issue 2, February. pp. 93-124.
- Serdaroglu, M. & Yildiz-Turp, G. (2004) – The effects of ascorbic acid, rosemary extract and "-tocopherol/ascorbic acid on some quality characteristics of frozen chicken patties. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Food Science and Technology, Volume 7, Issue 1. Disponível on-line no dia 11/9/2007: <http://www.ejpau.media.pl/series/volume7/issue1/art-01.html>.
- Shahide, F.; Pegg, R.; Gogan, N. & de Silva, S. (1994) – The cooked cured-meat pigment – ESR studies. In: Proceedings of the 40th International Congress on Meat Science and Technology. The Hague, Netherlands, 28 August - 2 September. Paper S-VIB.21, pp. 1-5.
- Shaw, R. (1996) – Extending the shelf-life of chilled ready meals. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 359-367.
- Silva, G., Oliveira, M., Oliveira, V. (2000) – Produtos tradicionais com nomes protegidos. Contributo para a análise da política de protecção. Direcção Geral do Desenvolvimento Rural, Lisboa. ISBN 972-9175-80-2. 90 pp.
- Silva, J.; Gonzales, S.; Palacios, J. & Oliver, G. (2000) – The fungal hypha. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 850-853.
- Simela, L. & Merkel, R. (2008) – The contribution of chevon from Africa to global meat production. Meat Science. Volume 80, Issue 1, September, pp. 101-109.
- Sinell, H. (1980) – Factores que influyen en las poblaciones mixtas. In: Silliker, J.; Elliot, R.; Baird-Parker, A.; Bryan, J.; Christian, J.; Clark, D; Olson, J. & Roberts, T.. Ecología microbiana de los alimentos. Volumen 1. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Internacional Comisión on Microbiological Specifications for Foods. 2^a Edición Española. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.. ISBN 84-200-0519-3. pp. 225-241.
- Singh, R. (1996) – Scientific principles of shelf life evaluation. In: Man. C. & Jones, A.. – Shelf life evaluation of foods. London: Blackie Academic and Professional. ISBN 0-7514-0033-5. pp. 3-26.

- Skibsted, L. (1996) – Chemical changes in meat and meat products during storage, transportation and retail display – Theoretical considerations. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 169-181.
- Skibsted, L.; Bertelsen, G. & Quist, S. (1994) – Quality changes during storage of meat and slightly preserved meat products. In: Proceedings of the 40th International Congress on Meat Science and Technology. The Hague, Netherlands, 28 August- 2 September. Paper S-II.MP1, 12 pp.
- Smith, C.; Belk, K.; Sofos, J.; Scangar, M.; Smith, K. & Smith, G. (2001) – Effects of activated ozone, on lipid peroxidation, when applied to carcasses and to ground beef during blending. Disponível on-line no dia 3/9/08: http://www.anci.colostate.edu/files/meat_science/cds012.pdf
- Smith, J. & Hong-Shum, L. (2003) - Food additives data book. 1^a ed. London: Blackwell Science. ISBN 0-632-06395-5. 1016 pp.
- Soares, M. (2003) – Segurança alimentar: perigos biológicos e químicos. Coleção Veterinária XXI – N.º 9, Publicações Ciência e Vida, Lda. ISBN 972-590-074-X. 163 pp.
- Sobel, J.; Tucker, N.; Sulka, A.; McLaughlin & Maslanka, S. (2004) – Foodborne botulism in the United States, 1990-2000. Emerging Infectious Diseases. Volume 10, Issue 9, September. pp. 1606-1611.
- Soeiro, A. (1998) – Estratégias para a valorização dos produtos tradicionais portugueses: o caso particular das protecções das denominações de origem, das indicações geográficas e dos nomes específicos. In: 1^{as} Jornadas de Queijos e Enchidos. Porto, Portugal, 3 de Abril . pp. 19-22.
- Sofos, J. & Busta, F. (1993) - Sorbic acid and sorbates. In: Davidson, P. & Branen, A. - Antimicrobials in foods. 2nd Ed. Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc.. ISBN 0-8247-8906-7. pp. 49-94.
