



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**EFEITO DE REVESTIMENTOS ATIVOS NO PERÍODO DE VIDA ÚTIL DO
CHOURIÇO TRADICIONAL PORTUGUÊS**

MARTA SOFIA DOS SANTOS NASCIMENTO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo
Doutor Luís Avelino da Silva Coutinho Patarata
Doutor António José Infante Alfaia
Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João Dos Ramos
Fraqueza

CO-ORIENTADOR

Doutor António José Infante Alfaia

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**EFEITO DE REVESTIMENTOS ATIVOS NO PERÍODO DE VIDA ÚTIL DO
CHOURIÇO TRADICIONAL PORTUGUÊS**

MARTA SOFIA DOS SANTOS NASCIMENTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo
Doutor Luís Avelino da Silva Coutinho Patarata
Doutor António José Infante Alfaia
Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João Dos Ramos
Fraqueza

CO-ORIENTADOR

Doutor António José Infante Alfaia

2012

LISBOA

“O único homem que está isento de erros,
É aquele que não arrisca acertar” – Albert Einstein

Aos meus pais e
À minha irmã

Este trabalho foi subsidiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através do projeto “Portuguese traditional meat products: strategies to improve safety and quality” (PTDC/AGR-ALI/119075/2010).

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores deste trabalho, Professora Doutora Maria João Fraqueza e Professor Doutor António Alfaia, sem a ajuda dos quais este trabalho não teria sido realizado, assim como pela transmissão de conhecimentos, disponibilidade sempre apresentada e simpatia.

Ao Professor Doutor Fernando Bernardo pela constante disponibilidade e transmissão de conhecimentos ao longo do desenvolvimento do presente trabalho de investigação.

Às responsáveis técnicas do laboratório de Tecnologia e Segurança dos Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, Maria Helena Fernandes e Maria José Fernandes. Pela incansável disponibilidade, transmissão de conhecimentos, simpatia e amizade.

À Jú, técnica do laboratório de Infecto-Contagiosas, da Faculdade de Medicina Veterinária, pela disponibilidade demonstrada e simpatia.

A todas as minhas colegas de laboratório, Ana Martins, Irani Gouveia, Seliza Veiga, Susana Nisa, Cynthia Barroco, Mafalda Alho, Verónica Santos e Sara Craveiro, pelo apoio sempre demonstrado, boa disposição e companheirismo.

A todos os meus amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e que acreditaram que conseguiria levá-lo a bom termo. Em especial: à Sara Antunes, pela amizade e apoio demonstrado durante a conceção deste trabalho; à Carla Firmo, pelo exemplo de atitude e força transmitidos, amizade e incansável disponibilidade e apoio dados, não só ao longo do desenvolvimento deste trabalho como em todos os anteriores anos de estudo; e ao Pedro Mergulhão, pela disponibilidade demonstrada e amizade.

Aos meus pais e irmã, pelo apoio incondicional e amizade.

Um muito obrigada a todos vós.

EFEITO DE REVESTIMENTOS ATIVOS NO PERÍODO DE VIDA ÚTIL DE CHOURIÇO TRADICIONAL PORTUGUÊS

RESUMO

O chouriço tradicional Português é bastante apreciado pelos consumidores sendo comercializado sob embalagens em atmosfera modificada ou a vácuo. Após aquisição deste produto, os consumidores abrem as embalagens e conservam-no em refrigeração. Na superfície do chouriço desenvolvem-se frequentemente bolores dando-lhe características organoléticas repugnantes que levam à sua rejeição.

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar o efeito de revestimentos ativos incorporados com péptidos antimicrobianos nisina (NS,1%) e/ou natamicina (NT,0,05% e 0,025%) para inibir o desenvolvimento dos bolores na superfície dos chouriços.

Revestimentos de quitosano (Q,0,5%) e lactato de sódio (LS,2,4%) com antimicrobianos imobilizados foram testados em tripa seca natural, contaminada com *Penicillium funiculosum*: Q(0,5%)+LS(2,4%); Q(0,5%)+LS(2,4%)+NS(1%); Q(0,5%)+LS(2,4%)+NT(0,05% e 0,025%); Q(0,5%)+LS(2,4%)+NS(1%)+NT(0,05%).

O revestimento Q(0,5%)+LS(2,4%)+NT(0,025%) revelou ser o mais promissor, inibindo o desenvolvimento do bolor até 60 dias. Este revestimento foi aplicado em chouriço tradicional, revelando-se eficaz no controlo do desenvolvimento de bolores na superfície do produto, até pelo menos 30dias de armazenamento em condições semelhantes às da casa do consumidor, não afetando contudo as bactérias do ácido láctico (LAB) e *Staphylococcus coagulase negativos*, microbiota tecnológica do produto, assim como a atividade da água (a_w) e pH do enchido que contribuem para a sua estabilidade.

Palavras-chave: chouriço, revestimento ativo comestível, quitosano, natamicina, bolor, tripa seca natural

EFFECT OF ACTIVE COATINGS ON THE SHELF LIFE OF TRADITIONAL PORTUGUESE SAUSAGE

ABSTRACT

The traditional Portuguese sausage "chouriço" is very appreciated by consumers and is marketed under modified atmosphere packaging (MAP) or vacuum. After purchasing this product, consumers open the package and put it under refrigeration. On the surface of the sausage develops moulds giving them an unappealing aspect and rejection to consume.

The aim of this work was to study the effect of active coatings incorporating antimicrobial peptides Nisin (NS, 1%) and/or Natamycin (NT, 0.05% and 0.025%) to inhibit the growth of moulds on the surface of fermented smoked sausages.

Chitosan coatings (Ch,0,5%) and Sodium Lactate (SL,2.4%) with immobilized antimicrobial were tested on natural dried casings, contaminated with *Penicillium funiculosum*: Ch(0.5%)+SL(2.4%); Ch(0.5%)+LS(2.4%)+NS(1%); Ch(0.5%)+LS(2.4%)+NT(0.05% and 0.025%); Ch(0.5%)+SL(2.4%)+NS(1%)+NT (0.05%).

The coating Ch(0.5%)+LS(2.4%)+NT(0.025%) was the most promising, inhibiting the development of mould up to 60 days. This coating was applied on traditional sausage chouriço, being effective to control the growth of moulds on product surface, up to at least 30 storage days in similar conditions to those held at consumer's home, without affecting lactic acid bacteria (LAB) and coagulase negative *Staphylococcus*, the technological microbiota of the product, as well the sausage water activity (aw) and pH which contributes to its stability.

Keywords: fermented sausage, active coating, chitosan, natamycin, mould, natural dried casing

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de Tabelas	viii
Índice de Figuras	ix
Índice de Gráficos	x
Lista de abreviaturas	xii
Lista de siglas e símbolos	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Produtos de Salsicharia Tradicional Portuguesa – Chouriço	3
2.1.1. Microbiota relevante no processo de fabrico	6
2.1.2. Chouriço de Carne	8
2.1.2.1. Ingredientes	9
2.1.2.1.1. Ingredientes Essenciais	10
2.1.2.1.2. Ingredientes Facultativos	11
2.1.2.2. Aditivos Alimentares	13
2.1.2.3. Invólucros utilizados	15
2.1.3. Caracterização da estabilidade do chouriço	16
2.2. Importância e consumo do chouriço tradicional Português	18
2.2.1. Caracterização nutricional do chouriço de carne	19
2.3. Processo tecnológico da produção de chouriço tradicional	20
2.4. Contributo da tecnologia de barreira para a conservação dos enchidos	22
2.4.1. Fermentação	23
2.4.1.1. Culturas de arranque – <i>Starters</i>	27
2.4.2. Secagem	30
2.4.3. Fumagem	31
2.5. Inovações tecnológicas aplicadas aos enchidos portugueses	32
2.5.1. Embalagens ativas	32
2.5.1.1. Embalagens antimicrobianas	34
2.5.1.2. Embalagens antioxidantes	35
2.5.1.3. Embalagens aromáticas	36
2.5.2. Revestimentos ativos	36
2.5.2.1. Péptidos antimicrobianos	39
2.5.2.1.1. Nisina	40

2.5.2.1.2. Natamicina	43
2.5.2.2. Revestimentos para imobilização de péptidos	46
2.5.2.2.1. Quitosano	46
2.5.2.2.2. Alginato	50
2.5.2.2.3. K-carragenina	51
3. APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS ATIVOS NO PERÍODO DE VIDA ÚTIL DO CHOURIÇO TRADICIONAL PORTUGUÊS	52
3.1. Justificação e objetivos do trabalho	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1. Fase I: Desenvolvimento, preparação e efeito antimicrobiano de revestimentos aplicados em rodelas de chouriço	53
4.1.1. Origem e preparação das amostras	53
4.1.2. Preparação e aplicação dos revestimentos ativos	53
4.1.2.1. Soluções de trabalho	55
4.1.2.1.1. Solução de Ácido Acético 1% (v/v)	55
4.1.2.1.2. Solução de Glicerol 87% (v/v)	56
4.1.2.1.3. Solução de Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) a 4% (p/v)	56
4.1.2.1.4. Solução de Cloreto de Potássio (KCl) a 3,5% (p/v)	56
4.1.3. Taxa de transferência de massa permitida pelo revestimento	56
4.1.4. Análise microbiológica – Contagem de Fungos	56
4.1.4.1. Preparação da amostra	56
4.1.4.2. Contagem de fungos	56
4.2. Fase II: Isolamento de fungos e determinação da concentração mínima inibitória da natamicina (MIC)	57
4.2.1. Isolamento de fungos e preparação das respetivas suspensões de esporos	57
4.2.2. Concentração Mínima Inibitória da natamicina (MIC)	57
4.2.2.1. Preparação dos inóculos	58
4.2.2.2. Preparação das concentrações dos antimicrobianos	58
4.2.2.3. Inoculação em meio RPMI	58
4.2.2.4. Incubação e leitura	58
4.3. Fase III: Aplicação dos revestimentos em tripa seca natural	58
4.3.1. Preparação dos revestimentos	59
4.3.2. Origem da tripa seca natural e preparação da mesma	59
4.3.3. Condições de ensaio: Aplicação dos revestimentos e inóculo sobre a tripa e condições de armazenamento	59
4.3.4. Análise microbiológica	60
4.3.4.1. Preparação da amostra para análise microbiológica	60

4.3.4.2. Contagem de fungos	60
4.3.4.3. Contagem de aeróbios totais a 30°C	61
4.4. Fase IV: Aplicação do revestimento selecionado em chouriço tradicional Português	61
4.4.1. Colheita das amostras	61
4.4.2. Modo de aplicação do revestimento selecionado e preparação das amostras	61
4.4.3. Análises microbiológicas	62
4.4.3.1. Preparação da amostra	62
4.4.3.2. Contagem de Aeróbios Totais a 30°C	62
4.4.3.3. Contagem de Fungos	62
4.4.3.4. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos	62
4.4.3.5. Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.	62
4.4.3.6. Contagem de Bactérias Ácido Lácticas (LAB)	63
4.4.4. Análises físico-químicas	63
4.4.4.1. Determinação do pH	63
4.4.4.2. Determinação da atividade da água (a_w)	63
4.4.5. Determinação da quantidade de revestimento aplicado por dm ² de superfície de chouriço	63
4.4.5.1. Densidade do revestimento	63
4.5. Análise estatística dos resultados	64
5. RESULTADOS	65
5.1. Fase I: Preparação dos revestimentos e aplicação dos mesmos em rodelas de chouriço	65
5.1.1. Comportamento tecnológico dos revestimentos	65
5.1.2. Taxa de transferência de massa permitida pelo revestimento	66
5.1.3. Efeito dos diferentes revestimentos ativos em rodelas de chouriço	66
5.2. Fase II: Isolamento de fungos e determinação da concentração mínima inibitória da natamicina (MIC)	66
5.2.1. Identificação de fungos	66
5.2.2. Concentração Mínima Inibitória da Natamicina (MIC)	67
5.3. Fase III: Aplicação dos revestimentos em tripa seca natural	68
5.3.1. Taxa de transferência de massa permitida pelo revestimento	68
5.3.2. Efeito da aplicação dos revestimentos na tripa seca natural	68
5.4. Fase IV: Efeito da aplicação do revestimento ativo no chouriço tradicional Português	72
5.4.1. Efeito dos revestimentos nas características microbiológicas do chouriço	72
5.4.2. Resultados físico-químicos	76

5.4.3. Determinação da quantidade de revestimento aplicado por dm^2 de superfície de chouriço.....	77
5.4.3.1. Densidade do revestimento	77
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	92
8. BIBLIOGRAFIA	94
9. ANEXO I – Tabela com médias, desvio-padrão e significância relativos à análise de bolores e aeróbios totais a 30°C da tripa seca natural	105
10. ANEXO II – Tabela com médias, desvio-padrão e significância relativos à análise microscópica e físico-químicas do chouriço tradicional Português	107

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características organolépticas e físico-químicas, assim como o formato e dimensões características dos três tipos de chouriço de carne	8
Tabela 2 – Lista de ingredientes para o fabrico de chouriço de carne	9
Tabela 3 – Classificação dos alimentos em função do valor de a_w	17
Tabela 4 – Condições de armazenamento de produtos cárneos em função da a_w e pH	17
Tabela 5 – Composição nutricional do chouriço de carne de porco, magro, cru	19
Tabela 6 – Diferenças entre os dois tipos de fumagem tradicional	32
Tabela 7 – Composição dos revestimentos estudados	54
Tabela 8 – Representação dos diferentes revestimentos em estudo nesta fase de teste, assim como a composição de cada um deles e número de amostras	60
Tabela 9 – Pesagens efetuadas ao chouriço antes e após aplicação do revestimento e, densidade do revestimento constituído por quitosano, lactato de sódio e natamicina (250 $\mu\text{g/mL}$)	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Quantidades de “enchidos e produtos semelhantes, de carne, miudezas ou sangue, incluindo preparações alimentícias à base de tais produtos (exceto de fígado e refeições e pratos preparados)” produzidos e vendidos, em Portugal, entre 2008 e 2010	19
Figura 2 – Fórmula estrutural da nisina A, com representação da substituição da His27 por Ans27 para a nisina Z	40
Figura 3 – Estrutura química da natamicina	43
Figura 4 - Identificação de bolores desenvolvidos na superfície de produtos cárneos transformados. A – <i>P. janthinellum</i> ; B – <i>P. mirabile</i> ; C – <i>P. claviforme</i> ; D – <i>P. humuli</i> ; E – <i>P. pulvillorum</i> ; F – <i>P. funiculosum</i>	67

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) da natamicina para diferentes espécies de <i>Penicillium</i>	68
Gráfico 2 - Contagens de bolores ao longo do tempo de armazenamento, para os diferentes revestimentos na condição: tripa revestida sem aplicação de inóculo	69
Gráfico 3 - Contagens de bolores ao longo do tempo de armazenamento, para os diferentes revestimentos na condição: tripa contaminada antes da aplicação do revestimento	70
Gráfico 4 - Contagens de bolores ao longo do tempo de armazenamento, para os diferentes revestimentos na condição: tripa contaminada após a aplicação do revestimento	72
Gráfico 5 - Contagens de aeróbios totais a 30°C para a tripa revestida por Q+LS+NS nas diferentes condições de aplicação ao longo do tempo de armazenamento	72
Gráfico 6 – Contagens de fungos desenvolvidos no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento	73
Gráfico 7 – Contagens de aeróbios totais a 30°C desenvolvidos no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento	74
Gráfico 8 – Contagens de LAB desenvolvidas no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento	75
Gráfico 9 – Contagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos desenvolvidos no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento	75
Gráfico 10 – Nível de acidez (pH) no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento	76
Gráfico 11 – Nível de atividade da água (a_w) no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento	77

LISTA DE ABREVIATURAS

- “*hurdle technology*” – tecnologia de barreira
- APT – Água Peptonada Tamponada
- ASAE – Autoridade Segurança Alimentar e Económica
- ATP – adenosina trifosfato (energia)
- a_w – atividade da água
- BHA – butil-hidroxianisolo
- BHI – meio de cultura Brain Heart Infusion Broth
- BHT – butil-hidroxitolueno
- Cantes – tripa contaminada antes da aplicação do revestimento
- Capós – tripa contaminada após a aplicação do revestimento
- DDA – Dose diária admissível
- DMSO – dimetilsulfóxido
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilendiamino tetra-acético)
- EFSA – *European Food Safety Authority*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- GRAS - *Generally Recognized as Safe* (geralmente reconhecido como seguro)
- HRE – humidade relativa de equilíbrio
- “*hurdle effects*” – efeito de barreira
- INE – Instituto Nacional de Estatística
- ISO – *International Organization for Standardisation*
- JECFA – *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*
- LAB – bactérias do ácido láctico
- LS – lactato de sódio
- MAP – embalagem em atmosfera modificada
- MIC – Concentração Mínima Inibitória
- MRS – man rogosa sharpe agar
- MSA – manitol salt agar
- NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
- NP – Norma Portuguesa
- NS – nisina
- NT – natamicina a uma concentração de 500 µg/mL
- NT₂₅₀ – natamicina a uma concentração de 250 µg/mL
- NT₅₀₀ – natamicina a uma concentração de 500 µg/mL
- p. ex. – por exemplo
- Q – Quitosano
- RB – meio de cultura Rose Bengal Agar

REV1 – Revestimento constituído por matriz de alginato ou k-carragenina ou quitosano.

REV2 – Revestimento constituído por matriz de alginato ou k-carragenina ou quitosano com incorporação de lactato de sódio (2,4%).

REV3 – Revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de nisina.

REV4 – Revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de natamicina.

REV5 – Revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de lactato de sódio (2,4%) e nisina.

REV6 – Revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de lactato de sódio (2,4%) e natamicina.

REV6b – Revestimento constituído por matriz de quitosano com incorporação de lactato de sódio (2,4%) e natamicina numa concentração correspondente a metade daquela que é adicionada na composição do rev6.

REV7 – Revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de nisina e natamicina

REV8 – Revestimento constituído por matriz de alginato ou k-carragenina ou quitosano com incorporação de lactato de sódio (2,4%), nisina e natamicina.

SCF – *Scientific Committee on Food*

sign. - Significância

Starters – Culturas de arranque

TBA – Índice ácido tiobarbitúrico

TGA – triptone glucose agar

Trev – tripa com aplicação do revestimento

Tripa controlo A – Controlo: tripa seca não contaminada

Tripa controlo B – Controlo: tripa seca contaminada

Tsal – Triptona Sal

UV – Radiação Ultravioleta

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

% - percentagem

(p/v) – peso/volume

(v/v) – volume/volume

< - inferior a

> - superior

≤ – inferior ou igual

°C – grau Celsius

µg – micrograma

µg dm⁻² – micrograma por decímetro quadrado

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

Asn27 – Asparagina na posição 27

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

D.O. – densidade ótica

g – grama

g/Kg – grama por quilograma

g/mL – grama por mililitro

g/mol – gramas por mol

h – horas

His 27 – Histidina na posição 27

Kcal - quilocaloria

KCl – Cloreto de Potássio

kDa - kilodalton

Kg – quilograma

KJ – quilojoule

L – litro

m/s – metro por segundo

m_{água} – massa do picnómetro com água no seu interior

mg/Kg – miligrama por quilograma

mg/Kg pc – miligrama por quilograma de peso corporal

mg/Kg pc/dia – miligramas por quilograma de peso corporal por dia

mg/L – miligramas por litro

MIC – Concentração Mínima Inibitória

mL – mililitro

mm – milímetros

$m_{\text{picnómetro}}$ – massa do picnómetro vazio

$m_{\text{revestimento}}$ – massa do picnómetro com revestimento no seu interior

nm – manómetros

qb – quanto baste

REV – revestimento

rpm – rotações por minuto

T – temperatura

t – tempo

ton – toneladas

UFC – Unidades formadoras de colónias

UFC/cm² – unidades formadoras de colónias por centímetro quadrado

UFC/g – unidades formadoras de colónias por grama

UFC/mL – unidades formadoras de colónias por mililitro

λ – comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos com recurso a microrganismos é uma técnica bastante antiga (Ordóñez & Hoz, 2007). Na Europa, a produção de chouriços fermentados tem uma longa tradição, tendo começado nos países do Mediterrâneo durante a época romana. Nestes países existem variados produtos cárneos fermentados que ainda hoje são produzidos de forma tradicional, caracterizando-se pela grande diversidade nos métodos de fabrico que lhes confere diversidade no tamanho e nas características organoléticas (Garriga & Aymerich, 2007; Lebert, Leroy & Talon, 2007). Todos eles são processados com recurso a microrganismos, podendo estes estar naturalmente presentes nas matérias-primas ou serem intencionalmente adicionados - culturas de arranque (Ordóñez & Hoz, 2007).