- Soler, J. (2000) – Hongos. In: Anderson, M. & Pascual, V. - Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2^a Edición. Madrid: Díaz de Santos, S.A.. ISBN 84-7978-424-5. pp. 141-148.
- Solomon, M.; Liu, M.; Patel, J.; Bowker, B. & Sharma, M. (2006) – Hydrodynamic pressure to improve meat quality and safety. In: Nollet, L. & Toldrá, F. – Advanced technologies for meat processing. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-587-1. pp. 219-244.
- Sousa, M. & Ribeiro, A. (1983) - Chouriço de carne português: Tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica. Indústria Alimentar. Vol. I, Novembro. pp. 14-23.
- Spiess, W.; Boehme, T. & Wolf, W. (1998) – Quality changes during distribution of deep-frozen and chilled foods: distribution chain situations and modeling

- considerations. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. - Food storage stability. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. ISBN 0-8493-2646-X. pp. 399-417.
- Spotti, E. & Berni, E. (2007) – Starter cultures: Molds. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 171-176.
- Sprenger, R. (1993) – Hygiene for management. Sixth Edition. London: Highfield Publications. ISBN 1-871912-25-3. 320 p.
- Stahnke, L. & Tjener, K. (2007) – Influence of processing parameters on cultures performance. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 187-194.
- Statford, M. (2000) – Traditional preservatives. Organic acids. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1729-1737.
- Steinberg, F. & Rucker, R. (2006) – The water-soluble vitamins. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 10.1-10.18.
- Stiebing, A. (1992a) – Tratamiento por calor – conservabilidad. In: Wirth, F. – Tecnología de los embutidos escaldados. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0723-4. pp. 171-190.
- Stiebing, A. (1992b) – Productos de conservación prolongada. In: Wirth, F. – Tecnología de los embutidos escaldados. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0723-4. pp. 213-237.
- Stoforos, N. & Taoukis, P. (2006) – Heat processing: temperature – time combinations. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 109.1-109.16.
- Stöllman, U.; Johansson, F. & Leufvén, A. (1996) – Packaging and food quality. In: Man, C. & Jones, A.. – Shelf life evaluation of foods. London: Blackie Academic and Professional. ISBN 0-7514-0033-5. pp. 52-71.
- Sucan, M. & Weerasinghe, K. (2005) – Process and reaction flavours: an overview. In: Sucan, M. & Weerasinghe, K. – Process and reaction flavors – Recent developments. Washington, DC: American Chemistry Society. ISBN 0-8412-3905-3. pp. 1-23.
- Sundheim, G.; Sletten, A. & Dainty, R. (1998) – Identification of pseudomonads from fresh chill-stored chicken carcasses. International Journal of Food Microbiology. Volume 39, Issue 3; February. pp. 185-194.

- Suzuki, A.; Kim, K.; Tanji, H. & Nishiumi, T. (2006) – Application of high hydrostatic pressure to meat and meat processing. In: Nollet, L. & Toldrá, F. – Advanced technologies for meat procesing. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-587-1. pp. 193-217.
- Swales, S. & Wedzicha, B. (1992) – Kinetics of the sulphite-inhibited browning of fructose. Food Additives and Contaminants. Volume 9, Issue 5, September-October. pp. 479-483.
- Sylvander, B. (1994) – La qualité: du consommateur final au producteur. In : Cerf, M., Aubry, C., de Sainte Marie, C., Hubert, E., Valceschini E., Vissac, B. - Qualité et systèmes agraires: techniques, lieux, acteurs. Etudes & Recherches, N.º28. Versailles: INRA. pp. 27-49.
- Symons, H. (1996) – Frozen foods. In: Man. C. & Jones, A.. – Shelf life evaluation of foods. London: Blackie Academic and Professional. ISBN 0-7514-0033-5. pp. 296-316.