Com a globalização e desenvolvimento de tecnologias para produtos cárneos, na segunda metade do século XX, houve um aumento da produção destes produtos, impulsionando a indústria das carnes a produzir enchidos em larga escala. Porém, a produção tradicional mantém-se em determinadas regiões (Ordóñez & Hoz, 2007).

Os produtos de Salsicharia Portuguesa, entre os quais se encontra o Chouriço, são produtos alimentares denominados por enchidos fumados. Estes podem ser armazenados à temperatura ambiente sem risco de deterioração, não sendo necessário recorrer a aditivos para a sua conservação. Os produtos produzidos de forma tradicional normalmente não têm qualquer aditivo na sua composição (Roncalés, 2007).

Este produto é considerado um alimento pronto a consumir uma vez que pode ser consumido sem qualquer processamento térmico. Tendo em consideração os valores de pH e atividade da água (a_w), os enchidos fumados classificam-se como produtos estáveis. No entanto, este produto requer uma especial atenção relativamente ao crescimento de microflora deteriorativa no produto. Durante o seu período de armazenamento, destaca-se especialmente a rápida colonização à superfície por um grande número de fungos filamentosos, não só bolores mas também leveduras, e o potencial desenvolvimento de alguns agentes patogénicos. O principal fator de deterioração da qualidade destes produtos é a presença de oxigénio, o qual desencadeia rancidez oxidativa e alterações no sabor, cor, e desenvolvimento de bactérias aeróbias e fungos (Ahn & Min, 2007; Spotti & Berni, 2007).

O desenvolvimento de fungos filamentosos na superfície do chouriço é indesejável e pode levar a um aumento do aparecimento de metabolitos secundários tóxicos, denominados de micotoxinas (Selgas, Trigueros, Casas, Ordóñez & García, 1995 ; Bruna, Hierro, Hoz, Mottram, Donald. Fernández & Ordóñez, 2001; Iacumin *et al.*, 2009).

O não controlo do crescimento fúngico leva a que estes se desenvolvam e produzam uma pigmentação acinzentada ou amarelada no produto alimentar. Além disso as toxinas produzidas podem, apesar de raramente, difundir-se pela carne. O referido desenvolvimento fúngico no produto pode ocorrer durante a fase de distribuição ou somente, já em casa do consumidor, após abertura da embalagem, tornando-o repugnante para o consumidor e

levando a que este o rejeite. Assim, torna-se importante inibir o desenvolvimento da referida microbiota durante o seu tempo de vida útil. Surge então uma necessidade crescente de se estudarem técnicas inovadoras que levem à inibição do desenvolvimento dos referidos fungos e que conseqüentemente promova o aumento do prazo de validade do chouriço (Appendini & Hotchkiss, 2002; Labadie, 2007; Martin-Sanchez *et al.*, 2011).

Após abertura da embalagem de chouriço, já na casa do consumidor, os Portugueses têm o hábito de o guardar, envolvido em película aderente, no frigorífico (Tradisausage, 2006).

No que respeita a melhorar a qualidade e tempo de vida útil dos produtos de salsicharia fermentados, estes têm tido uma especial atenção por parte da ciência e tecnologia, especialmente na Europa central e do Sul, e América do Norte (Toldrá, Nip & Hui, 2007).

Têm sido estudados diferentes tipos de embalagens e revestimentos ativos comestíveis para os mais diversos produtos alimentares. Os revestimentos comestíveis com propriedades antimicrobianas foram desde o início do seu desenvolvimento aplicados na indústria alimentar, e têm inovado o conceito de embalagens ativas, sendo desenvolvidos para reduzir, inibir ou inativar o crescimento microbiano na superfície dos alimentos. Os revestimentos ativos são constituídos por camadas finas de materiais comestíveis aplicados na forma líquida sobre os produtos alimentares, desempenhando um papel importante na sua conservação, quer seja para proteção física ou microbiológica (Cong, Zhang & Dong, 2007; Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz & Ibarz, 2011). Neste sentido, muitos têm sido os trabalhos de desenvolvimento de revestimentos ativos com o intuito de aumentarem o tempo de vida útil de frutas e vegetais, mas poucos são os trabalhos que utilizam polissacarídeos (Cerqueira *et al.*, 2010).

Diferentes revestimentos com base em quitosano e com natamicina imobilizada foram anteriormente estudados para aplicação na superfície de queijos, com o objetivo de inibir o desenvolvimento fúngico. Porém, não é do nosso conhecimento qualquer tipo de estudo realizado que envolva revestimentos ativos comestíveis antimicrobianos a serem testados em produtos cárneos fermentados (Fajardo *et al.*, 2010).

O objetivo principal deste trabalho incide sobre a aplicação de revestimentos ativos num produto de salsicharia Portuguesa, o chouriço, com o intuito de aumentar a sua vida útil. Assim o nosso trabalho dividiu-se em diferentes subtarefas para conseguir atingir o objetivo proposto: (1) Desenvolvimento de revestimentos ativos com imobilização de substâncias ativas (agentes antimicrobianos) numa matriz polissacarídica; (2) Aplicação de revestimentos em tripa seca natural e avaliação da atividade antimicrobiana da natamicina livre e imobilizada; (3) Aplicação do revestimento testado no chouriço tradicional Português; (4) Avaliação do prazo de validade do chouriço: caracterização microbiológica e físico-química.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos de Salsicharia Tradicional Portuguesa – Chouriço

O início do fabrico de chouriços fermentados remete-nos para tempos muito antigos. Para o desenvolvimento da civilização, um dos pré-requisitos mais importantes passou pela descoberta de métodos que permitissem a conservação de alimentos para o armazenamento e transporte, ou seja, técnicas que permitissem o aumento do tempo de vida útil do produto. A primeira descoberta nesse sentido foi a secagem de alimentos, seguindo-se a fumagem (Zeuthen, 2007; Flores & Toldrá, 2011). Deste modo, a produção de produtos cárneos fermentados começou por ser uma forma de conservar a carne (Arnau, Serra, Comaposada, Gou & Garriga, 2007).

A produção dos típicos produtos de carne fermentados conta com séculos de história, tendo sido iniciada pelos Antigos Romanos e Gregos e, na Idade Média, a produção e consumo estendeu-se para a Europa (Flores & Toldrá, 2011). No Império Romano, os chouriços eram produzidos a partir de sangue, gordura e pedaços de carne, os quais eram cozidos de seguida. Já nestes tempos o corte da carne era efetuado em pedaços, afim de obterem uma distribuição mais uniforme do sal e dos restantes ingredientes (Zeuthen, 2007).

Estes produtos chegaram até nós graças à “herança” do processo de fabrico transmitida ao longo de diferentes gerações, constituindo hoje um dos mais importantes grupos de alimentos (Flores & Toldrá, 2011).

Assim a transformação de matérias-primas, através de secagem e fermentação era uma técnica já conhecida na antiguidade, utilizada com o intuito de produzirem diferentes alimentos, mais ou menos estáveis (Zeuthen, 2007).

As condições de fabrico diferiam muito entre as diferentes regiões produtoras, tendo sido adaptadas em função das condições climatéricas dos diferentes locais de produção. Assim, no Norte da Europa adotou-se a fumagem, enquanto os países do Mediterrâneo optaram pela secagem natural devido talvez às condições climáticas destas zonas (Toldrá *et al.*, 2007 ; Flores & Toldrá, 2011).

O continente Europeu é o maior produtor de chouriços fermentados. Nele existe uma grande variedade de produtos de charcutaria, sendo eles produzidos como forma de efetuar um aproveitamento máximo da carne, vísceras, gordura e sangue de porco. De país para país e de região para região, diferem as características dos produtos cárneos fermentados fabricados. Estas diferenças devem-se, entre outros fatores, às técnicas adotadas para a produção (em muito influenciadas pelos hábitos e costumes da região), população microbiana intrínseca (que difere de acordo com os ingredientes utilizados e métodos de produção), matérias-primas utilizadas e proporção das mesmas, e tempo de secagem, levando à obtenção de produtos finais com grande variedade de sabores e texturas entre eles. Deste modo, existe uma grande diversidade organolética entre os enchidos fermentados sendo difícil classificá-los, pois apesar terem denominação igual ou semelhante

são muitas vezes distintos entre si (Selgas *et al.*, 1995; Flores, 1997; Elias, Fraqueza & Barreto, 2006 ; Garriga & Aymerich, 2007; Lebert *et al.*, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Ordóñez & Hoz, 2007; Zeuthen, 2007 ; Flores & Toldrá, 2011).

No entanto, e tendo em consideração a tecnologia de processamento adotada para a produção deste produto, podemos diferenciar dois grandes grupos de enchidos fermentados: os curados a seco, sem adição de água, no qual os agentes de cura¹ são solubilizados apenas com a humidade natural da carne; e curados húmidos, em que a solubilização dos agentes é feita com adição de água de modo a formar-se uma solução salina, a salmoura (Flores, 1997).

Os enchidos fermentados são o resultado de uma série de fatores bioquímicos, microbiológicos, e alterações físicas e sensoriais, que se desenvolvem a condições de temperatura e humidade específicas (Casaburi *et al.*, 2007).

Na Europa, os enchidos fermentados são produzidos em grande abundância, uma tradição que partiu do sul da Europa (Zeuthen, 2007). Estes produtos de salsicharia secos e fermentados representam uma importante parte da produção das fábricas de produtos cárneos existentes na Europa, especialmente dos países pertencentes à zona do mediterrâneo, onde a produção é típica (Bolumar *et al.*, 2006; Sánchez-González, Cháfer, Hernández, Chiralt & González-Martínez, 2011).

Portugal integra-se na área do Mediterrâneo, da qual fazem parte diversas variedades de enchidos secos fermentados, produzidos ao longo de séculos. Estes produtos típicos caracterizam-se por serem produzidos com recurso a carne de suíno e por resultarem de uma combinação entre os processos de secagem e de fermentação, por terem um processo de cura lenta, normalmente sem recorrer à utilização de nitritos e sem a aplicação de fumagem, sendo secos (até atingirem um baixo valor de a_w) devido ao clima peculiar destes países, com um pH ligeiramente superior a 5,0. Estes produtos muitas vezes não têm uma separação evidente entre a fase de fermentação e de secagem (Flores, 1997; Demeyer & Eerola, 2000; Lebert *et al.*, 2007; Ordóñez & Hoz, 2007; Toldrá *et al.*, 2007).

De acordo com Ordóñez e Hoz (2007), os enchidos do Mediterrâneo podem ser classificados como um produto cárneo fermentado com elevada acidez, para a produção dos quais é necessário um processo de fermentação e de secagem (Ordóñez & Hoz, 2007). Os enchidos do Mediterrâneo diferem entre si de acordo com o diâmetro, forma, tamanho, características sensoriais e condimentos adicionados. Estes produtos adquirem diferentes nomes de acordo com a zona de produção, tendo muitas vezes denominações distintas entre regiões bastante próximas (Toldrá *et al.*, 2007).

A cura é um termo que se aplica a produtos cárneos. Porém, o seu significado varia de acordo com o país de produção do enchido. Na zona do mediterrâneo o termo “cura” é direcionado para os produtos que foram submetidos a um longo processo de

¹ Os agentes de cura normalmente utilizados são sal, nitrato e/ou nitrito e açúcar (Flores, 1997).

amadurecimento, no entanto, apesar de Portugal pertencer aos países do Mediterrâneo, aqui a cura encontra-se normalmente sempre associada à fumagem, a qual é praticada pela grande parte das salsicharias, pelo menos nas produtoras de chouriço tradicional Alentejano (Flores, 1997; Elias *et al.*, 2006; Lebert *et al.*, 2007).

A conservação dos enchidos é obtida como resultado da conjugação de uma série de fatores (efeito de barreira – *hurdle effects*), os quais proporcionam estabilidade ao produto. De entre esses fatores encontram-se: adição de nitrito, sal e/ou açúcar; redução do potencial redox, introdução de bactérias ácido lácticas com diminuição do pH (desenvolvem uma série de reações que têm um papel importante no desenvolvimento pretendido das características visuais, organoléticas, nutricionais e de segurança do produto), fumagem e secagem com diminuição do a_w (Toldrá *et al.*, 2007).

O termo “Produtos de Salsicharia Portuguesa” é uma denominação abrangente que é dada a uma extensa variedade de produtos de transformação cárnea, os quais englobam carnes curadas (por exemplo, presunto) e os enchidos, produzidos de um modo tradicional, em território Português. Da vasta lista de enchidos existente em Portugal, podemos dividi-los em dois grandes grupos: enchidos fumados, onde se incluem por exemplo o Chouriço, a Linguiça, o Salpicão, a Farinheira, o Chouriço de Carne, o Painho, entre outros; e os enchidos não fumados, onde estão incluídos produtos como o Salsichão e o Salame (NP 588, 2008).

Existem acentuadas diferenças no que respeita aos ingredientes que integram a formulação de cada enchido. Tal facto, juntamente com o processo de produção característico de cada produto, contribuem para que os produtos finais transmitam uma aparência distinta entre eles, assim como variedade nos sabores. Além dos ingredientes, o tempo, temperatura, humidade e fumagem são algumas variáveis que interferem significativamente no controlo da qualidade do produto final (Ockerman & Basu, 2007).

Devido à diversidade da tecnologia de produção dos enchidos secos fermentados é difícil haver uma gestão de qualidade que seja universal (Demeyer & Eerola, 2000).

Os processos produtivos correspondentes a cada um dos produtos de salsicharia fermentados, de origem portuguesa, apresentam diretrizes qualitativas em Normas Portuguesas, para que deste modo esteja estabelecido um “padrão” de produção e de garantia de qualidade e segurança do produto para com o consumidor. Assim, de acordo com a NP 588 (2008), estabelece-se a classificação do chouriço de carne como um enchido fumado.

Na Europa, os produtos tradicionais são bastante procurados e apreciados pelos consumidores, os quais procuram nestes produtos a garantia de origem, qualidade e autenticidade (Tradisausage, 2006). Em Portugal esta procura mantém-se de igual forma e existem vários produtos com Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação

Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG), cujas definições se encontram legisladas no Regulamento nº 2081/1992 e Regulamento nº 2082/1992.

2.1.1. Microbiota relevante no processo de fabrico

O conhecimento e controlo da microflora natural presente inicialmente no produto são essenciais em termos de qualidade microbiológica, características organolépticas e segurança dos alimentos. As bactérias do ácido láctico (LAB) e os cocos gram-positivos catalase positivos são as bactérias que desempenham o papel mais significativo no processo de fabrico (Lebert *et al.*, 2007).

Aquando da fermentação, as LAB são a principal microflora intrinsecamente presente nos enchidos tradicionais, seguindo-se dos cocos gram-positivo e catalase-positivos. Durante a fermentação há um aumento das LAB, de cerca de 3-5 log UFC/g (unidades formadoras de colónias por grama) para 6-9 log UFC/g e dos cocos coagulase negativos de 3-5 log UFC/g para 5-8 UFC/g (Garriga & Aymerich, 2007; Lebert *et al.*, 2007).

As principais espécies de LAB identificadas em enchidos fermentados são *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum*, de entre os quais o *L. sakei* é o predominante (Lebert *et al.*, 2007). No entanto, outras espécies também têm sido descritas como presentes, como são exemplo disso os *L. alimentarius*, *L. casei*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. paracasei*, *Pediococcus spp.*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc citreum*, e *Leuconostoc mesenteroides* (Patarata, 2002; Leroy, Verluyten & De Vuyst, 2006 ;Garriga & Aymerich, 2007; Labadie, 2007; Lebert *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2006 ; Gonçalves, 2009).

Relativamente às espécies de cocos gram e catalase positivos, as dominantes são *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus*, sendo *S. xylosus* o mais frequente nos produtos tradicionais. Outras espécies também têm sido identificadas: *S. saprophyticus*, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. warneri*, *S. lentus*, *S. vitulus*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. pulverei*, *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. hyicus*, *Kocuria varians*, *Kocuria kristinae*, *Micrococcus luteus*, e *Macrococcos caseolyticus* (Elias, 2004; Garriga & Aymerich, 2007; Labadie, 2007; Lebert *et al.*, 2007 ; Carvalho, 2010).

A população microbiana inicialmente presente na carne é semelhante àquela que compõe a carne fresca, o que inclui bactérias gram-negativas (p.ex. *Pseudomonas spp.* e *Enterobacteriaceae*) e gram-positivas (p.ex. *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Enterococcus spp.*) (Ordóñez & Hoz, 2007).

Provenientes do meio ambiente ou da carne crua, os bolores e leveduras (fungos) estão normalmente presentes em todos os enchidos fermentados, num número de colónias que normalmente varia entre 2,0 a 3,0 log UFC/g nos primeiros dias, aumentando muito rapidamente até valores de 6,0 a 7,0 log UFC/g ou mais, ao fim de 25 dias (Ordóñez & Hoz, 2007). Estes valores de crescimento dependem das condições de processamento do produto, podendo mesmo surgir produtos que não tenham fungos. Os fungos, por serem

aeróbios, desenvolvem-se na superfície do enchido fermentado seco e não no seu interior e, podem contribuir para a qualidade do produto, uma vez que desenvolvem alguns sabores característicos, assim como outros provenientes da oxidação do ácido láctico, da atividade proteolítica, da degradação de aminoácidos e da lipólise. Está também descrito que possuem atividade protetora contra a oxidação lipídica (por protegerem o produto da luz) e estabilizam a cor. A interligação existente entre as referidas atividades metabólicas contribuem positivamente para a segurança do produto, textura, sabor e cor característicos. As espécies mais comuns de leveduras, identificadas em enchidos fermentados são: *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Torulopsis* (como sendo as quatro mais frequentes e que se apresentam comumente na superfície dos enchidos), *Cryptococos*, *Hypopichia*, *Kluyveromyces*, *Leucosporidium*, *Pichia*, *Rhodosporidium*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Candida tropicalis*, *Candida krisii*, *Candida sake* e *Candida fermentati*. Relativamente aos bolores, os vulgarmente encontrados em enchidos são *Penicillium* e *Aspergillus* embora também possam surgir *Mucor*, *Cladosporium*, *Alternaria*, entre outros (Selgas *et al.*, 1995 ; Dura, Flores & Toldra, 2004; Garriga & Aymerich, 2007; Lebert *et al.*, 2007; Ordóñez & Hoz, 2007; Selgas & Garcia, 2007; Spotti & Berni, 2007 ; Iacumin *et al.*, 2009; Martin-Sanchez *et al.*, 2011).

De acordo com Bruna *et al.* (2003) o *Penicillium* é dos géneros que mais frequentemente se desenvolvem em carne e produtos cárneos, por terem a capacidade de crescerem a temperaturas e a_w mais baixos do que os restantes bolores presentes no produto.

Os *Enterococcus* são bactérias gram-positivas, indicadores de contaminação fecal, produtores de aminas biogénicas e responsáveis pela deterioração de produtos cárneos. É comum desenvolverem-se durante o processo fermentativo (4-6 log UFC/g) e que permanecem em teores constantes (ou diminuem) até ao fim do processo de produção.

As *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* são também bactérias responsáveis pela deterioração. Há registos de contagens iniciais de *Pseudomonas* que rondam os 4 log UFC/g, mas com tendência a desaparecerem, ou pelo menos diminuírem, durante a fermentação. As *Enterobacteriaceae* são bactérias produtoras de aminas biogénicas (como a cadaverina, putrescina e histamina). No início da fermentação estas bactérias podem desenvolver-se até atingirem valores de 3-6 log UFC/g, mas no final do processo produtivo o valor já ronda os 2 log UFC/g. *Escherichia coli*, *Enterobacter amnigenus* e *Enterobacter intermedius*, são exemplos de outras bactérias, também elas microflora de deterioração, que por vezes se desenvolvem nos enchidos (Garriga & Aymerich, 2007; Lebert *et al.*, 2007).

Em relação à microflora patogénica, poucos são os patogénicos com capacidade de se multiplicarem neste tipo de produtos, à exceção de *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus*. É comum a presença de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em carne de porco crua, mas nos produtos finais os valores registados têm sido reduzidos (por exemplo em Espanha, houve um registo de um produto com *L. monocytogenes* com contagem inferior a

0,7 log UFC/g). Não há registo de presença de *Salmonella* ou *Clostridium perfringens* nos enchidos fermentados secos (Garriga & Aymerich, 2007; Lebert *et al.*, 2007).

2.1.2. Chouriço de Carne

A Norma Portuguesa 589 de 2008 (NP 589 de 2008: Chouriço de Carne – Definição, classificação, características e acondicionamento) define chouriço de carne como sendo um “enchido fumado e/ou curado de calibre estreito e de formato variável constituído por carne de suíno e gordura rija de suíno, em fragmentos macroscopicamente visíveis, adicionados de condimentos, aditivos e/ou outros ingredientes facultativos”. Exclui-se desta definição, os “enchidos que resultem de processos tecnológicos de conservação baseados na diminuição do valor de pH” (NP589, 2008).

Existem três classificações para o chouriço de carne: chouriço de carne tradicional, chouriço de carne extra e chouriço de carne corrente. Na Tabela 1, apresentam-se as diferentes características dos três tipos de chouriço de carne (NP 589, 2008).

Tabela 1: Características organoléticas e físico-químicas, assim como o formato e dimensões característicos dos três tipos de chouriço de carne (NP 589, 2008).

Classificação do Chouriço	Chouriço de carne tradicional	Chouriço de carne extra	Chouriço de carne corrente
Formato e dimensões	Forma: ferradura individualizada por atadura Calibre: 25 mm a 40 mm Comprimento linear: até 50 cm	Forma: ferradura, curva ou rectilínea, individualizada por atadura, dupla clipsagem ou torção Calibre: 25 mm a 40mm Comprimento linear: até 50 cm	Forma: curva ou rectilínea individualizada por torção ou dupla clipsagem Calibre: 25 mm a 40mm Comprimento linear: até 50 cm
Características organoléticas	Exterior: aspeto avermelhado e brilhante; coloração e cheiro resultantes do processo de fumagem (por queima de madeiras apropriadas no caso do chouriço de carne tradicional); consistência firme; invólucro sem roturas e bem aderente à massa. Interior: massa perfeitamente ligada, de aspeto marmoreado, com distribuição regular dos pedaços de carne e gordura, de cor avermelhada e branca, com cheiro e sabor característicos. No caso do chouriço de carne tradicional, a granulometria não deve ser inferior a 15 mm.		

Tabela 1 (continuação): Características organolépticas e físico-químicas, assim como o formato e dimensões característicos dos três tipos de chouriço de carne (NP 589, 2008).

Classificação do Chouriço	Chouriço de carne tradicional	Chouriço de carne extra	Chouriço de carne corrente
Características físico-químicas	Relação fosfatos/proteína \leq 0,03%. Quanto este valor é superior, deve ser demonstrado que o fosfato já existia em excesso na matéria-prima ou que não foi adicionado no processo de fabrico	Gordura livre: inferior ao dobro do teor de proteína total; Proteína total: min 19%; Humidade do produto desengordurado: <65%; Colagénio: < a 13% do teor de proteína total	Gordura livre: inferior três vezes ao teor em proteína total; Proteína total: min 16%; Humidade do produto desengordurado: <65%; Colagénio: < a 30% do teor de proteína total

2.1.2.1. Ingredientes

Os ingredientes necessários para a produção do chouriço de carne estão referenciados segundo a Norma Portuguesa 589 de 2008. Nesta, para além da listagem dos ingredientes essenciais para a produção do referido produto, também estão presentes outros ingredientes que podem ser utilizados no fabrico do chouriço de forma facultativa. A lista de ingredientes encontra-se apresentada na Tabela 2 (Garriga & Aymerich, 2007 ; NP 589, 2008).

Tabela 2: Lista de ingredientes para o fabrico de chouriço de carne (NP 589, 2008).

Ingredientes para fabrico de chouriço de Carne (NP 589 de 2008)		
Ingredientes Essenciais	Ingredientes Facultativos	
Carne de Suíno	Couratos (apenas permitido para chouriço de carne corrente)	Sal
	Água	Açúcar e/ou dextrose
	Pimentão	Especiarias
Gordura Rija de Suíno	Vinho	Alho
	Aromas (não permitido para o chouriço de carne tradicional)	Fumo líquido (não permitido para o chouriço de carne tradicional)
	Proteínas de origem animal e/ou vegetal (permitido apenas para o chouriço de carne corrente)	Sangue e/ou hemoglobina em quantidade estritamente necessária para reforçar a cor

2.1.2.1.1. Ingredientes Essenciais

Para a produção de chouriço tradicional Português, utilizam-se dois ingredientes principais: carne e gordura de porco. Estes ingredientes têm uma forte influência sobre o produto final, quer a nível sensorial como nutricional e de segurança (Garriga & Aymerich, 2007; Petäjä-Kanninen & Puolanne, 2007; Ruiz, 2007).

Nos estados membros da União Europeia a carne mais consumida é a de porco, muitas vezes na forma de transformado de carne, como é o caso dos enchidos. A carne de porco utilizada para que tenha um baixo teor de gordura é proveniente de animais abatidos com cerca de 90 a 100 Kg de peso vivo, o que equivale a uma idade de aproximadamente 6 meses (Flores, 1997; Ruiz, 2007).

A carne deve ser firme, com boa capacidade de retenção de água e com elevado poder tampão, caracterizada com valores de pH situados entre 5,6 e 6,0 (Elias *et al.*, 2006).

Para o fabrico de chouriço recorre-se a carne da pá, da entremeada e da perna, podendo-se utilizar também carne do cachaço e do lombo, mas é menos comum (Ockerman & Basu, 2007).

Nem sempre se utiliza carne fresca, no entanto o congelamento desta acarreta riscos, tais como o aceleração do processo de oxidação lipídica aquando da sua transformação em produto fermentado. Assim, é recomendado não se utilizar carne de porco com mais de três meses de congelação, sendo que esta deve ser efetuada a -18 °C (Ruiz, 2007).

A carne é rica em proteínas e possui um elevado valor de a_w (0,97) e um pH compreendido entre 5,6 e 6,0. Quando o pH da carne se aproxima de 6,0, há favorecimento do desenvolvimento microbiano, particularmente bactérias de deterioração como *Pseudomonas*. As bactérias predominantes na carne fresca são tipicamente gram-negativa, oxidase positiva, aeróbios maioritariamente *Enterobacteriaceae* psicrotróficas, poucas bactérias de ácido láctico (LAB), assim como outras bactérias gram-positivas e leveduras. Por vezes podem estar presentes *Salmonella tyhimurium* e *Salmonella enteritidis* (Tradisausage, 2006; Garriga & Aymerich, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Selgas & Garcia, 2007 ; Coma, 2008).

A produção de carnes fermentadas depende do crescimento de microrganismos, então é essencial que a carne seja processada de forma higiénica e mantida sobre refrigeração durante todo o tempo que antecede a sua utilização, tal como acontece na produção do chouriço tradicional Alentejano, como descreve Elias *et al.*, (2006), afirmando que a carne e a gordura são normalmente sujeitas a refrigeração antes de se dar início ao processo de fabrico (Elias *et al.*, 2006; Ockerman & Basu, 2007).

A gordura utilizada na produção de chouriços fermentados participa no processo produtivo como um dos ingredientes principais e provém do tecido adiposo subcutâneo do porco. Esta gordura é usualmente proveniente da entremeada, mas também pode ser utilizada a de toucinho. De acordo com Elias *et al.* (2006) a gordura provem do toucinho dorsal do suíno e

deve ser firme. Esta matéria-prima é uma fonte de recursos sensoriais e tecnológicos, uma vez que permite aumentar a suculência do produto, retardar a sua desidratação, e contribuir para o desenvolvimento de aroma e libertação do mesmo. Ordóñez e Hoz (2007), afirmam de igual modo que a gordura deve ser firme e frisam ainda que deve ter um elevado ponto de fusão e poucos ácidos gordos polinsaturados, para que assim se evite uma rápida oxidação lipídica e a exsudação de gorduras (Elias *et al.*, 2006; Ockerman & Basu, 2007; Ordóñez & Hoz, 2007; Ruiz, 2007).

Ao contrário do que acontece com a carne, é cada vez mais usual a utilização de gordura de porco fresca para proceder à preparação do produto fermentado. No entanto, também é habitual picar a gordura e congelar a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, para evitar a fusão e para que posteriormente se obtenha uma superfície de corte bem definida. Porém, o tempo de congelação também não deve exceder os três meses, a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ruiz, 2007).

A presença de gordura nestes produtos contribui para a existência de um efeito barreira, fazendo este com que haja uma diminuição da taxa de secagem, ou seja, quanto maior for o teor de gordura, mais baixa será a taxa de secagem. Por outro lado, essa barreira vai impedir que a superfície do alimento tenha uma desidratação excessiva. O teor de gordura dos chouriços é muito ampla, podendo variar entre 5-70% (Andrés, Barat, Grau & Fito, 2007).

Relativamente à carne e gordura aplicadas no fabrico de chouriço, o mais comum é serem utilizadas numa proporção carne/gordura de 70/30 (Elias *et al.*, 2006). Porém, de acordo com Fraqueza e Patarata (2006) é também comum uma proporção de carne/gordura de 80/20. Por sua vez, Ordóñez e Hoz (2007), afirma que a quantidade de carne corresponde a 65 a 80% do peso total do chouriço, e a gordura a 20 a 40%. Uma diminuição nos teores aplicados pode trazer consequências no produto final, levando a que este desidrate mais rapidamente e a que as características sensoriais do produto final sejam as mais apreciadas (Ordóñez & Hoz, 2007; Ruiz, 2007).

2.1.2.1.2. Ingredientes Facultativos

A água é um dos ingredientes facultativos cuja funcionalidade tecnológica é apenas de facilitar uma mistura adequada de todos os ingredientes ou, quando necessário, permitir a dissolução de algum deles (Ruiz, 2007).

De acordo com a lei nº 75/2009, o sal é definido como sendo “o composto iónico cujo elemento mais conhecido é o cloreto de sódio, vulgarmente conhecido como “sal comum” ou “sal da cozinha”, por ser largamente utilizado na alimentação humana”. Já o Decreto-Lei nº 350/2007, define sal alimentar como um “produto cristalino de extração no estado natural (tal qual) ou tratado, essencialmente constituído por cloreto de sódio, num mínimo de 90% do produto seco” (Decreto-Lei nº 350/2007 e Lei nº 75/2009).

O sal, um dos ingrediente mais importante no processamento de carnes fermentadas, está praticamente sempre presente no processo de fabrico, e confere ao produto final uma série de atributos desejáveis. Este ingrediente proporciona um sabor salgado ao produto e solubiliza as proteínas, assim que começa a entrar em contacto com a massa de carne. Consequentemente, há um aumento da capacidade de retenção da água e um controlo da deterioração por parte dos microrganismos, uma vez que o sal facilita o crescimento das LAB e inibe o crescimento dos outros microrganismos lá presentes e indesejáveis, provocando então uma seleção natural dos microrganismos que são úteis ao processo. Esta seleção natural é crucial na medida em que está relacionada com a continuação do processo produtivo, ajudando na fermentação e consequente diminuição do pH. Por sua vez ocorre a redução da atividade de algumas enzimas e a dissolução de determinadas proteínas da carne fica facilitado, permitindo então que estas funcionem como emulsionantes originando uma massa homogénea (entre gordura e carne), ou seja, que haja coesão do produto. Este componente permite-nos alcançar algumas das características organolépticas pertencentes ao chouriço. A adição de sal é feita numa percentagem de 2 a 4% (Andrés *et al.*, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Incze, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Ruiz, 2007; Stahnke & Tjener, 2007).

Num estudo realizado no ano de 2001 concluíram que nos produtos cárneos fermentados, quando o teor de sal no produto final é de cerca de 5% que há uma redução bastante significativa da produção de aminas biogénicas, em alguns casos chega mesmo a haver inibição total (Ruiz, 2007).

O sabor salgado é, por vezes, característico dos produtos cárneos fermentados, porém com a crescente incidência de problemas de saúde associado ao consumo excessivo de sal, a tendência é para que o teor de sal adicionado a estes produtos diminua. Contudo, o sabor característico não pode ficar comprometido (Ruiz, 2007).

Os açúcares simples (hidratos de carbono) por vezes fazem também parte dos ingredientes. Estes têm como papel principal o de servir de substrato à fermentação. O açúcar é a fonte de energia para as LAB desempenharem a sua função tecnológica aquando da fermentação, produzindo ácido láctico. Os principais açúcares utilizados são a glicose (utilizável por todas as LAB), sacarose, lactose, dextrose, xaropes de milho e diferentes amidos (Elias *et al.*, 2006; Garriga & Aymerich, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Ruiz, 2007; Stahnke & Tjener, 2007).

A quantidade de açúcar adicionado ronda normalmente os 0,6 a 0,8%. A quantidade que se adiciona vai influenciar a acidificação, contribuindo favoravelmente para a textura e sabor do produto, e o tipo de açúcar adicionado tem influência na taxa de decréscimo do pH, pois os dissacarídeos têm de ser hidrolisados a monossacarídeos antes de se iniciar o processo de glicólise (Garriga & Aymerich, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Ordóñez & Hoz, 2007; Ruiz, 2007; Stahnke & Tjener, 2007).

Em Portugal, no fabrico de enchidos Alentejanos, a grande parte dos produtores não recorre a adição de açúcar (Elias *et al.*, 2006).

Os condimentos e as especiarias interagem entre si, juntamente com todos os restantes ingredientes e proporcionam aos produtos um sabor *sui generis* (Roncalés, 2007).

Condimentos e especiarias, como massa de pimentão, massa de alho, colorau, pimenta, estas quando utilizadas conferem ao produto fermentado propriedades organoléticas características, possibilitam o desenvolvimento da cor e sabor assim como estimulam o crescimento das LAB e conferem alguns efeitos antioxidantes (Ockerman & Basu, 2007; Stahnke & Tjener, 2007).

O colorau e massa de pimentão assim como o alho obtêm-se de plantas aromáticas e têm um elevado teor de óleos essenciais. Estes podem manifestar um efeito inibitório sobre determinadas bactérias e impedir o desenvolvimento de aromas indesejáveis no produto final. Por exemplo, quando aplicado em produtos cárneos, o alho inibe o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* (Andrés *et al.*, 2007; Chi & Wu, 2007; Ockerman & Basu, 2007).

Por vezes, o vinho branco também pode ser utilizado como ingrediente (Garriga & Aymerich, 2007).

2.1.2.2. Aditivos Alimentares

Por definição, um aditivo alimentar é “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 organolética, em qualquer fase de obtenção, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenamento de um género alimentício, tem como consequência quer a sua incorporação nele ou a presença de um derivado, quer a modificação da características desse género” (Decreto-lei nº192/89).

Os aditivos podem ou não ser adicionados durante o processo de fabrico de enchidos secos fermentados. Aquando da sua aplicação, estes podem ter diversas finalidades, tais como: facilitar o processo produtivo ou mesmo padronizá-lo; inibir microrganismos indesejáveis; ou até mesmo para responder às exigências dos consumidores a nível sensorial.

Relativamente aos conservantes, a legislação é muito restrita, só se podendo adicionar dois grupos de conservantes: aqueles que inibem especificamente os microrganismos produtores de toxinas e esporos; e aqueles que são aplicados na superfície e que inibem bolores e leveduras. A nisina e a natamicina são exemplos de agentes antimicrobianos autorizados para serem aplicados na superfície dos produtos (Roncalés, 2007).

Por vezes são aplicados ácidos diretamente nas massas cárneas (ácido láctico ou cítrico, são os mais comuns) afim de se obter a desejada diminuição do pH, num curto espaço de tempo. O uso de ácidos como aditivo é comum quando não se utilizam culturas de arranque (Roncalés, 2007).

Porém, os aditivos utilizados mais comuns são os fosfatos, nitratos e nitritos.

A adição de fosfatos nas massas de produtos cárneos decorre de variadas funções, entre as quais se destacam as de agentes estabilizadores² e gelificantes³. Assim, da sua adição resulta uma melhor ligação da carne às partículas de gordura, uma maior suculência e melhor textura, assim como uma secagem mais equilibrada e um aumento no tempo de vida útil. Todos estes benefícios são conseguidos sem a adição dos fosfatos, mas para tal é necessário que exista uma excelente otimização do processo de fabrico (Roncalés, 2007).

A concentração máxima de fosfatos autorizada nos produtos alimentares encontra-se legislada. Na União Europeia a concentração máxima residual está estabelecida em 5 mg/Kg de carne. No entanto, há que ter em consideração que a própria carne já contém uma grande quantidade de fosfatos na sua composição (Roncalés, 2007; Diretiva 2010/69/UE).

Desde os tempos mais antigos que os nitritos e nitratos fazem parte integrante da formulação dos enchidos secos fermentados. Estes aditivos, utilizados na região do mediterrâneo, são agentes antimicrobianos e antioxidantes, e ao mesmo tempo funcionam como agentes conservantes, e têm também a capacidade de proporcionar ao género alimentar a fixação e obtenção de uma cor típica e apelativa para o consumidor (Flores, 1997; Arnau *et al.*, 2007; Cocconcelli, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Roncalés, 2007).

Na presença de nitritos o desenvolvimento de algumas bactérias é inibido, como é o caso de *Clostridium botulinum* e de *Listeria monocytogenes*. Assim, a presença de nitritos é vantajosa porque, apesar de muitos dos microrganismos ficarem inibidos apenas com a presença do sal, com a adição de nitrito o risco de desenvolvimento microbiano até dar início a fermentação, é menor. Os nitritos em conjunto com o sal promovem o crescimento de *Lactobacillus* e inibem espécies dentro da família das *Enterobacteriaceae* e outras bactérias. Já *Staphylococcus* não são afetados com os níveis de nitritos adicionados ao processo, tal como acontece com as leveduras e bolores (Andrés *et al.*, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Stahnke & Tjener, 2007).

A aplicação de nitratos e nitritos é legal para os produtos à base de carne, no entanto a sua utilização é bastante controversa, na medida em que podem estar diretamente relacionados com o aparecimento de alguns tipos de cancro, devido à formação de nitrosaminas, sendo então potencialmente prejudiciais para a saúde do consumidor (Roncalés, 2007).

De acordo com a Diretiva 95/2/CE, é permitido adicionar uma quantidade máxima de 150 mg/Kg de nitrito, e a quantidade residual não pode ultrapassar as 50 mg/Kg. No que respeita

² Permite a manutenção do estado físico-químico do produto, assim como a manutenção de uma dispersão homogénea de duas ou mais substâncias imiscíveis assim como as substâncias que estabilizam, retêm ou intensificam a cor natural do género alimentício (Decreto-Lei nº363/98).

³ Melhora a textura do alimento através da formação de um gel, por interação entre as cadeias proteicas (Decreto-Lei nº363/98).

aos nitratos, a quantidade máxima adicionada está fixada nos 300 mg/Kg enquanto que a residual é de 250 mg/Kg (Diretiva 95/2/CE e Decreto-Lei nº363/98).