- Tändler, K. (1992) – Productos frescos y preenvasado. In: Wirth, F. – Tecnología de los embutidos escaldados. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0723-4. pp. 191-211.
- Tändler, K. (1992a) – Elección de la materia prima y composicion de los embutidos escaldados. In: Wirth, F. – Tecnología de los embutidos escaldados. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0723-4. pp. 41-60.
- Tannenbaum, S.; Young, V. & Archer, M. (1993) – Vitaminas y minerales. In : Fennema, O. – Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0733-1. pp. 538-613.
- Tarté, R. & Amundson, C. (2006) – Protein interactions in muscle foods. In: Gaonkar, A. & McPherson, A.. – Ingredient interactions - Effects on food quality. Second Edition. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 0-8247-5748-3. pp. 195-282.
- Tatini, S. & Bennett, R. (2000) – *Staphylococcus*. Detection by cultural and modern techniques. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 2071-2076.
- Taub, I. A. & Singh, R. PP. (1998) - Food storage stability. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. ISBN 0-8493-2646-X.
- Tauxe, R. (1997) – Emerging foodborne diseases: an envolving public health challenge. Emerging Infectious Diseases. Special Issue. Volume 3, Issue 4, October-December. pp. 425-434.
- Taylor, S. (1996) – Improving tenderness by electrical stimulation or hip suspension. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 89-105.

- Taylor, S. (1996^a) – Modified atmosphere packaging of meat. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. (1996) - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 301-311.
- Taylor, S.; Higley, N. & Bush, R. (1986). Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Advances in Food Research*. Vol. 30. pp. 1-76.
- Tehrany, E.; Fournier, F. & Desoby, S. (2006) – Simple method to calculate partition coefficient of migrant in food stimulant/polymer system. *Journal of Food Engineering*. Volume 77, Issue 1, November. pp. 135-139.
- Teixeira, M. (1998) – Estratégias de marketing na valorização dos produtos tradicionais. In: 1^{as} Jornadas de Queijos e Enchidos. Porto, Portugal, 3 de Abril. pp. 23-31.
- Thakur, B., Singh, R. & Aray, S. (1994) – Chemistry of sorbates: a basic perspective. *Food Reviews International*. Volume 10, Issue 1, August. pp. 71-91.
- Theron, M. & Lues, J. (2007) – Organic acids and meat preservation: a review. *Food reviews international*. Volume 23, Issue 2, April. pp. 141-158.
- Thevenot, R. (1979) – A history of refrigeration throughout the world. Paris: International Institute of Refrigeration. 476 pp.
- Thomas, L. (2000) – Permitted preservatives. Sorbic acid. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1769-1776.
- Thong, K.; Goh, Y.; Radu, S.; Noorzaleha, S.; Yasin, R.; Koh, Y.; Lim, V.; Rusul, G. & Puthuchery, D. (2002) – Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Salmonella enterica* serotype Weltevreden isolated in Malaysia. *Journal of Clinical Microbiology*. Volume 40, Issue 7, July. pp. 2498-2503.
- Tibério, M. (1998) – Produtos tradicionais: importância socio-económica na defesa do mundo rural. In: 1^{as} Jornadas de Queijos e Enchidos. Porto, Portugal, 3 de Abril pp. 7-17.
- Tilloca, G.; Cengarle, L.; Carta, A. & Porcu, A. (2006) – Chemical and nutritional characterization of some Italian niche meat products, raw and cooked. *Italian Journal of Food Science*. Volume 18, Issue 1. pp. 107-114.
- Toldrá, F. & Reig, M. (2007) – Chemical origin toxic compounds. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 469-475.
- Toldrá, F. (2006) – Meat: Chemistry and biochemistry. In: Hui, Y. – *Handbook of food science technology and engineering*. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-551-0. pp. 28.1-28.18.

- Toldrá, F. (2007) – Biochemistry of Meat and Fat. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek; J.; Silveira, E.; Stahnke; L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 51-58.