Os nitratos são reduzidos a nitritos durante o processo de fabrico por microflora tecnológica, e aquando da adição dos dois compostos, o que é bastante comum, a quantidade de nitratos deve ser superior à de nitritos, uma vez que a sua ação se prolonga durante todo o tempo de cura/fumagem (Ockerman & Basu, 2007; Roncalés, 2007).

2.1.2.3. Invólucros utilizados

Os invólucros utilizados no fabrico de enchidos fermentados são as tripas naturais e artificiais.

As tripas começaram a ser utilizadas apenas para colocar carne picada e assim facilitar o seu processamento, por exemplo enquanto era cozida. Hoje em dia, a tripa permite-nos a formação de um novo produto. Este invólucro possibilita que a massa de ingredientes, já maturada, adquira a coesão, forma e dimensão pretendidas, para além de a proteger de influências externas (contaminações microbianas). Contudo é necessário garantir que a própria tripa não constitui uma fonte de contaminação, quer microbiana ou química (Elias *et al.*, 2006; Wu & Chi, 2007).

As tripas utilizadas na indústria alimentar dividem-se em três grandes grupos: as tripas naturais, artificiais e sintéticas. As artificiais podem ser de colagénio, celulose (um polímero biodegradável) as sintéticas são de plástico, enquanto que as naturais são normalmente provenientes do intestino delgado de porco, mas podem também ser originárias de vacas ou ovinos (Elias *et al.*, 2006; Incze, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Wu & Chi, 2007)

Após limpeza, preparação e calibração, a tripa natural, é normalmente salgada e em alguns caso é seca (tripa seca natural). Porém este tipo de tripa é mais cara, com alguma irregularidade no calibre e frágil, mas confere ao produto uma melhor aparência, um aspeto tradicional, e permite que este adquira uma cor bastante apelativa após fumagem. Além disso, a utilização deste tipo de invólucro é uma mais-valia para o produto final, uma vez que lhe adiciona valor nutricional, por ser um material à base de proteínas. A tripa natural não confere qualquer sabor desagradável ao produto, uma vez que tendem a ter um sabor neutro (Fraqueza, 1992; Wu & Chi, 2007).

Com o calor e humidade, a tripa natural tende a ficar mais porosa e macia, permitindo que o fumo penetre profundamente (Wu & Chi, 2007).

Quanto às tripas artificiais, estas são mais baratas, têm um calibre uniforme (o que facilita o processo produtivo, por exemplo no enchimento), um maior diâmetro, e são mais resistentes, facilitando a sua utilização nas enchedoras automáticas, sendo então as que mais se utilizam a nível industrial. As tripas de celulose e colagénio são permeáveis ao vapor de água e gases, podendo então ser utilizadas para este tipo de produtos fermentados. As tripas de colagénio são comestíveis, e são feitas a partir de colagénio, que

se encontra presente no tecido conjuntivo, ossos e cartilagens de mamíferos. Quanto às tripas de celulose, estas têm de ser removidas antes de consumo, não podendo ser ingeridas (Arnau *et al.*, 2007; Incze, 2007; Wu & Chi, 2007).

2.1.3. Caracterização da estabilidade do chouriço

A quantidade de água livre que se encontra presente num determinado alimento (medida pela atividade da água - a_w) e a acidez (medida pelo pH) são fatores abióticos que interagem com a estabilidade de um alimento.

A a_w é um conceito fundamental na avaliação da perecibilidade dos produtos. Entende-se por atividade da água, a quantidade de água que se encontra de forma disponível num determinado alimento, ou seja, é a água que funciona como solvente, permitindo o crescimento de microrganismos e reações químicas e que pode ser eliminada com relativa facilidade. Toda a restante água encontra-se quimicamente ligada a outras moléculas e portanto imobilizada ou adsorvida, não estando disponível para participar em qualquer outra reação, ao contrário da água livre, como referido. Assim, em função do valor de a_w é possível determinar a capacidade dos microrganismos colonizarem um determinado alimento, uma vez que para valores de a_w elevados está favorecido o desenvolvimento microbiano, portanto quanto mais baixo o valor de a_w mais estável será o alimento. Os valores de a_w estão compreendidos entre 1,00 e 0,00, os quais correspondem respetivamente à água livre (equivale à água pura) e à inexistência de água livre. Deste modo, classificam-se os alimentos em função do valor de a_w . Tal como apresentado na Tabela 3, os géneros alimentares com valores de a_w compreendidos entre 0,90 e 1,00 são classificados como *alimentos de humidade elevada* o que corresponde a produtos altamente perecíveis. Um alimento moderadamente perecível e classificado como *alimento de humidade intermédia* é aquele que apresenta um valor de a_w entre 0,60 e 0,90. Por último, os produtos que apresentam valores de a_w entre 0,00 e 0,60 classificam-se como *alimentos de humidade baixa* e são estáveis (Pampulha, 1998 ; Fernandes, 2010).

Tendo em consideração que os enchidos secos fermentados da zona do Mediterrâneo englobam os chouriços tradicionais portugueses e que apresentam valores de $a_w < 0,90$, então podemos classificá-los como um alimento de humidade intermédia (Ordóñez & Hoz, 2007).

Relativamente à acidez que possa estar presente num produto alimentar (sendo esta medida pelo pH) os valores podem variar entre 1 e 14, considerando que quanto mais baixo for o valor de pH mais ácido é o alimento e, conseqüentemente, mais estável será o produto pois a acidez inibe os microrganismos. Assim, para um determinado alimento, os valores de pH e a_w ajudam na determinação da sua classificação quanto à perecibilidade assim como em relação às condições de armazenamento (Tradisausage, 2006).

Tabela 3: Classificação dos alimentos em função do valor de a_w (Fernandes, 2010).

Classificação dos alimentos em função do valor de a_w	Varição de a_w	Grau de degradação
Alimentos de Humidade Elevada	$0,90 < a_w < 1,0$	Altamente Perecíveis
Alimentos de Humidade Intermédia	$0,60 < a_w < 0,90$	Moderadamente Perecíveis
Alimentos de Humidade Reduzida	$a_w < 0,60$	Estáveis

Poucos microrganismos conseguem crescer a valores de pH inferiores a 2,0 ou maiores do que 10,0. No entanto, muitos são os fungos que podem crescer a valores de pH baixos (entre 1,5 e 2,0) apesar do seu ótimo de crescimento ser entre 5,0 e 6,0 (Pampulha, 1998; Chi & Wu, 2007).

Na Tabela 4, encontram-se apresentadas as condições de armazenagem de produtos cárneos em função da a_w e pH.

Tabela 4: Condições de armazenagem de produtos cárneos em função da a_w e pH (Diretiva Sanitária nº 77/99/CEE).

Classificação	a_w /pH	Temperaturas de armazenamento
Estáveis	$a_w < 0,95$ e $pH < 5,2$ ou $a_w < 0,91$ ou $pH < 4,5$	Não necessitam de refrigeração
Alteráveis	$a_w < 0,95$ ou $4,5 < pH < 5,2$	< 10 °C
Facilmente alteráveis	$a_w > 0,95$ e $pH > 5,2$	< 5 °C

Quer os valores de a_w quer os de pH podem ser “manipulados”. Quando um produto alimentar é sujeito a processos tecnológicos, tais como secagem ou desidratação, por exemplo, levam o alimento a perder água logo há diminuição da a_w . Em relação à acidez, a adição de ácidos fracos ou a ocorrência de fermentações que levem à produção de ácidos que diminuem o pH do produto. No caso do chouriço, ocorre uma fermentação láctica, com consequente formação de ácido láctico e diminuição do pH.

Como já referido, o chouriço classifica-se com um *enchido fumado*. Estes produtos, pertencentes aos enchidos da zona do mediterrâneo, apresentam um valor de pH de 4,5-5,0 e de $a_w < 0,90$, sendo então avaliados, de acordo com os dados presentes na Tabela 4, como produto estável e que não necessita de refrigeração durante a sua armazenagem (Ordóñez & Hoz, 2007).

Apesar de o chouriço ser classificado com um produto estável, há que ter em consideração que, devido ao valor de a_w que apresentam, são suscetíveis de desenvolver alguma

microflora, nomeadamente bactérias, bolores e leveduras. No fabrico de enchidos, dos quais fazem parte os chouriços, são utilizadas diferentes tecnologias com o intuito de obter uma melhor conservação. De entre essas tecnologias destacam-se a desidratação, a salga, a fumagem (levam a diminuição da a_w), e a adição de aditivos ácidos (leva a diminuição do pH). Muitas vezes estes processos são utilizados de forma conjunta, levando a uma alteração acentuada no microbiota original, o qual provém das matérias-primas que dão origem ao produto final.

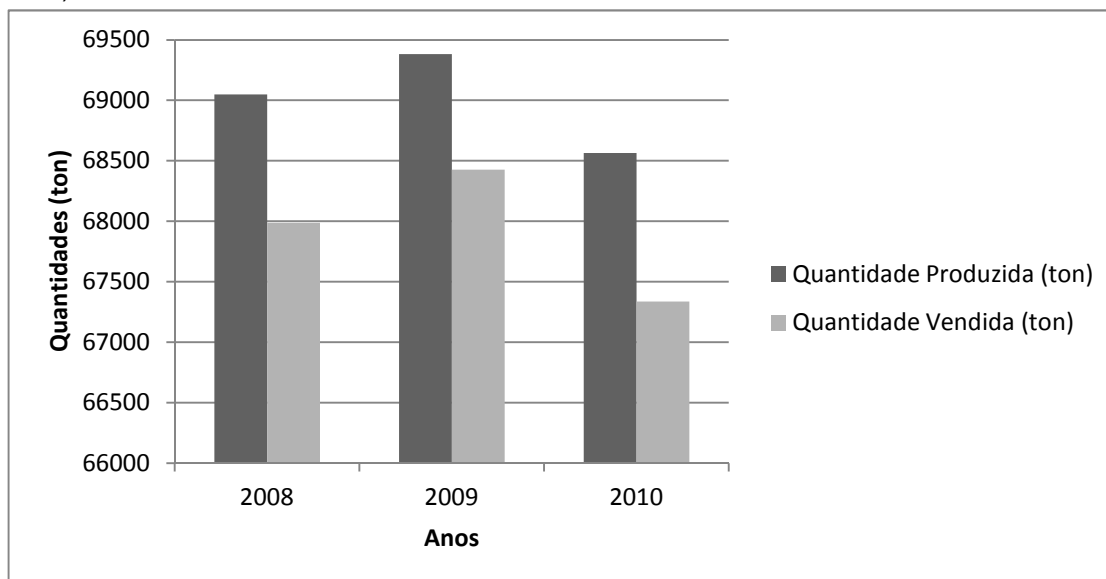
2.2. Importância e consumo do chouriço tradicional Português

Os chouriços secos e fermentados são um dos mais importantes produtos de carne e, devido a fatores de conservação variados, possuem um elevado período de vida útil. Estes produtos são normalmente bastante versáteis e conhecidos entre a população, que os aceita e aprecia, fazendo então parte da dieta dos consumidores (Selgas & Garcia, 2007; Toldrá *et al.*, 2007 ; Thomas, Anjaneyulu & Kondaiah, 2008).

Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), presente nos documentos anuais intitulados de “Estatísticas da Produção Industrial” verificamos que os chouriços de carne se englobam nos dados de produção e vendas referentes a “enchidos e produtos semelhantes, de carne, miudezas ou sangue, incluindo preparações alimentícias à base de tais produtos (exceto de fígado e refeições e pratos preparados)”. Assim não é possível ter uma ideia assertiva dos dados de produção nacional de chouriço de carne, porém é-nos possível ficar com uma ideia dos referidos valores.

Entre os anos de 2008 a 2010, verificámos a existência de uma elevada produção e que a maior parte dessa produção é vendida, ou seja, supõe-se que seja consumida. Pela análise dos dados presentes na Figura 1, verifica-se que os níveis de produção são elevados e que durante os três anos se mantiveram acima das 68 500 toneladas (ton). Porém, entre o ano de 2009 e 2010 registou-se uma ligeira quebra na produção (de 69 381 ton em 2009, e 68 563 ton em 2010). Como podemos verificar, o consumo de enchidos é bastante elevado, quer na sua forma original ou já como parte integrante de uma preparação alimentícia (INE 2010a; INE 2010b; INE 2012).

Figura 1 – Quantidades de “enchidos e produtos semelhantes, de carne, miudezas ou sangue, incluindo preparações alimentícias à base de tais produtos (exceto de fígado e refeições e pratos preparados)” produzidas e vendidas, em Portugal, entre 2008 e 2010 (INE, 2010a; INE 2010b; INE 2012).



2.2.1. Caracterização nutricional do chouriço de carne

Relativamente ao valor nutricional dos chouriços de carne de porco, magros e crus, é possível afirmar que por cada 100 g de parte edível existem 408 Kcal, 34,5 g de gordura total, 24,5 g de proteína, 1,8 µg de vitamina B12 e que não existe hidratos de carbono (substrato consumido na totalidade durante a fermentação), tal como podemos constatar na Tabela 5 (INSA, 2010).

Tabela 5 – Composição nutricional do Chouriço de carne de porco, magro, cru (INSA, 2010).

Composição nutricional do Chouriço de carne de porco, magro, cru		
	Componentes	Por 100 g de parte edível
Energia	Energia, kcal	408
	Energia, kJ	1709
Macroconstituintes	Água, g	32,5
	Proteína, g	24,5
	Gordura total, g	34,5
	Total de Hidratos de Carbono disponíveis, g	0
	Total de Hidratos de Carbono expresso em monossacáridos, g	0
	Mono+dissacáridos, g	0
	Ácidos orgânicos, g	0
	Alcool, g	0
	Amido, g	0
	Oligossacáridos, g	0
	Fibra alimentar, g	0

Tabela 5 (continuação) – Composição nutricional do Chouriço de carne de porco, magro, cru (INSA, 2010).

Composição nutricional do Chouriço de carne de porco, magro, cru		
	Componentes	Por 100 g de parte edível
Ácidos Gordos	Ácidos gordos saturados, g	11,9
	Ácidos gordos monoinsaturados, g	13,6
	Ácidos gordos polinsaturados, g	4,0
	Ácidos gordos <i>trans</i>, g	0,1
	Ácido linoleico, g	3,4
Colesterol	Colesterol, mg	85
Vitaminas	Vitamina A total (equivalentes de retinol), µg	0
	Caroteno, mg	0
	Vitamina D, µg	0
	α-tocoferol, mg	0,40
	Tiamina, mg	0,69
	Riboflavina, mg	0,20
	Equivalentes de niacina, mg	6,3
	Niacina, mg	5,0
	Triptofano/60, mg	1,3
	Vitamina B6, mg	0,38
	Vitamina B12, µg	1,8
	Vitamina C, mg	0
	Folatos, µg	1,0
Minerais	Cinzas, g	9,50
	Sódio (Na), mg	2300
	Potássio (K), mg	210
	Cálcio (Ca), mg	30
	Fósforo (P), mg	280
	Magnésio (Mg), mg	21
	Ferro (Fe), mg	2,7
	Zinco (Zn), mg	3,1

2.3. Processo tecnológico da produção de chouriço tradicional

Os produtos cárneos secos fermentados são reconhecidos pelas suas características sensoriais específicas (Arnau *et al.*, 2007). O processo de produção do chouriço, um enchido seco fermentado, pode ser caracterizado por diferentes etapas: seleção da carne e gordura e corte das mesmas; preparação da massa de carne; maturação; enchimento e cura (Elias *et al.*, 2006).

A carne e a gordura, de porco, são os dois ingredientes fundamentais no processo. A seleção destes é efetuada em função das características ideais e pretendidas para estes ingredientes. O corte dos ingredientes em pedaços de dimensões reduzidas é denominado por miga e pode ser processado manualmente ou com recurso a picadoras. Esta fase é de extrema importância no que respeita a contaminações, pois o interior de uma peça de carne é estéril, mas assim que iniciamos o corte tornamos a contaminação bastante suscetível de ocorrer, e assim que a contaminação se inicia a carne começa a entrar em fase de

deterioração e a perder qualidade. Posto isto é necessário por em prática todos os cuidados de higiene descritos nos códigos de boas práticas. Este processo tecnológico deve desenvolver-se num ambiente refrigerado (Elias *et al.*, 2006; Ordóñez & Hoz, 2007; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

Segue-se a preparação das massas que corresponde à mistura da carne e gordura com os restantes ingredientes e aditivos (que pode incluir ou não, as culturas de arranque), formando uma massa homogénea que é seguidamente sujeita a repouso, o qual se denomina por maturação. Durante a maturação ocorrem dois processos em simultâneo: a entrada do sal nos fragmentos de carne e a extração de água e proteínas miofibrilares da mesma, dando-se então início aos processos físicos, bioquímicos e microbiológicos do produto. Este processo demora normalmente entre 24 e 48 horas, a uma temperatura que ronda os 2 a 6°C (Elias *et al.*, 2006; Ordóñez & Hoz, 2007).

Findo o tempo de maturação é vez de proceder ao enchimento. Nesta etapa, a massa já maturada é colocada num invólucro, a tripa natural (Elias *et al.*, 2006; Ordóñez & Hoz, 2007).

Após o enchimento, com conseqüente obtenção de unidades de chouriço individualizadas por atadura, em forma de ferradura, efetua-se a cura. A cura está associada ao processo de fumagem, durante o qual ocorre a fermentação e a secagem (Elias *et al.*, 2006).

A fermentação é o passo fundamental do processamento de chouriços tradicionais, e é tradicionalmente desempenhada pelo desenvolvimento da microflora natural e desejável, presente no produto. Porém, nas produções mais modernas são por vezes adicionadas culturas puras de microrganismos para acelerar o processo denominadas por culturas de arranque ou *Starters*) (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007; Flores & Toldrá, 2011).

A fase de secagem, no fumeiro, decorre normalmente num intervalo de temperatura situado entre 10 e 20 °C. A fumagem é comumente efetuada com lenha de azinho e decorre a temperaturas que vão dos 10 aos 40 °C, durante um período de tempo variável, que pode ir dos 3 aos 7 dias (podendo este tempo ser mais alargado e chegar mesmo aos 42 dias). Durante este período dá-se a continuidade dos processos de transformação do produto, iniciados na fase de maturação, e que irão conferir ao produto características organolépticas totalmente diferentes daquelas que caracterizam as matérias-primas que lhe deu origem. Caso a secagem não seja efetuada no fumeiro, esta ocorre em salas à temperatura ambiente ou de ambiente controlado (Elias *et al.*, 2006; NP 589, 2008).

Terminado o processo é altura de considerar o produto acabado. A maioria dos produtores embala os chouriços a vácuo, em atmosfera modificada ou em película plástica (Elias *et al.*, 2006).

2.4. Contributo da tecnologia de barreiras para a conservação dos enchidos

Para adquirirmos produtos estáveis e seguros é essencial que estes sejam produzidos a partir de matérias-primas e aditivos de elevada qualidade higiénica e com a aplicação de boas práticas de fabrico e de higiene durante todo o processo produtivo (Incze, 2007).

A segurança dos alimentos e estabilidade microbiana dos mesmos está normalmente relacionada com a combinação de diferentes tecnologias de conservação do produto (Thomas *et al.*, 2008). A tecnologia de barreiras (“*hurdle technology*”) é comum na indústria alimentar, pois tal como o próprio nome sugere, são tecnologias utilizadas como barreira ao desenvolvimento de microrganismos. Este conceito tecnológico desenvolvido por Leistner (1987) é de elevado interesse, tanto no presente como no futuro, e tem particular importância nos chouriços fermentados (Leistner, 1987; Leistner & Gorris, 1995; Ockerman & Basu, 2007). De acordo com Andrés *et al.* (2007), para este tipo de produto alimentar, um valor de a_w de 0,80 já é considerado um valor razoável para se obter um produto estável. Para tal é necessário haver a combinação perfeita entre a_w , temperatura e teor de humidade, combinação essa que nos é dada pelas curvas isotérmicas, as quais diferem de produto para produto alimentar (Andrés *et al.*, 2007).