- Toldrá, F.; Aristoy, M.; Flores, M. & Sentandreu, M. (2007) – Quality control. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek; J.; Silveira, E.; Stahnke; L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 503-512.
- Tompkin, R. (1993) – Nitrite. In: Davidson, P. & Branen, A. - Antimicrobials in foods. 2nd Ed. Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc.. ISBN 0-8247-8906-7. pp. 191-262.
- Tompkin, R.; Christiansen, L. & Shaparis, A. (1980). Antibotulinal efficacy of sulphur dioxide in meat. Applied and Environmental Microbiology. Volume 39, Issue 6, June. pp. 1096-1099.
- Torres, E.; Campos, N.; Duarte, M.; Garbelotti, M.; Philippi, S. & Rodriguez, R. (2000) – Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Volume 20, Issue 2. pp. 145-150.
- Tortorello, M. (2000) – *Escherichia coli* O157:H7. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 646-652.
- Troller, J. (1987) – Adaptations and growth of microorganisms in environments with reduced water activity. In: Rockland, L. & Beuchat, L. – Water activity: theory and applications to food. Institute of food technologists, Chicago: Marcel Dekker. ISBN 0-8247-7759-X. pp. 101-118.
- Turner, T. (1995) – Latas y tampus. In: Footitt, R. & Lewis, A. - Enlatado de pescado e carne. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995. ISBN 84-200-0872-9. 97-146 p.
- Upmann, M. & Bonaparte, C. (2000) – Rapid methods for food hygiene inspection. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Volume 3. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 1887-1895.
- Usseglio-Tomasset, L. (1992) – Properties and use of sulphur dioxide. Food Additives and Contaminants. Volume 9, Issue 5, September-October. pp. 399-404.
- Uyttendaele, M. & Debevere, J. (2006a) – Microbial analysis of foods. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 54.1-54.20.
- Uyttendaele, M. & Debevere, J. (2006b) – Rapid Methods in food diagnostics. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 55.1-55.21.

- Van Laack, R.; Johnson, J. & Smulders, F. (1996) – Health aspects of packaging meat and meat products: The prevalence and survival of human pathogens. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F.- Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST, 1996. ISBN 90-75319-14-2. pp. 369-383.
- Varnam, A. & Sutherland, J. (1995) – Meat and meat products. Technology, chemistry and microbiology. Food Products Series. Volume 3. London: Chapman & Hall. ISBN 0-412-49560-0. 430 p.
- Vaudagna, S.; Pazos, A.; Guidi, S.; Sanchez, G.; Carp, D. & Gonzales, C. (2008) – Effect of salt addition on sous vide cooked beef muscles from Argentina. Meat Science. Volume 79, Issue 3, July. pp. 470-482.
- Vicente, A. & Cenzano, J. (2001) – Nuevo manual de industrias alimentarias. 3ª Edición. Ampliada e corregida. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa Libros S.A.. ISBN 84-7114-980-X. 608 p.
- Vieira-Pinto, M. (2008) – *Salmonella* in slaughter pigs – Food safety perspectives. In: Handouts of *Salmonella* - Surveillance & Control, Concepts and Examples. Faculdade de Medicina Veterinária / Universidade Técnica de Lisboa - Faculty of Life Sciences / University of Copenhagen. Lisbon, Portugal, 29 April. 1 p.
- Vignolo, G. & Fadda, S. (2007) – Starter cultures: Bioprotective cultures. In: Toldrá, F.; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 147-157.
- Visier, A. (1980) – Industria de la carne. 1ª ed. Barcelona: Editorial Aedos. ISBN 84-7003-233-X. 304 p.
- Walker, S. (1996) – The principles and practice of shelf life prediction for microorganisms. In: Man, C. & Jones, A.. – Shelf life evaluation of foods. London: Blackie Academic and Professional. ISBN 0-7514-0033-5. pp. 40-51.
- Wang, B. (2006) – Chemical composition of red meat. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Volume 1. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 29.1-29.7.