Assim, para que haja a referida combinação ideal, é comum que se empregue uma combinação de técnicas de conservação de alimentos. Em combinação com a secagem e fumagem, é comum acoplarem-se outras técnicas, as quais podem passar pela refrigeração (das matérias-primas, principalmente da carne de suíno e gordura, uma vez que são bastante perecíveis à temperatura ambiente), cura (impedindo o crescimento microbiano principalmente de *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes*), salga, adição de especiarias, fermentação e biopreservação, tipo de embalagem e tipo de armazenamento, e assim aumentar o tempo de vida útil do produto alimentar (Andrés *et al.*, 2007; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

A biopreservação passa pela possível produção de compostos antimicrobianos naturais, por parte das bactérias que levam a cabo a fermentação (principalmente as LAB), de forma a eliminarem os agentes patogénicos. Assim é adquirido um potencial que melhora a qualidade e segurança dos alimentos (Ockerman & Basu, 2007).

As bacteriocinas têm aplicações na tecnologia de barreiras, sendo utilizadas para tratamentos combinados (de modo a terem um efeito sinérgico) e assim levar a cabo uma conservação dos alimentos mais eficaz (Cleveland & Chikindas, 2001).

O embalagem a vácuo e em atmosfera modificada (MAP) são as formas de embalagem mais frequentes para o produto em questão, o chouriço, permitindo o aumento do tempo de vida útil do produto. Para os produtos cárneos secos e curados é comum que a atmosfera da embalagem do chouriço seja modificada por formação de vácuo, e aplicada de seguida uma mistura gasosa de oxigénio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) ou azoto (N_2) e CO_2 , sendo este último caso o mais comum, com aplicação de 70-80% e 20-30%, respetivamente.

Nestas condições, e a uma temperatura compreendida entre os 10 e os 15 °C, o tempo de vida útil do produto é de 3 meses (Ahn & Min, 2007; Andrés *et al.*, 2007).

Neste tipo de embalagem o O₂ tem como função manter os pigmentos da carne oxigenados (ou seja, para que não haja oxidação indesejada), o CO₂ visa inibir o crescimento de bactérias de deterioração, enquanto que o N₂ é um gás inerte que se destina-se simplesmente a reduzir a proporção dos outros dois gases, ou dar enchimento à embalagem para que esta mantenha a sua forma (Kerry, O'Grady & Hogan, 2006).

Ainda que sejam aplicadas as tecnologias de barreira no processo de fabrico e conservação do chouriço tradicional, existe uma causa de deterioração do produto que continua a ser difícil de controlar após a abertura da embalagem, já na casa do consumidor: o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras na superfície do enchido (Tradisausage, 2006).

2.4.1. Fermentação

O processo de fermentação e secagem são duas das mais antigas técnicas de conservação de carne. Porém os primeiros conhecimentos sobre enchidos fermentados chegaram à zona do Mediterrâneo há pouco mais de 2000 anos (Garriga & Aymerich, 2007; Ockerman & Basu, 2007).

A fermentação de produtos cárneos é o processo mais complexo de entre os diferentes processos de tecnologias de carne, e ocorre devido à presença de microrganismos pertencentes à flora intrínseca das matérias-primas, nomeadamente na carne (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

Desta flora fazem parte microrganismos com capacidade para levar a cabo uma fermentação, a qual influencia a estabilidade final do produto. As bactérias responsáveis por este processo são na sua grande maioria as bactérias do ácido láctico (LAB). Estas bactérias são responsáveis por uma série de reações: produção de ácido láctico com consequente redução do pH; fornecem ao alimento uma série de enzimas que desencadeiam alterações bioquímicas (degradação enzimática dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos) que proporcionando ao alimento uma série de atributos únicos e característicos, tais como textura, sabor, cor e tenrura. O sucesso destas reações é dependente de fatores como a temperatura da fermentação e fumagem, teor de sal e nitritos, entre outros. Dependendo dos produtores e do processo de produção, há quem introduza as LAB no fabrico, como cultura de arranque (Arnau *et al.*, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007 ; Flores & Toldrá, 2011).

Segundo Leroy *et al.*, (2006), os pequenos produtores continuam a utilizar o método tradicional, sem adição de *starters*, havendo então uma fermentação espontânea da massa

de carne, levada a cabo pelos microrganismos intrinsecamente presentes na matriz alimentar (Leroy *et al.*, 2006).

De acordo com Lücke (1999) (citado por Demeyer & Eerola, 2000), a produção de ácido láctico pode ser um importante mecanismo para garantir a segurança microbiológica destes produtos fermentados (Demeyer & Eerola, 2000).

A fermentação é um processo que ocorre em anaerobiose, no interior da célula microbiana, e que resulta essencialmente na produção de energia, sob a forma de ATP (adenosina trifosfato). Com a produção de ATP, os microrganismos adquirem a energia necessária para manterem as suas funções celulares e desenvolverem-se. Para que decorra a fermentação é necessário substrato, sendo utilizada para tal qualquer substância orgânica que contenha oxigénio ou hidrogénio na sua estrutura, sendo estes normalmente hidratos de carbono (como a glicose) ou aminoácidos. Cada estirpe de microrganismos seleciona a via específica pela qual utiliza os substratos para produção de energia, recorrendo na sua grande maioria à glicólise (Faia & Castro, 1998; Ordóñez & Hoz, 2007; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007; Wu & Chi, 2007).

A glicólise utiliza como substrato inicial a glicose, a qual vai sofrendo reações de fosforilação e de oxidação-redução ao longo do processo, sendo assim degradada. Estas reações permitem o consumo e obtenção de energia, com um saldo final de duas moléculas de ATP. É também importante referir que durante este processo há consumo de duas moléculas de água, o que leva a diminuição do a_w do produto (Faia & Castro, 1998; Quintas & Ascenso, 2008).

No final da glicólise obtêm-se duas moléculas de piruvato, o qual entra no processo de fermentação láctica, levado a cabo pelas LAB, da qual se obtém lactato (ácido láctico). Uma vez que as LAB não têm qualquer interesse no ácido láctico produzido, libertam-no para fora da célula, acidificando o meio e conferindo assim acidez (Quintas & Ascenso, 2008).

A glicose consumida neste processo provém das reservas de glicogénio⁴ presentes na carne, ou eventualmente de açúcar que tenha sido adicionado como ingrediente (Ockerman & Basu, 2007).

Dependendo do tipo de enchido que se pretende produzir, e da temperatura e humidade relativas aplicadas, a fermentação pode ter uma duração variável entre 12 horas até vários dias. Na Europa, a fermentação dura sempre mais do que 24 horas e as temperaturas variam entre 5 e 26°C, a uma humidade relativa de 85%, sendo as temperaturas mais baixas as praticadas na zona do Mediterrâneo. Quando a temperatura é mais elevada (> 18 °C) a duração pode ir de 1 a 3 dias. Caso a temperatura se mantenha nos 10/12 °C, então já pode durar cerca de 1 semana. De acordo com Ordóñez e Hoz (2007), a fermentação pode durar 24 a 48 horas a uma temperatura que pode variar entre 18 a 24 °C, com uma humidade

⁴ Glicogénio – substância de reserva de glúcidos/hidratos de carbono, presente no citoplasma das células animais. Constituído por subunidades de glicose (Azevedo, 2008).

relativa de aproximadamente 85%, e cuja sala onde se encontra o produto a maturar registre uma velocidade de ar que ronde os 0,5-0,8 m/s. Quanto mais elevada for a temperatura de fermentação e o valor de a_w , mais rápida é a produção de ácido láctico pelas LAB (Andrés *et al.*, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Lebert *et al.*, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Ordóñez & Hoz, 2007; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

O processo fermentativo inicia-se com o aumento da temperatura da massa de carne, já após enchimento, até cerca de 20 °C. É com o aumento da temperatura que começa a ação das LAB, iniciando a degradação do hidrato de carbono em ácido láctico com consequente difusão das moléculas de água consumidas durante o processo de degradação para a superfície do chouriço, evaporando-se (Andrés *et al.*, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Ockerman & Basu, 2007; Ordóñez & Hoz, 2007; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

A diminuição do pH durante este processo, para além de aumentar a estabilidade também melhora o processo de secagem, uma vez que diminui a capacidade de retenção da água.

No final da fermentação, a temperatura desce para valores compreendidos entre 10 e 14 °C e a humidade relativa para 85-87%, em aproximadamente 4 dias (Ordóñez & Hoz, 2007).

Este processo caracteriza-se pela produção de lactato, resultando então numa diminuição do pH e aumento do teor de sal, redução do nitrato a nitrito, perda de peso do produto e alterações a nível de cor, textura, sabor e aroma. De acordo com o tipo de produção, o valor do pH diminui de cerca de 5,7-6,2 para valores compreendidos entre 5,5 e 4,6 e o de a_w pode chegar até 0,85-0,86.

Com a acidificação do meio há uma seleção natural da microbiota presente, sendo alguns microrganismos inibidos por não serem acidófilos (Andrés *et al.*, 2007; Roncalés, 2007).

O resultado da fermentação depende principalmente de fatores intrínsecos e pouco pode ser feito após o produto estar preparado, a não ser controlar a temperatura, a humidade relativa do ar e a fumagem (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

No entanto, antes da preparação do produto alimentar, o processo fermentativo pode ser controlado de forma a ser o mais eficaz possível. Para tal é necessário efetuar-se uma seleção criteriosa dos diversos ingredientes que constituem o produto, requerendo a matéria-prima principal, a carne de suíno crua, uma especial atenção. Esta deve apresentar-se com a característica flora microbiana natural e um baixo pH. É igualmente importante efetuar-se uma seleção adequada do invólucro a ser utilizado, assim como o controlo da temperatura, a qual é um fator fulcral uma vez que tem um efeito seletivo sobre os microrganismos presentes na fermentação (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

Alguns dos principais fatores que influenciam a fermentação, são as enzimas e a flora microbiana ativa presentes na carne, o teor de sal e de nitrato que se reduz a nitrito, a temperatura e a fumagem (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

No decorrer do processo fermentativo, existe uma forte competição entre os diferentes microrganismos presentes, havendo influência no crescimento entre as diferentes espécies.

A competição rege-se aos nutrientes e às substâncias antimicrobianas que são produzidas pelos diferentes microrganismos lá presentes. Com este efeito antagónico determinados microrganismos deixam de estar nas suas condições ideais de desenvolvimento, e outros, pelo contrário, encontram-se em plenas condições de desenvolvimento e tornam-se a flora dominante (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

A matéria-prima principal do produto, a carne de porco crua, possui como principal microbiota bactérias gram-negativas, na sua maioria psicrófilas, as quais têm uma temperatura óptima de desenvolvimento que se situa entre os 3,3 e os 20 °C. Segundo Petäjä-Kanninem & Puolanne (2007), os géneros predominantes são *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, e *Moraxella*. Outros microrganismos como *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, bactérias do ácido láctico (LAB), e leveduras também se encontram na carne, mas numa quantidade inferior àquela que se regista para os microrganismos predominantes. Porém, grande parte das bactérias, em especial as gram-negativas, muitas vezes veem o seu crescimento inibido devido à quantidade de sal que é adicionado como ingrediente durante a produção, podendo este chegar a 3% ou mais. No entanto algumas LAB, *Staphylococcus* e *Micrococcus* são resistentes às concentrações de sal comumente utilizadas em produtos cárneos fermentados, e podem crescer a temperaturas de fermentação que se situem entre os 20 e 25 °C. Para produções tradicionais de enchidos fermentados as contagens de LAB pode chegar mesmo a 8 log UFC/g ou superior e para *Staphylococcus* e *Micrococcus* as contagens podem ser superiores a 5 log UFC/g (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

De acordo com Ordóñez & Hoz (2007), as LAB são a principal flora microbiana no final do período de maturação, a qual chega a atingir entre 7 a 9 log UFC/g.

Com a diminuição do pH para valores que rondam os 5,0, o crescimento da maioria das outras bactérias é inibido, mas não afeta os *Staphylococcus* e *Micrococcus* (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

A microbiota das carnes curadas pode ter origem ambiental, cutânea ou fecal, e é composta por *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Micrococcaceae*, *Leuconostoc spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Candida spp.*, *Thorula spp.*, *Geotrichum candidum* (Ordóñez & Hoz, 2007).

Petäjä-Kanninem e Puolanne (2007), afirmaram que a microflora bacteriana após fermentação é dominada pelas LAB, *Staphylococcus* e *Micrococcus*.

As LAB, os *Staphylococcus* e os *Micrococcus*, para além de competirem bem entre si e suprirem o crescimento das restantes bactérias, têm também a capacidade de se desenvolverem melhor, do que as outras bactérias, nas condições de fermentação da carne. Os agentes patogénicos, como a *Salmonella*, a *Yersinia enterocolitica*, e o *Campylobacter*, veem a sua sobrevivência eliminada aquando da fermentação do produto, uma vez que se adquirem baixos valores de a_w e pH (resultante da produção de lactato). Porém, a *Listeria* é

mais resistente ao processo fermentativo, mas em grande parte dos casos é eliminada durante a secagem do produto (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

Durante a fermentação e maturação do chouriço ocorrem duas reações bioquímicas, denominadas por proteólise e lipólise. A lipólise refere-se à hidrólise de lípidos, enquanto que a proteólise caracteriza-se pela degradação de proteínas através de enzimas, dando origem a pequenos componentes moleculares como polipéptidos, péptidos, aminoácidos livres e aminas (Martin-Sanchez *et al.*, 2011; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

A proteólise iniciada no início da fermentação é levada a cabo pelas proteases, enzimas presentes no tecido cárneo utilizado como ingrediente, que hidrolisam uma pequena porção de proteínas. Estas enzimas têm uma temperatura e pH ótimo para exercer a sua atividade, os quais se situam entre os 15-20 °C e 4,8-5,2, respetivamente (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

Relativamente à lipólise, esta reação caracteriza-se pela degradação da gordura (lípidos), obtendo como produtos desta hidrólise ácidos gordos livres e glicerol, assim como monoglicéridos e diglicéridos (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

2.4.1.1. Culturas de arranque - *Starters*

As culturas de arranque, ou *starters*, são utilizadas no fabrico de chouriços secos fermentados e têm como objetivo acelerar o processo de acidificação da massa de carne crua, levando ao desenvolvimento de uma desejável qualidade sensorial, pela melhoria da salubridade, cor, textura, aroma, sabor, valor nutritivo do produto, entre outros aspetos. Por outro lado, com a adição de *starters* ao processo, pretende-se assegurar a repetibilidade da produção, através de um correto crescimento microbiano, evitando assim falhas na produção que possam ser causadas pelas bactérias responsáveis pela deterioração, microrganismos patogénicos ou outros indesejáveis. Contudo, existem determinados fatores que interferem com a atividade das culturas de arranque aquando da sua utilização na produção de produtos à base de carne: a temperatura, os sais de cura (sal e nitrato e nitrito) e os hidratos de carbono adicionados (Elias *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2006 ; Stahnke & Tjener, 2007 ; Flores & Toldrá, 2011).

A identificação e seleção de bactérias para utilização como culturas de arranque teve início na última metade do século XX. A microflora natural dos chouriços tradicionais é uma excelente referência para determinarmos quais as bactérias a serem utilizadas como *starters*, uma vez que estas encontram-se bem adaptadas ao ambiente cárneo. Porém as culturas de arranque a serem utilizadas no processamento são determinadas em função de características específicas como a formulação específica da massa de carne, a tecnologia de fermentação, a resistência das estirpes ao sal e a antibióticos, ausência de atividade descarboxilativa ou aminogénica, a produção de bacteriocinas e, principalmente, a capacidade de competirem com a microbiota indígena da carne de forma a tornar-se a

dominante, uma vez que vão interferir, na seleção dos microrganismos, fatores ambientais, tais como a temperatura e a humidade relativa (Leroy *et al.*, 2006; Casaburi *et al.*, 2007; Cocconcelli, 2007 ; Flores & Toldrá, 2011).

As culturas de arranque são culturas microbianas normalmente compostas por microrganismos da família *Micrococcaceae* ou por bactérias do ácido láctico (LAB), em culturas puras ou mistas (LAB combinadas com *Staphylococcus* coagulase negativos e leveduras ou bolores). Na produção de produtos cárneos são as LAB que são mais comuns de utilizar, as quais permitem a obtenção de ácido láctico como produto final da fermentação. As LAB mais comumente utilizadas com *starters* no fabrico deste tipo de produto pertencem aos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*. No entanto, as LAB não produzem grande variedade, nem grandes quantidades de outros produtos finais (Elias *et al.*, 2006; Petäjä-Kanninen & Puolanne, 2007; Flores & Toldrá, 2011).

As culturas bacterianas normalmente utilizadas para fermentar carne são constituídas por estirpes de bactérias do ácido láctico (LAB), principalmente *Lactobacillus*, assim como por *Staphylococcus* coagulase negativos e *Micrococcaceae*. Os *Lactobacillus* mais utilizados como *starters* são os *L. sakei*, *L. curvatus* e *L. plantarum*. Os *Pediococcus* são também LAB e o *P. pentosaceus* é a espécie mais referenciada como *starter*. Relativamente aos *Staphylococcus*, os mais comuns como culturas de arranque são *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. equorum* e *S. saprophyticus* (Cocconcelli, 2007; Selgas & Garcia, 2007).

Os enchidos fermentados podem ser produzidos sem recurso à utilização de *starters*, no entanto a sua utilização está em crescimento, de modo a acelerar o processo produtivo e a garantir a segurança e a uniformidade do produto final, tais como a cor, a textura e o sabor. Porém, muitos produtores tradicionais continuam a não utilizar as culturas de arranque, sendo a fermentação efetuada apenas pela microbiota intrínseca da fábrica (maioritariamente LAB e *Staphylococcus* coagulase negativos), como é o caso do fabrico de enchidos Alentejanos, onde grande parte dos produtores não recorre a adição de *starters* (Elias *et al.*, 2006 ; Cocconcelli, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Lebert *et al.*, 2007 ; Flores & Toldrá, 2011).

As bacteriocinas, juntamente com o ácido láctico produzido durante a fermentação podem melhorar a qualidade e segurança dos produtos, evitando a presença de microrganismos patogénicos como a *Listeria monocytogenes* e microrganismos causadores de deterioração. *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus* têm sido descritos como produtores de bacteriocinas e têm sido utilizados como *starters* e a sua atividade contra *Listeria monocytogenes* já foi comprovada em produtos cárneos. De acordo com Davidson & Hoover, 1993 (citado por Millette *et al.*, (2007), as LAB são bactérias produtoras de bacteriocinas, metabolitos com propriedades antimicrobianas (Garriga & Aymerich, 2007; Millette, Le Tien, Smoragiewicz & Lacroix, 2007).

A utilização de culturas de arranque na indústria iniciou-se com a utilização de *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Staphylococcus* (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

A diversidade de produtos finais presentes no chouriço, e que vão influenciar o aroma e sabor do produto ficam a cargo da restante flora intrínseca do produto; da fermentação de outros substratos, como aminoácidos e ácidos gordos; e das reações secundárias dos produtos metabólicos, fora das células microbianas, com a matriz do alimento (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

Tem sido demonstrado que os enchidos produzidos com *starters* de *Lactobacillus* atingem um pH final mais baixo do que os produtos fabricados com *starters* de *Pediococcus* (Stahnke & Tjener, 2007).

Os *Staphylococcus* como *starters* são acidificadores fracos mas são responsáveis pelo desenvolvimento de reações que levam à aquisição de sabor e aroma característicos no produto. As espécies de *Staphylococcus* utilizadas como culturas de arranque ganham vantagem em relação às LAB na medida em que têm a capacidade de reduzir o nitrato a nitrito, e assim contribuem para a formação da cor rosea dourada no produto. De acordo com Cocconcelli (2007), os *Staphylococcus* coagulase negativos têm também capacidade antioxidante. Os *starters* de *Staphylococcus* mais utilizados na Europa são os das espécies *S. xylosus* e *S. carnosus* (Cocconcelli, 2007; Lebert *et al.*, 2007; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

A utilização de bolores e leveduras como *starters* tem sido estudada, em algumas regiões do sul da Europa (não em Portugal), uma vez que têm a capacidade de melhorar a aparência (nomeadamente na cor) e sabor dos produtos cárneos. Estes *starters* podem ainda metabolizar mais o lactato, porém, um decréscimo muito acentuado do valor de a_w compromete fermentações futuras. De acordo com Selgas & Garcia (2007), as espécies de leveduras *Debaryomyces*, *Pichia*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* demonstraram ter atividade lipolítica e proteolítica. *Debaryomyces hansenii* é a espécie de levedura com frequente utilização como *starter* e é bastante tolerante ao sal (Sunesen & Stahnke, 2003 ; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007; Selgas & Garcia, 2007; Stahnke & Tjener, 2007 ; Flores & Toldrá, 2011).

As leveduras crescem nos chouriços fermentados, uma vez que se desenvolvem bem nos valores comuns de pH e a_w destes produtos. Algumas espécies crescem favoravelmente tanto a pH de 4,0 como de 6,0 (Selgas & Garcia, 2007).

Relativamente aos bolores, diferentes espécies de *Penicillium* (como por exemplo, *P. nalgiovense* e *P. gladioli*) têm frequentemente sido consideradas como bons *starters*. Estes exercem atividade lipolítica e proteolítica e melhoram as características sensoriais dos enchidos secos fermentados (Spotti & Berni, 2007).

2.4.2. Secagem

A secagem é um método simples, e dos mais antigos, para conservação de alimentos, sendo a secagem efetuada ao sol, o método mais antigo e ainda hoje praticado na secagem de frutas. O processo de secagem, juntamente com a salga, levava à seleção natural de microrganismos e acabou por se desenvolver um processo tecnológico ao qual hoje denominamos fermentação. No início do século XVIII, de forma a acelerar o processo de secagem, passou a ser comum utilizar-se a fumagem, associada à secagem. Porém, a fumagem implica alterações significativas no sabor do produto alimentar (Andrés *et al.*, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Incze, 2007; Ordóñez & Hoz, 2007).

Hoje em dia a secagem é um método utilizado frequentemente na indústria alimentar com o intuito de preservar variados alimentos. Este método consiste na remoção de humidade dos produtos alimentares, a qual é evaporada por exposição do produto ao calor ou ao ar. O calor penetra no alimento, forçando a humidade a dirigir-se até à superfície, onde é evaporada (Andrés *et al.*, 2007).

Com a remoção de humidade há uma seleção natural dos microrganismos, levando à inibição do crescimento de bactérias e fungos, assim como um retardamento da ação enzimática. Consequentemente ocorre uma redução no volume e peso do produto (permitindo reduzir gastos a nível de armazenamento e transporte); e o produto fica menos suscetível de se alterar biologicamente, ou seja, de se deteriorar (Andrés *et al.*, 2007; Incze, 2007).

Em alguns casos, a secagem possibilita também que se desencadeiem reações bioquímicas, as quais vão ser responsáveis pelo desenvolvimento de determinados sabores e aromas. Estas reações ocorrem ao longo do tempo, pelo que se iniciam na secagem e prolongam-se para a fase de cura, principalmente em produtos cárneos de peça inteira sendo efetuada com uma mistura de ar e de fumo (fumagem) de forma a obter-se um sabor característico (Andrés *et al.*, 2007).

O tempo do processo de secagem é determinado em função de determinadas variáveis, as quais se encontram relacionadas com o ar de secagem (como temperatura, velocidade e humidade) e com o produto (humidade, tamanho e forma) (Andrés *et al.*, 2007).

Por norma o processo é efetuada a uma temperatura de aproximadamente 12 °C, humidade relativa entre os 75 e os 80% e é de duração variável, podendo ir de semanas a meses. Durante este processo o produto perde cerca de 30-49% do seu peso inicial, devido à evaporação da água (Tradisausage, 2006; Andrés *et al.*, 2007).

A taxa de secagem é tanto maior quanto maior for a temperatura do ar, mas se a remoção da água for muito rápida, corre-se o risco do produto alimentar ficar demasiado seco e duro. Uma vez que determinados componentes dos alimentos são sensíveis à temperatura, como é o caso de algumas vitaminas e pigmentos, são estes atributos de qualidade que se devem

considerar na determinação da temperatura máxima do ar a ser aplicado para a secagem do produto (Andrés *et al.*, 2007).

No final do processo de secagem, a a_w do produto deve ser inferior a 0,91, para que este seja considerado estável (Tradisausage, 2006).

No decorrer deste processo tecnológico os *Staphylococcus* e os fungos vão desenvolver compostos que vão influenciar o sabor e aroma do produto (Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

2.4.3. Fumagem

A fumagem é uma técnica utilizada há milhares de anos na preservação da carne ou de outros alimentos. Esta é conseguida através da redução da atividade da água (a_w) do alimento e pelo efeito bacteriostático (inibição do crescimento bacteriano) de substâncias presentes no fumo. O processo de fumagem tem sofrido uma grande evolução nas últimas décadas. A fumagem é um processo praticado em Portugal nos produtos cárneos, e que contribui para a redução da a_w . Este processo tem influência no produto, alterando-o a nível nutricional e sensorial contribuindo para aumento da segurança dos alimentos e tempo de vida útil (Andrés *et al.*, 2007; Elias *et al.*, 2006; Incze, 2007; Ordóñez & Hoz, 2007; Petäjä-Kanninem & Puolanne, 2007).

Uma mais valia da fumagem reside no facto dos componentes do fumo terem um intenso efeito fungistático (Chi & Wu, 2007). A dimensão das alterações qualitativas dos produtos alimentares pode depender do tipo (temperatura, humidade relativa, velocidade, composição do fumo e densidade) e tempo de fumagem (Andrés *et al.*, 2007).

No fabrico de chouriço tradicional Português é comum que a lenha produtora do fumo seja lenha de azinho (Elias *et al.*, 2006). A fumagem contribui para a aquisição do sabor característico do produto e para retardar o desenvolvimento de bactérias e fungos na superfície do chouriço (Ockerman & Basu, 2007).

Antigamente, o produto era exposto ao fumo no mesmo local onde era produzido. Assim o produto ficava diretamente exposto aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os quais penetram facilmente no produto alimentar. Hoje em dia já não é muito comum isso acontecer, uma vez que o local de produção do fumo é fisicamente separado do local onde o produto alimentício é exposto ao fumo. Durante o percurso do fumo entre as duas zonas, ele arrefece e perde grande parte dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Andrés *et al.*, 2007).

Existem duas formas de efetuar a fumagem tradicional, as quais se resumem na Tabela 6.

De acordo com Tradisausage, (2006), tradicionalmente a temperatura a que se deve efetuar a fumagem é de 20 °C e a humidade relativa deve rondar os 60% (Tradisausage, 2006).

Andrés *et al.*, (2007) afirmaram que o fumo utilizado na fumagem a frio é aromaticamente pobre (Andrés *et al.*, 2007).

A utilização de temperaturas elevadas diminui a tendência de endurecimento do produto, pois há um aumento da difusão da água no interior da carne e conseqüente migração para a superfície do produto, impedindo que esta fique dura. Porém a temperatura nunca pode ser demasiado elevada, uma vez que se desenvolvem características indesejáveis. Quando um produto cárneo é colocado a temperaturas entre os 40 e 80 °C, a matriz proteica começa a sofrer alterações significativas, o que faz com que a ocorra desnaturação proteica; com o aumento da temperatura pode ocorrer o efeito de fusão das gorduras, com conseqüente formação de uma barreira hidrofóbica no produto. Esta última situação é solucionada com o uso de gorduras com elevado ponto de fusão (Andrés *et al.*, 2007).

Tabela 6 – Diferenças entre os dois tipos de fumagem tradicional (Andrés *et al.*, 2007).

Fatores	Tipo de fumagem tradicional	
	Fumagem a frio	Fumagem a quente
Temperatura do fumo (°C)	20-25	75-80
Humidade relativa (%)	70-80%	Elevada
Duração	Dias a semanas	Horas

2.5. Inovações tecnológicas aplicadas aos enchidos portugueses

Tal como descrito no ponto 2.4., apesar da aplicação de diversas *hurdle technology* aquando da produção do chouriço tradicional Português, é ainda comum o desenvolvimento de fungos sobre a sua superfície.

Dentro do conceito de tecnologia de barreiras de proteção, o uso de revestimentos ativos comestíveis (uma tecnologia inovadora) poderá contribuir para a diminuição do desenvolvimento fúngico à superfície do referido produto alimentar, e assim aumentar a segurança e vida útil do mesmo (Botrel & Fontes, 2007).

2.5.1. Embalagens ativas

O embalamento primário dos produtos cárneos é normalmente realizado com um filme de plástico, o qual, por estar diretamente em contacto com o alimento, tem de garantir que este mantenha as devidas características durante todo o processo de distribuição, protegendo-o e preservando-o, retardando ou impedindo a deterioração do alimento durante o manuseamento, transporte e armazenamento. Para os produtos cárneos fermentados é comum que o embalamento seja feito a vácuo ou em atmosfera modificada (MAP) (Ahn & Min, 2007).

Estas embalagens têm a capacidade de proteger os alimentos de contaminação por microrganismos; ser barreira ao oxigénio e ao vapor de água, assim como minimizar a transferência de calor e luz e assim evitar o desenvolvimento de diversas reações (como é

exemplo a oxidação lipídica); prevenir danos físicos exercidos por uma força externa, mantendo assim a qualidade do produto e consequentemente aumentando o seu tempo de vida útil (Ahn & Min, 2007; Liu, Kerry & Kerry, 2007).

Os consumidores têm-se demonstrado cada vez mais informados e preocupados com questões de qualidade e segurança alimentar, não colocando de parte as questões ambientais, sendo então cada vez mais exigentes a este nível. Eles têm preferência por alimentos isentos de substâncias químicas e por aqueles que são enriquecidos com substâncias naturais (como antimicrobianos ou antioxidantes) (Shahidi, Arachchi & Jeon, 1999 ; Cleveland & Chikindas, 2001; Mecitoğlu *et al.*, 2006 ; Falguera *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2011; Song, Liu, Shen, You & Luo, 2011).

Posto isto, a indústria alimentar tenta responder da melhor forma, e as respostas muitas vezes são dadas através do desenvolvimento de alternativas viáveis (do ponto de vista económico e da eficácia desejada) que garantam uma melhor satisfação por parte dos consumidores. Foram então desenvolvidas as chamadas embalagens ativas, as quais foram criadas para responder às referidas necessidades, e são um conceito inovador de embalagem (Quintavalla & Vicini, 2002 ; Ahn & Min, 2007; Liu *et al.*, 2007; Silva, Bierhalz & Kieckbusch, 2009; Soares *et al.*, 2009 ; Aider, 2010; Fajardo *et al.*, 2010; Mastromatteo *et al.*, 2010 ; Falguera *et al.*, 2011).

Enquanto as embalagens tradicionais são sintéticas e consequentemente não biodegradáveis, a grande parte das embalagens ativas utilizam biopolímeros naturais como substratos, os quais são biodegradáveis, evitando-se então problemas a nível ambiental (Hambleton, Debeaufort, Bonnotte & Voilley, 2009 ; Fajardo *et al.*, 2010).

As embalagens ativas interagem de forma intencional com o alimento, levando a que este melhore algumas das suas características. De acordo com Kerry (2006), as embalagens ativas são definidas como uma embalagem que altera o estado dos alimentos embalados para aumentar a vida útil do produto ou melhorar a segurança ou propriedades sensoriais na manutenção da qualidade do produto embalado. Estes sistemas de embalagens têm incorporado determinados aditivos de forma a manter ou aumentar a qualidade do produto e tempo de vida útil (Kerry *et al.*, 2006).

As referidas embalagens têm vindo a ser utilizadas como uma tecnologia promissora, e o seu modo de ação passa pela introdução de determinados aditivos numa película da embalagem ou dentro do recipiente da mesma, que por interação com o espaço livre existente no interior da embalagem ou com o alimento, permitem aumentar o tempo de vida útil, melhorar as características sensoriais, evitar as deteriorações químicas e microbiológicas e garantir a segurança e qualidade do produto alimentar. Tal facto é conseguido por inibição do crescimento de microrganismos patogénicos, havendo consequentemente um aumento da estabilidade dos alimentos durante o seu tempo de

armazenamento (Quintavalla & Vicini, 2002; Ho Lee *et al.*, 2004; Ahn & Min, 2007; Liu *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2009).

O interesse pela utilização deste tipo de embalagens tem tido um crescente interesse no que respeita à sua utilização em produtos cárneos, visto serem produtos perecíveis (Kerry *et al.*, 2006).

Existem diversos sistemas de embalagens ativas, de entre as quais se destacam as antimicrobianas, antioxidantes e aromáticas. No entanto as investigações têm incidido nas embalagens com incorporação de agentes antimicrobianos (Coma, 2008; Lian, Ma, Wei & Liu, 2012).

Relativamente a legislação, o Regulamento nº 1935/2004 autoriza a utilização de embalagens ativas com libertação intencional de agentes ativos (Regulamento nº1935/2004).

2.5.1.1. Embalagens antimicrobianas

O interesse nas embalagens antimicrobianas tem vindo a aumentar consideravelmente, uma vez que estes sistemas têm a capacidade de controlar a deterioração microbiana de produtos alimentares, por redução da fase logarítmica de crescimento dos microrganismos, evitando assim a rápida perda de qualidade e consequente diminuição do tempo de vida útil (Kerry *et al.*, 2006; Mastromatteo *et al.*, 2010).

Este tipo de embalagem são as que mais atenções têm tido por parte da investigação, durante os últimos anos. Caracterizaram-se por apresentarem um agente antimicrobiano incorporado e/ou imobilizado no material constituinte da embalagem, adquirindo então a capacidade de eliminar ou inibir microrganismos deteriorativos, incluindo patogénicos, e assim aumentar o tempo de vida útil dos produtos (Coma, 2008; Guiga *et al.*, 2010; Lian *et al.*, 2012). Segundo Quintavalla & Vicini (2002), este é um tipo de embalagem que poderá ter um impacto significativo no aumento da vida útil e segurança da carne e de produtos à base de carne, uma vez que a contaminação microbiana destes alimentos ocorre principalmente na superfície, devido à manipulação e pós-processamento. Mais recentemente, Aider (2010) afirmou que as embalagens antimicrobianas são bastante promissoras na melhoria da qualidade e preservação dos alimentos, durante o armazenamento (Quintavalla & Vicini, 2002; Ahn & Min, 2007 ; Rojas-Graü, Tapia, Rodríguez, Carmona & Martin-Belloso, 2007 ; Coma, 2008; Aider, 2010; Lian *et al.*, 2012). Kerry *et al.* (2006) consideraram que estas embalagens ativas são mais promissoras para uso futuro em produtos cárneos (Kerry *et al.*, 2006).

Os agentes antimicrobianos utilizados nas embalagens ativas são agentes que inibem o crescimento de determinados microrganismos alvo, proporcionando uma maior segurança e qualidade dos produtos. Eles podem ser incorporados nos alimentos durante a preparação destes, ou aplicados na superfície do produto, através de um revestimento, o qual possui o

antimicrobiano imobilizado (Ahn & Min, 2007; Guiga *et al.*, 2010). Em ambos os casos a eficiência do agente é limitada, pois a atividade antimicrobiana é rapidamente perdida como resultado da diminuição da concentração do agente, o qual interage com componentes do alimento, ficando então a substância ativa neutralizada. Como exemplos de agentes antimicrobianos temos o sal utilizado na cozinha (cloreto de sódio); ácidos orgânicos, p. ex. acetato de sódio (utilizados como agentes antimicrobianos em alimentos com pH baixo); polissacarídeos (p. ex. quitosano); péptidos antimicrobianos (p. ex. natamicina e nisina – bacteriocinas utilizadas para inibir o crescimento de fungos e bactérias, respetivamente); nitritos e nitratos (inibem o crescimento de *Clostridium botulinum* em alimentos que contenham carne crua); óleos essenciais; enzimas, entre outros. Contudo, devido a questões ambientais e de saúde, o interesse na utilização de agentes naturais, como as bacteriocinas, tem vindo a aumentar (Qualfood, 2011; Ahn & Min, 2007; Coma, 2008; Güçbilmez, Yemenicioğlu & Arslanoğlu, 2007; Guiga *et al.*, 2010; Lian *et al.*, 2012; Quintavalla & Vicini, 2002).

Os péptidos antimicrobianos naturais são produzidos por determinadas espécies eucariotas ou bactérias (e neste caso denominam-se por bacteriocinas) como defesa contra outros microrganismos ou infeções, tendo normalmente como mecanismo de ação a permeabilização da membrana da célula alvo. Determinadas bacteriocinas foram estudadas e determinadas como viáveis para aplicar em alimentos com o intuito de garantir a sua segurança alimentar microbiológica (Cleveland & Chikindas, 2001). No entanto, de acordo com Mastromatteo *et al.* (2010), a adição direta dos compostos ativos sobre a superfície do alimento pode levar a neutralização ou a uma rápida difusão para o interior do género alimentício. Assim, a solução passa por incorporar o agente ativo na matriz de um polímero (Mastromatteo, Mastromatteo, Conte & Del Nobile, 2010).

Para a conceção destas embalagens é importante ter em consideração alguns fatores, tais como as características do agente antimicrobiano, o coeficiente de transferência de massa, propriedades físicas dos materiais de embalagem e temperatura de armazenamento (Quintavalla & Vicini, 2002 ; Ahn & Min, 2007).

2.5.1.2. Embalagens antioxidantes

A oxidação de alguns géneros alimentícios é uma preocupação no que respeita à qualidade do produto. As embalagens antioxidantes caracterizam-se pela incorporação de substâncias antioxidantes em filmes plásticos (no papel constituinte das embalagens ou em pequenos sacos colocados dentro da embalagem). Posteriormente, é a partir destes filmes que serão libertadas as substâncias antioxidantes para proteger os alimentos da degradação oxidativa, inibindo as reações de oxidação ao reagirem com radicais livres e peróxidos e, conseqüentemente, aumentando a sua vida útil (Güçbilmez *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2009).

Segundo citado por Ho Lee *et al.* (2004), estas embalagens podem retardar as alterações oxidativas nos alimentos embalados que contenham componentes lipídicos (Ho Lee *et al.*, 2004).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados para aplicação em embalagens são o Butil-hidroxi-anisolo (BHA) e o Butil-hidroxi-tolueno (BHT), enquanto que entre os antioxidantes naturais se encontram compostos fenólicos e vitaminas C e E (Güçbilmez *et al.*, 2007).

2.5.1.3. Embalagens aromáticas

Estas embalagens são produzidas pela incorporação de aromas voláteis na matriz polimérica, o que influencia de forma positiva a qualidade organoléptica do produto. A sua utilização tem por base melhorar o odor e sabor dos produtos, conquistando deste modo a preferência dos consumidores (Soares *et al.*, 2009). Quando os aromas voláteis são aplicados em filmes comestíveis, o objetivo depreende-se pela libertação gradual de compostos aromáticos, o que conduz à manutenção do sabor característico do produto alimentar (Marcuzzo, Sensidoni, Debeaufort & Voilley, 2010).

2.5.2. Revestimentos ativos

Na última década têm sido desenvolvidos e utilizados revestimentos comestíveis com o objetivo de evitar ou retardar a deterioração de determinados alimentos, representando já um dos mais importantes métodos utilizados para preservar a qualidade de géneros alimentícios (López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos & Montero, 2005; Vu, Hollingsworth, Leroux, Salmieri & Lacroix, 2011).