- Wang, B.; Pace, R.; Dessai, A.; Bovell-Benjamin, A. & Phillips, B. (2002) – Modified extraction method for determining 2-Thiobarbituric acid values in meat with increases specificity and simplicity. Journal of Food Science. Volume 67, Issue 8. pp. 2883-2836.
- Wang, C., Zhu, L. & Brewer, M. (1997) – Comparison of 2-thiobarbituric acid reactive substances determination methods in various types of frozen, fresh meat. Journal of Food Lipids. Volume 4, Issue 2, pp. 87-97.
- Warner, C.; Diachenko, G. & Bailey, C. (2000) – Sulfites: An important food safety issue. Food Testing & Analyses, August-September. Disponível on-line no dia 11/2/2008 em <http://www.cfsan.fda.gov/~acrobat/fssulfit.pdf>. 3 pp.

- Warriss, P. (1996) – Introduction: What is meat quality?. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 3-10.
- Webb, M.; Pin, C.; Peck, M. & Stringer, S. (2007). Historical and contemporary NaCl concentrations affect the duration and distribution of Lag times from individual spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum*. Applied and Environmental Microbiology. Volume 73, Issue 7, April. pp. 2118-2127.
- Wedzicha, B. (1984) – Chemistry of sulphur dioxide in foods. London: Elsevier Applied Science. ISBN 0-85334-267-9. 381 p.
- Wedzicha, B. (1992) – Chemistry of sulphiting agents in food. Food Additives and Contaminants. Volume 9, Issue 5, September-October. pp. 449-459.
- Wells, J. & Singh, R (1998) – Quality management during storage and distribution. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. - Food storage stability. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-2646-X. pp. 369-386.
- Wilson, C. (1991) - “Waste not, wont not”, food preservation from early times to the present. Food and society series. Edinburgh: Edinburgh University Press. ISBN 0-7486-0119-8. 160 pp.
- Wirtanen, G. & Salo, S. (2005) – Biofilm risks. In: Lelieveld, H.; Mostert, M. & Holah, J. – Handbook of hygiene control in the food industry. First Edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2005. ISBN 0-8493-3439-X. pp. 46-68.
- Wirth, F. (1992) – Fijación de agua, fijación de grasa, formación de la estructura. In: Wirth, F. – Tecnología de los embutidos escaldados. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0723-4. pp. 61-81.
- Wright, B. & Taub, I. (1998) – Stored product quality: open dating and temperature monitoring. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. - Food storage stability. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-2646-X. pp. 353-367.
- Ye, L. & Eitenmiller, R. (2006) – Fat-soluble vitamins. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. pp. 11.1-11.30.
- Yetim, H.; Kayacier, A.; Grungor, Z. & Ockerman, H. (2004) – The effects of nitrite and traditional cooking process on the survival of *Clostridium sporogenes* and autoxidation in kavurma, a traditional Turkish fried meat product. In: Proceedings of the 50th International Congress on Meat Science and Technology. Helsinki, Finland, 8-13 August. 4 p.
- Yokoyama, E., Maruyama, S. & Katsube, Y. (1998) – Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. Volume 19, Issue 10, March. pp. 133-137.

- Young, M. (1991) – Food safety. Your questions answered. London: The Food Safety Advisory Centre. ISBN 0-9517601-0-6. 99 p.
- Zbigniew, D. (1999) - Preservation of raw meat: Present status and foreseen technologies. In: Proceedings of the 45th International Congress on Meat Science and Technology. Yokohama, Japan, August, Vol. I. pp. 96-104.
- Zeuthen, P (2007) – A historical perspective of meat fermentation. In: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 3-8.
- Zeuthen, P. & Mead, G. (1996) – Microbial spoilage of packaged meat and poultry. In: Taylor, S.; Raimundo, A.; Severini, M. & Smulders, F. - Meat quality and meat packaging. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-14-2. pp. 273-283.
- Zink, D. (1997) – The impact of consumer demands and trends on food processing. Emerging Infectious Diseases. Volume 3, Issue 4, October-December. pp. 467-469.