Durante os últimos anos, devido à procura pela utilização de materiais de embalagem renováveis, muita tem sido a aposta da investigação no desenvolvimento de filmes e revestimentos biodegradáveis e comestíveis. A indústria alimentar tem vindo a demonstrar um interesse crescente na utilização de filmes/revestimentos comestíveis, afim de melhorar a segurança e o tempo de vida útil do produto, e muitas vezes consideram-nos como embalagens ativas. Uma vez que a contaminação microbiológica dos alimentos ocorre principalmente na superfície, a aplicação dos revestimentos torna-se uma boa tecnologia de conservação (Shahidi *et al.*, 1999 ; Fernandez-Saiz, Lagaron, Hernandez-Munoz & Ocio, 2008; Hambleton *et al.*, 2009; Marcuzzo *et al.*, 2010; Pintado, Ferreira & Sousa, 2010 ; Lian *et al.*, 2012).

Estes revestimentos, preparados a partir de polissacarídeos, proteínas ou lípidos, têm a vantagem de serem biodegradáveis, biocompatíveis, comestíveis, e de terem propriedades barreira contra o oxigénio (Kerry *et al.*, 2006; Vu *et al.*, 2011).

O uso de revestimentos pode constituir um meio de incorporação tecnológica de um agente ativo. São aplicados na superfície de um alimento, com a vantagem de poderem ser consumidos sem riscos para o consumidor. De acordo com Gennadios *et al.* (1997) (citado

por Coma, 2008) os revestimentos comestíveis podem reduzir a perda de humidade, de oxidação lipídica e de descoloração do alimento (Coma, 2008).

Os revestimentos ativos comestíveis são normalmente aplicados em camadas finas, na sua forma líquida, sobre a superfície do alimento, adquirindo então a forma do produto. O intuito da aplicação de revestimentos passa pela redução da perda de vapor de água, da migração de lípidos e aroma, assim como pela formação de uma barreira semipermeável ao oxigénio e pela estabilização dos gradientes de atividade de água, mantendo deste modo as propriedades de textura (Giancone *et al.*, 2008 ; Fajardo *et al.*, 2010; Marcuzzo *et al.*, 2010; Falguera *et al.*, 2011).

Segundo Soares *et al.* (2009) estes revestimentos podem atuar no controlo do crescimento de microrganismos. Assim os revestimentos têm um importante papel na conservação do produto alimentar. A sua aplicação é realizada de acordo com alguns fatores tais como: disponibilidade, custo, propriedades óticas (opacidade/brilho); propriedades mecânicas (força e flexibilidade); permeabilidade a gases; resistência a microrganismos; aceitação sensorial, entre outros; os quais variam de acordo com a matriz estrutural, condições de fabrico do revestimento e concentrações dos diferentes componentes (Silva *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2009; Falguera *et al.*, 2011).

É importante referir que, um revestimento ativo, não é um filme ativo. Os revestimentos são aplicados na sua forma líquida e adquirem a forma do produto ao solidificar, e o filme é pré-formado antes de colocado (já sólido) sobre o produto, moldando-se a este. Ambos têm inovado o conceito de embalagens ativas e têm sido desenvolvidos para controlar (diminuir/inibir) o desenvolvimento de microrganismos na superfície dos géneros alimentícios (Appendini & Hotchkiss, 2002; Falguera *et al.*, 2011).

Geralmente, os revestimentos comestíveis são classificados de acordo com o material que integra a sua estrutura, ou seja, a matriz estrutural. Normalmente a base dos revestimentos são biomoléculas: proteínas (por exemplo, glúten de trigo ou proteína de soja), lípidos, polissacarídeos (alginatos ou quitosano, por exemplo) ou um composto. Um revestimento composto pode ser constituído por lípidos e hidrocolóides combinados para formar uma bicamada ou um *cluster*. Muitas vezes a formação destes revestimentos compostos são efetuados com o objetivo de utilizar as diferentes propriedades de cada composto, assim como o efeito sinérgico que possa eventualmente existir entre eles (Quintavalla & Vicini, 2002; Silva *et al.*, 2009 ; Marcuzzo *et al.*, 2010 ; Falguera *et al.*, 2011 ; Arzate-Vázquez *et al.*, 2012).

Os hidrocolóides (proteínas e polissacarídeos) são os biopolímeros que mais têm sido utilizados no desenvolvimento de revestimentos ativos comestíveis, uma vez que demonstram ter boas propriedades estruturais e mecânicas (boa barreira ao oxigénio, por exemplo). Os revestimentos desenvolvidos em matrizes de polissacarídeos têm sido

bastante testadas para aplicação em frutas e vegetais, de modo a aumentar o tempo de vida útil destes produtos (Rojas-Graü *et al.*, 2007 ; Hambleton *et al.*, 2009; Falguera *et al.*, 2011). No geral, os revestimentos comestíveis têm, entres outras, duas grandes vantagens: serem biodegradáveis e comestíveis. Aquando da aplicação destes revestimentos há que ter rigor na escolha do agente ativo a incorporar no revestimento, o qual deve ser legalmente seguro e comestível (Quintavalla & Vicini, 2002).

Segundo Aider (2010), um dos revestimentos ativos com maiores perspectivas são os de quitosano com incorporação de proteínas, polissacarídeos ou péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) (Aider, 2010). Kong *et al.*, (2010) refere também que têm sido testados filmes/revestimentos comestíveis com base em quitosano (Kong, Chen, Xing & Park, 2010).

Os estudos realizados com revestimentos ativos têm demonstrado que existe um grande potencial na manutenção ou aumento do tempo de vida útil de alimentos (de origem vegetal ou animal) com a utilização de revestimentos incorporados com agentes ativos. Estes agentes, dependendo da sua natureza, quando em contacto com o alimento podem desempenhar funções específicas, tais como: antioxidante, antimicrobiana, corante, aromática, entre outras (Rojas-Graü *et al.*, 2007; Hambleton *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2009). Deste modo, como exemplos de agentes antioxidantes que têm sido incorporados em revestimentos ativos temos: ácido ascórbico; ácido cítrico; ácido cafeico e N-acetilcisteína (Soares *et al.*, 2009). No que respeita a agentes antimicrobianos incorporados em filmes e revestimentos ativos temos: ácidos orgânicos (p.ex. ácido láctico e acético) e seus sais; sulfitos; nitritos; antibióticos; álcoois; enzimas; óleos essenciais e bacteriocinas, das quais fazem parte a nisina (Soares *et al.*, 2009 ; Guiga *et al.*, 2010 ; Vu *et al.*, 2011 ; Bierhalz, da Silva & Kieckbusch, 2012; Ramos *et al.*, 2012).

O revestimento serve como veículo de transporte do composto antimicrobiano, permitindo a manutenção de uma elevada concentração do antimicrobiano na superfície do produto alimentar (Coma, 2008). A velocidade de libertação do agente ativo, a partir da matriz do revestimento para o alimento, é um fator importante. Este deve ser conhecido e controlado, uma vez que uma libertação demasiado rápida pode proporcionar a transferência do agente ativo para o interior do produto alimentar ficando assim comprometida a proteção da superfície, o que leva a que o produto se possa deteriorar; e uma transferência muito baixa pode não ser a suficiente para inibir as reações enzimáticas e/ou desenvolvimentos microbiológicos indesejáveis (Bierhalz *et al.*, 2012).

De acordo com Quintavalla & Vicini (2002), os revestimentos comestíveis antioxidantes e antimicrobianos podem ser utilizados na superfície de carne e produtos cárneos (Quintavalla & Vicini, 2002).

Algumas vantagens do uso de revestimentos ativos comestíveis em carne e produtos cárneos passam por reduzir a perda de humidade durante o armazenamento de carnes congeladas; manter a suculência da carne fresca; reduzir as reações de oxidação lipídica;

reduzir o nível de deterioração e a carga de microrganismos patogênicos na superfície das carnes; e limitar a perda de sabores voláteis (Quintavalla & Vicini, 2002).

Assim, a utilização de revestimentos comestíveis com incorporação de um agente ativo antioxidante ou antimicrobiano poderá ser usado para tratamento direto de superfícies de carnes e produtos derivados destas (Quintavalla & Vicini, 2002; Coma, 2008).

Existem outros tipos de revestimentos (não desenvolvidos com base na incorporação em péptidos antimicrobianos), como é o caso dos revestimentos à base de óleos essenciais. Estes têm sido desenvolvidos com diferentes óleos essenciais, de que são exemplo os extraídos da canela e o alho, imobilizados na matriz de um biopolímero (como quitosano e alginato). Para Glinel, Thebault, Humblot, Pradier & Jouenne (2012), o objetivo passou pela preparação de um revestimento comestível a aplicar em fruta e assim prolongar o seu tempo de vida útil, por inibição do desenvolvimento microbiano que se encontra na superfície do alimento, ou seja, por desenvolvimento de uma atividade antimicrobiana (Glinel, Thebault, Humblot, Pradier & Jouenne, 2012).

2.5.2.1. Péptidos antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos podem ser produzidos por microrganismos, vegetais, insetos, mamíferos, peixes e anfíbios, com o intuito de se protegerem contra a ação de diferentes microrganismos, como bactérias, protozoários e fungos. Essa defesa é conseguida na medida em que os referidos péptidos permeabilizam membranas e podem agir especificamente contra microrganismos patogênicos (bactérias e fungos) (Glinel *et al.*, 2012).

Esta é uma área que tem sido bastante investigada. Na última década foram caracterizados mais de 800 péptidos antimicrobianos, os quais provêm de variadas espécies eucariotas. A maioria destes péptidos é catiónica, podendo ser agrupados em quatro grupos: péptidos lineares helicoidais; péptidos modificados por adição de outros aminoácidos; péptidos com uma ponte de dissulfeto e péptidos com duas ou mais pontes de dissulfeto (Glinel *et al.*, 2012).

Os péptidos bioativos podem ser produzidos durante o processamento da carne, por exemplo durante a fermentação e hidrólise (Khan *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação bactericida que predomina entre os péptidos passa pela perturbação da integridade da membrana celular, sendo a rutura efetuada através de variados mecanismos de ação (Glinel *et al.*, 2012).

O largo espectro de atividade, a rapidez de atuação e o baixo nível de resistência que provocam são apenas três das vantagens dos péptidos antimicrobianos. Em contrapartida temos como desvantagens a suscetibilidade à proteólise e ao pH, e uma possível toxicidade local (Glinel *et al.*, 2012).

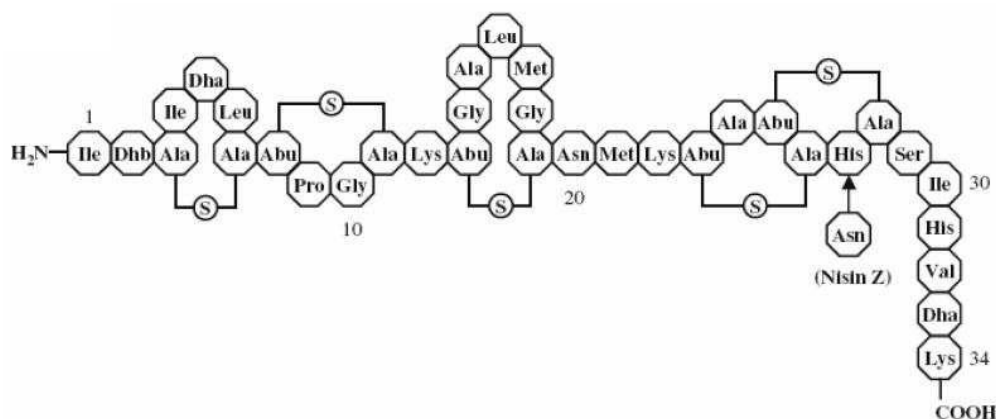
O quitosano é um agente antimicrobiano bastante utilizado na incorporação de revestimentos ativos (López-Caballero *et al.*, 2005).

2.5.2.1.1. Nisina

A nisina, um péptido antimicrobiano com fórmula química $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ e massa molecular de 3354,12 g/mol, é definido pelo Decreto-Lei nº 94/2010 como sendo um composto antimicrobiano “constituído por diversos polipéptidos afins produzidos durante a fermentação de um meio de leite ou de açúcar por determinadas estirpes naturais de *Streptococos lactis*, subespécie *lactis*”. O *Streptococos lactis* é atualmente denominado por *Lactococcus lactis*. Em 1969, a nisina foi reconhecida como aditivo alimentar pela FAO/OMS (Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde), e foi-lhe atribuído o número E234, fazendo parte integrante da lista de aditivos alimentares autorizados na União Europeia, e pertence ao grupo dos conservantes (ASAE, 2011). É utilizado como conservante, sem uso terapêutico, e é geralmente conhecido apenas como um agente antimicrobiano, no entanto, este caracteriza-se também por ser uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* sendo então a única bacteriocina aprovada e autorizada pela FDA (Food and Drug Administration) para uso como aditivo alimentar (Cleveland & Chikindas, 2001 ; Roller & Fletcher, 2002 ; Ho Lee *et al.*, 2004 ;EFSA, 2006; Millette *et al.*, 2007; Coma, 2008 ; Piper, Cotter, Ross & Hill, 2009 ; Decreto-Lei nº94/2010; Guiga *et al.*, 2010; Lu, Ding, Ye & Liu, 2010).

Em 2001 este péptido natural e catiónico foi aceite como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, como sendo um produto geralmente reconhecido como seguro, para uso como antimicrobiano em carne cozida e produtos avícolas (Ho Lee *et al.*, 2004; EFSA, 2006; Millette *et al.*, 2007; Coma, 2008; Lu *et al.*, 2010; Pintado *et al.*, 2010)

Figura 2 – Fórmula estrutural da nisina A, com representação da substituição da His27 por Asn27 para a nisina Z (EFSA, 2006).



Há duas variantes de nisina, a nisina A e a nisina Z, as quais diferem apenas no resíduo de aminoácido da posição 27, onde na nisina A se encontra a histidina e na nisina Z a asparagina, tal como podemos verificar pela Figura 2 (EFSA, 2006; Piper *et al.*, 2009).

De acordo com EFSA (2006) a nisina é um grupo de polipéptidos composto por 34 aminoácidos e possui um estreito espectro de atividade. É solúvel em compostos polares, como a água, e praticamente insolúvel em compostos apolares (EFSA, 2006).

Millette *et al.*, (2007) afirmaram que este polipéptido é ligeiramente insolúvel em água, devido à sua natureza hidrofóbica, e que perde a sua eficácia quando o pH é superior a 5,0. A temperaturas baixas a nisina é estável e pode ser utilizada para conservar carne, tal como referenciado por Siragusa *et al.*, 1999 (citado por Millette *et al.*, 2007).

O modo de ação da nisina pode ser efetuado de duas formas, quer por inibição da síntese da parede celular (inibe a biossíntese de peptidoglicano – essencial na parede celular), como pela formação de poros na membrana citoplasmáticas. A nisina estabelece cinco ligações de hidrogénio intramoleculares, entre o seu terminal amina e o pirofosfato do lípido II. O lípido II é um precursor essencial na biossíntese da parede celular, pelo que ao estabelecer ligação com a nisina vai permitir que esta seja “transportada” até a um local de síntese de uma parede celular bacteriana, dificultando então a formação desta. Por outro lado, a ligação da nisina ao precursor pode facilitar o processo de formação de poros na membrana citoplasmática, possibilitando assim a passagem de iões e metabolitos e consequente morte da célula (EFSA, 2006; Millette *et al.*, 2007; Coma, 2008; Tai, McGuire & Neff, 2008 ; Azeredo, 2009; Piper *et al.*, 2009 ; Kopermsub, Mayen & Warin, 2011).

A atividade da nisina é direcionada principalmente às células vegetativas e esporos de bactérias gram-positivas, não sendo comum inibir bactérias gram-negativas, a menos que esteja associada a um agente quelante (como o EDTA) e aí a sua ação contra gram-negativas pode aumentar. Supõe-se que seja devido à dificuldade em atravessar a membrana externa, e assim chegar à membrana interna onde se encontra o lípido II. As bactérias que se caracterizam por terem sensibilidade à nisina são as LAB, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* e *Streptococos*. Quando a aplicação da nisina é efetuada sem a presença de outros métodos de preservação (como baixo pH e elevadas concentrações de sal), a nisina geralmente não inibe bactérias gram-negativas ou fungos, caso contrário existe um efeito sinérgico. Porém, a condição da nisina não afetar as bactérias gram-negativas nem sempre se verifica, e a nisina, na sua forma purificada, pode também apresentar inibição sobre algumas bactérias gram-negativas, como é o caso da *Escherichia coli* (Nykänen, Weckman & Lapveteläinen, 2000 ; Roller & Fletcher, 2002 ; EFSA, 2006; Coma, 2008; Tai *et al.*, 2008 ; Piper *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2010; Pintado *et al.*, 2010 ;Kopermsub *et al.*, 2011).

De acordo com Pintado *et al.*, (2010), a nisina apresenta pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, leveduras e bolores (Pintado *et al.*, 2010).

As bactérias do ácido láctico (LAB) são frequentemente encontradas em produtos fermentados, incluindo os produtos cárneos. Para além da produção de diversos compostos como CO₂, etanol, ácido láctico e acético, estas bactérias têm um grande potencial no controlo do crescimento de bactérias patogénicas, uma vez que têm capacidade para produzir metabolitos com propriedades antimicrobianas, as bacteriocinas, as quais têm a capacidade de inibir ou destruir microrganismos alvo. Assim, a nisina está presente em alimentos que contenham LAB, quer como microflora intrínseca ou como *starter* diretamente adicionado (EFSA, 2006; Millette *et al.*, 2007).

A referida bacteriocina tem sido bastante utilizado na indústria farmacêutica e alimentar (como conservante), tanto em lacticínios como no processamento de determinados produtos cárneos, com a função primordial de inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*, pois este composto possui uma atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos gram-positivos, incluindo patogénicos. Porém não se conhecem as interações estabelecidas entre o antimicrobiano e os componentes alimentares (Roller & Fletcher, 2002; Coma, 2008; Piper *et al.*, 2009; Decreto-Lei nº 94/2010; Kopermsub *et al.*, 2011).

A eficácia da nisina como agente antimicrobiano e bacteriocina depende de variados fatores, entre os quais se encontram o teor de sal e de gordura do alimento, o valor de pH, a presença de conservantes e o tamanho das partículas dos alimentos (Millette *et al.*, 2007; Coma, 2008; Guiga *et al.*, 2010).

Duas considerações importantes para o uso da nisina são a sua solubilidade e estabilidade. A nisina é mais estável em condições ácidas e é solúvel em meios aquosos. Em relação à solubilidade, esta é de 12% aquando de um pH de 2,5 e de apenas 4% a um pH de 5,0. Se o pH se registar neutro, aí a solubilidade é muito reduzida (EFSA, 2006).

Tal como acontece com a natamicina, a nisina não causa problemas em relação ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana por parte do homem, sendo então utilizado como conservante alimentar. É caracterizado por ser resistente ao calor e a pH ácido, assim como por ser inativada por enzimas do trato digestivo, não causando qualquer efeito na microflora intestinal.

A um valor de pH de 8,0 e a uma temperatura de 37 °C, a nisina é facilmente inativada pela pancreatina (EFSA, 2006).

De acordo com a Diretiva 95/2/CE da Comissão Europeia, a utilização de nisina, como conservante alimentar, é permitida de ser aplicada em: pudins de semolina e tapioca e produtos similares (teor máximo de 3 mg/kg); queijos curados e queijos fundidos (teor máximo de 12,5 mg/kg); *Clotted cream* (teor máximo de 10 mg/kg) e *Mascarpone* (teor máximo de 10 mg/kg).

O *Scientific Committee on Food* (SCF) afirmou que a nisina pode ser utilizada com segurança e estabeleceu uma DDA de 0,13 mg/Kg pc (EFSA, 2006; ASAE, 2011).

A nisina não demonstrou atividade mutagénica nem genotóxica. Não há registo de incidência de tumores, pelo que não é considerado cancerígeno (EFSA,2006).

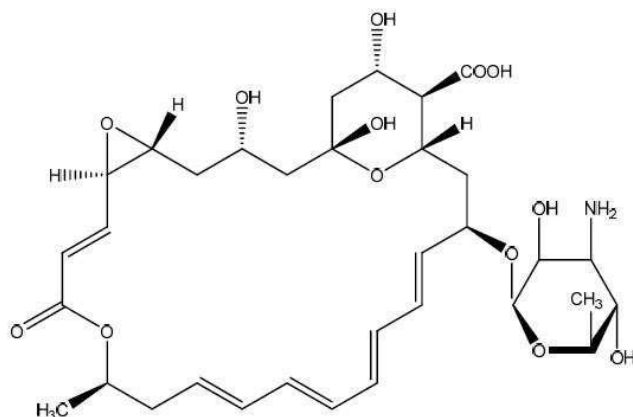
De acordo com Roller & Fletcher (2002), nos últimos anos foi testada a aplicação de bacteriocinas em produtos cárneos, incluindo produtos fermentados, as quais demonstraram inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* (Roller & Fletcher, 2002).

2.5.2.1.2. Natamicina

A natamicina ($C_{33}H_{47}O_{13}N$), também conhecida por pimaricina, Figura 3, é por definição “um fungicida do grupo dos macrólidos poliénicos produzido por estirpes naturais de *Streptomyces natalensis* ou por estirpes naturais de *Streptococcus lactis*”, sendo produzida por *Streptomyces nateiensis*, ou outras espécies, durante a fermentação aeróbia.

Este fungicida é um agente ativo antimicrobiano, tem uma massa molecular de 665,74 g/mol e a sua estrutura primária consiste num anel de lactona, com 25 átomos de carbono, tal como apresentado na Figura 3. O antimicrobiano apresenta uma baixa solubilidade em água, de 20 a 50 mg/L. Solubiliza-se em determinados solventes, como são exemplo o ácido acético glacial, dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, e é insolúvel em cetonas, éteres e esterres, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, entre outros (Diretiva 2008/84/CE; EFSA, 2009; Bierhalz *et al.*, 2012).

Figura 3 – Estrutura química da natamicina (EFSA, 2009).



A natamicina é um aditivo alimentar, pelo que faz parte do grupo dos conservantes da lista de aditivos alimentares autorizados na União Europeia e está aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América para aplicação na superfície de queijos e fatias do mesmo, numa solução líquida que contenha o aditivo numa concentração compreendida entre 200 a 300µL/L (Cong *et al.*, 2007 ; EFSA, 2009; ASAE, 2011; Bierhalz *et al.*, 2012).

Na Diretiva 95/2/CE da Comissão Europeia, a qual se refere aos aditivos alimentares com exceção dos corantes e edulcorantes, encontra-se mencionado que o uso de natamicina é permitido para tratamento de superfície de: queijos de pasta dura e semidura, e enchidos

secos ou curados. Com uma limitação no teor máximo a ser aplicado, o qual é de 1 mg/dm² de superfície (ausente a 5 mm de profundidade).

A natamicina tem a particularidade de permanecer na superfície dos produtos nos quais é aplicada e de não depender de um pH baixo para exercer a sua atividade antimicrobiana (Hondrodinou, Kourkoutas & Panagou, 2011).

Ramos *et al.*, (2012) afirmam que a natamicina é reconhecida como GRAS pela FDA. Estes autores relataram que a incorporação de natamicina em filmes comestíveis produzidos por proteínas isoladas do soro de leite, juntamente com ácido láctico e ácido propiônico, não afetaram a aparência do produto alimentar (Ramos *et al.*, 2012).

Este polieno natural e antimicótico possui uma atividade *in vitro* contra variadas leveduras e fungos filamentosos. Assim, este conservante antifúngico tem sido bastante utilizado na indústria alimentar, em produtos lácticos e cárneos (especialmente em queijos e enchidos) e fruta de forma a controlar a sua deterioração por parte dos fungos, impedindo-os de se desenvolverem. A eficácia do conservante tende a ser maior em concentrações entre 1 e 10mg/Kg, e as leveduras costumam ter uma maior sensibilidade à natamicina do que os bolores (Cong *et al.*, 2007 ; Diretiva 2008/84; EFSA, 2009; Pintado *et al.*, 2010 ; Bierhalz *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2012).

Segundo Hondrodinou *et al.* (2011), a natamicina tem um largo espectro de atividade contra a deterioração dos alimentos causada por fungos e é considerado ser um produto estável e eficaz contra *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium commune*, *Penicillium verrucosum*, *Byssochlamys nivea*, entre outros. Cong *et al.* (2007) determinaram uma concentração mínima inibitória (MIC) da natamicina para *Alternaria alternate* e *Fusarium semitectumby* se fixava nos 20 mg/L (Cong *et al.*, 2007; Hondrodinou *et al.*, 2011).

O facto de a natamicina ter um mecanismo de ação contra fungos e as bactérias serem-lhe resistentes, relaciona-se com a existência de ergosterol, o principal esterol presente na membrana celular dos fungos e que não está presente na membrana das bactérias. As bactérias são tão resistentes à ação do antimicrobiano que a sua concentração mínima inibitória (MIC) é superior a 250 mg/L. A natamicina, por ser um antibiótico polieno, tem a capacidade de surtir uma ação vinculativa sobre os esteróis, ligando-se então ao ergosterol e inviabilizando a membrana celular do fungo, alterando da sua permeabilidade através da formação de poros que vão permitir a passagem de pequenos iões (tais como K⁺ e H⁺), aminoácidos e outros metabolitos. Havendo morte celular (Cong *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2012).

As membranas celulares dos animais também possuem esteróis na sua constituição, sendo o colesterol o maior de entre eles. No entanto a especificidade da natamicina para com o

colesterol é muito menor do que com o ergosterol, não existindo então risco de ação da natamicina sobre as células humanas.

De acordo com Fajardo *et al.*, (2010) a natamicina tem a capacidade de proteger a superfície de queijos contra o desenvolvimento de fungos. Porém, a aplicação direta deste agente antifúngico por si só, no alimento, sem a sua imobilização numa matriz pode levar a uma inativação parcial do agente ativo ou a uma rápida difusão para o interior do produto alimentar. Deste modo, a utilização de revestimentos com base em polímeros antimicrobianos para imobilização do agente ativo, tem-se revelado mais eficiente, uma vez que fica controlada a migração da natamicina a partir da matriz do revestimento (Fajardo *et al.*, 2010).

Labadie (2007) afirma que a natamicina é eficiente no controlo dos fungos que se desenvolvem na superfície do chouriço, inibindo o crescimento durante as 2 primeiras semanas de maturação. Porém, este antifúngico já não é eficaz ao fim de 4 semanas, pois a tripa já estará desidratada e a ação da natamicina fica limitada (Labadie, 2007).

De acordo com um estudo de Ramos *et al.*, (2012) o ácido láctico, quando incorporado em filmes comestíveis produzidos por proteínas isoladas do soro de leite, revelou ter grande atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, enquanto que a natamicina, não podendo inibir bactérias mas sim fungos, apresentou uma maior eficácia contra as leveduras. Concluíram também que filmes com incorporação de ácido láctico e natamicina podem ter efeito sinérgico contra os microrganismos que normalmente se encontram na superfície de queijos (Ramos *et al.*, 2012).

Na formação de filmes contendo alginato e/ou pectina, a natamicina revelou ter um baixo grau de compatibilidade com a pectina, havendo formação de espuma e bolhas, o que leva a uma reticulação ineficaz. A libertação de um agente antimicrobiano, do filme ou revestimento, para o alimento deve ser efetuada a uma velocidade moderada (Bierhalz *et al.*, 2012). Assim, Bierhalz *et al.*, (2012) verificaram também que há uma maior compatibilidade da natamicina com o alginato do que com a pectina, através dos resultados obtidos para a libertação do agente ativo através do filme, onde a libertação foi muito mais lenta no filme de alginato (Bierhalz *et al.*, 2012).

Num estudo efetuado por Pintado *et al.*, (2010), foi verificado que nos filmes (de proteína de soro de leite) onde houve imobilização de natamicina, ocorreu inibição de *Yarrowia lipolytica* e *Penicillium commune* e *Penicillium chrysogenum*. Foi também constatado que a nisina e a natamicina quando imobilizadas num filme, como agentes ativos, não tecem qualquer efeito sinérgico ou antagónico entre si, ou seja, atuam de forma independente. Quando parte integrante da composição do filme comestível, o Tween 80 a 0,15% (p/v) não aumentou a atividade antimicrobiana da nisina nem da natamicina contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Yarrowia lipolytica*, mas sim contra *Listeria monocytogenes* e *P.commune* e *P.chrysogenum* (Pintado *et al.*, 2010).

Numa publicação relativamente recente, a *European Food Safety Authority* (EFSA) deu um parecer científico em relação à natamicina, e relativamente ao metabolismo da natamicina no organismo humano, a informação disponível sugere que nem o antifúngico nem os produtos resultantes da sua degradação são absorvidos no sistema digestivo, sendo rapidamente excretado nas fezes (EFSA,2009).

Vários estudos em animais experimentais concluíram que a natamicina e os seus produtos de degradação não têm potencial para desenvolver atividade antibiótica no colón, nem existem evidências experimentais de que os microrganismos adquiram resistência à natamicina (EFSA, 2009).

Assim, se não há absorção significativa no trato gastrointestinal, nem risco de desenvolvimento de resistência, não haverá risco na sua ingestão, para os níveis de utilização propostos.

No ano de 1979, o *Scientific Committee for Food* (SCF) determinou que a utilização de natamicina em queijos e enchidos não dava origem a preocupações de segurança, para os níveis de utilização a que foram propostos na Diretiva 95/2/CE. A dose diária admissível (DDA) foi confirmada em 2002 pelo *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) fixando-a em 0,3 mg/Kg pc/dia, valor este que já tinha sido sugerido no ano de 1968 pela JECFA com base num estudo clínico realizado em 1960 (EFSA, 2009; ASAE, 2011).

2.5.2.2. Revestimentos para imobilização de péptidos

Para se proceder à formação de um revestimento, com o intuito de efetuar uma incorporação de péptidos antimicrobianos, é necessário definir uma matriz estrutural, na qual será efetuada a imobilização antes do revestimento ser aplicado sobre o produto alimentar. As matrizes mais comumente utilizadas para o referido fim são as proteínas e os polissacarídeos, e por vezes os lípidos também (Falguera *et al.*, 2011; Ojagh, Rezaei, Razavi & Hosseini, 2010; Rojas-Grau *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos apresentam um grande número de aplicações como matriz de revestimentos ativos comestíveis. O quitosano é bastante comum de ser utilizado para a conservação de alimentos uma vez que apresenta um grande espectro de atividade antimicrobiana (ponto 2.5.2.2.1.) (Aider, 2010; Falguera *et al.*, 2011).

De acordo com Arzate-Vázquez *et al.*, (2012) o quitosano e o alginato têm sido utilizados para revestimentos comestíveis a aplicar em géneros alimentícios (Arzate-Vázquez *et al.*, 2012).

2.5.2.2.1. Quitosano

A quitina é um homopolímero linear, composto por ligações $\beta(1-4)$ de *N*-acetil-D-glucosamina e é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, encontrando-se presente no

exosqueleto de crustáceos, nomeadamente de caranguejos e camarões, assim como nas paredes celulares de fungos (Shahidi *et al.*, 1999; Roller & Fletcher, 2002; Gil & Ferreira, 2006 ; Altun & Cetinus, 2007; Fernandez-Saiz *et al.*, 2008 ; Aider, 2010 ; EFSA, 2011; Falguera *et al.*, 2011; Vu *et al.*, 2011 ; Pinheiro *et al.*, 2012).

O quitosano (poli- α -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucose) é a forma desacetilada da quitina. Caracteriza-se por ser um polissacarídeo catiónico natural e hidrofílico, solúvel em ácidos orgânicos diluídos, composto por copolímeros de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina que estabelecem ligações (1,4)-2-amino-desoxi- β -D-glucano entre si (Shahidi *et al.*, 1999 ; Albarghouthi & Badwan, 2000; Roller & Fletcher, 2002; Shu & Zhu, 2002; Tamura, Tsuruta & Tokura, 2002 ; Chiou & Wu, 2004; López-Caballero *et al.*, 2005 ; George & Abraham, 2006; Gil & Ferreira, 2006 ; Cong *et al.*, 2007; Fajardo *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2010 ; Di Pierro, Sorrentino, Mariniello, Giosafatto & Porta, 2011 ;EFSA, 2011; Arzate-Vázquez *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2012).

Este polissacarídeo é de baixo custo e com uma grande importância a nível económico e ambiental, uma vez que pode ser extraído de resíduos (exosqueleto/carapaça de crustáceos) das indústrias pesqueiras (Shahidi *et al.*, 1999; Akkuş Çetinus & Nursevin Öztop, 2003; Gil & Ferreira, 2006).

De acordo com Mendes, Oliveira, Castro e Giordano (2011), é comum a desacetilação da quitina ser promovida por um processo termoquímico, com NaOH (40-50% m/m) a 110-115 °C. Os diferentes graus de desacetilação são obtidos em função de diferentes fatores, entre os quais se encontram o tempo e temperatura da reação; o tamanho das partículas de quitina a serem desacetiladas; a concentração da solução de NaOH; a razão entre a quitina/NaOH e a presença de agentes que evitem a despolimerização. O seu grau de desacetilação, assim como o peso molecular, estão diretamente relacionados com as biofuncionalidades oferecidas pelo quitosano (quitosano de peso molecular entre 5 e 30 kDa possui uma atividade biológica elevada; para quitosano com peso molecular de 20 kDa foi demonstrado prevenir a progressão da *diabetes mellitus* e ter afinidade para alguns lipopolissacarídeos⁵ bacterianos) (Li, Cai, Zhong & Du, 2012; Mendes, Oliveira, Castro & Giordano, 2011).

Coma (2008), referiu que o quitosano tem uma boa capacidade para reter substâncias antimicrobianas. Vários estudos demonstraram que o quitosano possui atividade antimicrobiana e antifúngica contra uma ampla gama de microrganismos. No entanto, esta atividade é variável, dependendo de diversos fatores: tipo de quitosano (grau de desacetilação), peso molecular, organismo alvo e condições do meio no qual é aplicado, em especial o pH, a força iónica e a presença de solutos suscetíveis de reagir com o quitosano através de interações electrostáticas e/ou ligação covalente podendo bloquear

⁵ É um tipo de molécula característico das bactérias gram-negativas, constituindo a principal fonte de endotoxinas bacterianas (Parente & Sousa, 1998).

completamente a reatividade do grupo amina ativo (Coma,2008; Fernandez-Saiz *et al.*, 2008 ; Aider, 2010; Jiang, Neetoo & Chen, 2011).

O quitosano atua como agente antimicrobiano sobre os fungos e bactérias, no entanto a sensibilidade destes microrganismos ao quitosano difere entre si. As bactérias gram-negativas são as mais resistentes. Os bolores e leveduras são os mais sensíveis à ação do polissacarídeo, seguindo-se as bactérias gram-positivas. Porém, é citado por Kong *et al.*, (2010) a existência de trabalhos onde foi demonstrada uma maior suscetibilidade às bactérias gram-negativas em relação às gram-positivas (Coma, 2008; Aider, 2010; Kong *et al.*, 2010). Por ser um polissacarídeo catiónico, este tem a particularidade de interagir com moléculas carregadas negativamente. Da estrutura do quitosano faz parte um grupo amina, o qual determina que o modo de ação do polissacarídeo seja pela interação entre o seu grupo amina (carregado positivamente – NH_3^+) e as cargas negativas presentes nas paredes celulares das bactérias, levando então à adesão celular, com consequente perturbação no transporte de solutos e nutrientes para a célula, e perda de constituintes intracelulares (Gåserød & Skjåk-Bræk, 1998 ;Shahidi *et al.*, 1999 ; Appendini & Hotchkiss, 2002; Pranoto, Rakshit & Salokhe, 2005 ; Aider, 2010).

O mecanismo de ação para com os fungos é semelhante ao das bactérias, no entanto o quitosano apenas interage com alguns fungos. A ligação dos catiões à carga negativa da superfície da membrana leva a alterações da função e permeabilidade membranar e distúrbios metabólicos, podendo mesmo resultar no fim da viabilidade do microrganismo (Falguera *et al.*, 2011).

A solubilidade do quitosano em meio aquoso é de extrema importância no que respeita ao modo como será proporcionada a interação entre o polissacarídeo e os locais ativos dos microrganismos-alvo. O quitosano de baixo peso molecular (peso médio inferior a 10 kDa) é mais solúvel em meio aquoso do que o de elevado peso molecular. Assim, constata-se que o quitosano de baixo peso molecular tem maior atividade antimicrobiana do que o quitosano de elevado peso molecular. Porém, há um limite de aceitabilidade para o quitosano de baixo peso molecular. Limite esse que corresponde ao quitosano ter um grau de polimerização de pelo menos sete unidades base (glucosamina), uma vez que para frações com um menor número de unidades, o peso molecular já vai ser muito baixo, não permitindo ao polissacarídeo ter a capacidade necessária para exercer a atividade antimicrobiana e antifúngica. É também importante ter em consideração que a capacidade de adesão favorável do quitosano à célula bacteriana resulta numa maior eficácia da atividade antimicrobiana. A capacidade de adesão está favorecida quando existe uma elevada solubilidade do quitosano, assim como na presença de uma alta densidade de carga de protões. Ambas as situações ocorrem quando o pH regista um valor inferior ou igual a 5,5 e quando o quitosano tem um elevado grau de desacetilação, visto que o quitosano só é

solúvel a pH ácido. Assim verifica-se que a $pH \leq 5,5$ e com um grau de desacetilção elevado, a actividade antimicrobiana é favorável (Aider, 2010; Kong et al., 2010).

Segundo Tsai e Su, 1999 (citado por Aider, 2010) a atividade antimicrobiana do quitosano é maior a temperaturas de 37 °C do que a temperaturas de refrigeração, o que pode estar relacionado com o facto de um aumento da temperatura levar ao decréscimo da viscosidade do quitosano. No entanto, a matriz na qual se aplica o quitosano é um fator que se encontra acima de qualquer outro no que respeita à influência na atividade antimicrobiana do polissacarídeo. Dada a sua natureza catiónica, o quitosano tem o potencial de se ligar a diferentes componentes alimentares, como são exemplo as proteínas e alginatos. Porém, em matrizes alimentares muito complexas, esta interação pode não estar favorecida, e levar a uma possível diminuição do efeito antimicrobiano do quitosano (Aider, 2010).

O referido polissacarídeo tem atraído a atenção dos investigadores uma vez que este versátil biopolímero possui características que sugerem a sua possível utilização como conservante alimentar. De entre as referidas características destacam-se a biocompatibilidade e biodegradabilidade (num curto espaço de tempo) com os tecidos humanos; não ser tóxico; e possui propriedades bioativas intrínsecas, nomeadamente como antioxidante, antimicrobiana⁶ e antifúngica⁷, e possui também uma boa capacidade para formar filmes. De acordo com Roller e Fletcher (2002), foi testado em laboratório que o quitosano possui atividade antimicrobiana contra determinados microrganismos que se encontram comumente presentes em alimentos. Todos estes fatores têm contribuído para que exista uma linha de investigação direcionada para a aplicação de quitosano na indústria alimentar, nomeadamente para a produção de filmes e revestimentos (visto que o polissacarídeo tem boa capacidade para os formar), ou para ser utilizado como emulsionante, gelificante e agente de estabilização. É também bastante utilizado para efetuar imobilizações. Deste modo, têm sido produzidos filmes biodegradáveis e revestimentos com base no referido composto, uma vez que o quitosano possui as excelentes características referidas, e aquando da formação de filmes adquire uma boa capacidade de barreira ao oxigénio, apesar da sua baixa capacidade de barreira ao vapor e água, devido à sua natureza hidrofílica. Contudo, a eficácia demonstrada em laboratório nem sempre se verifica nos alimentos, estando esta dependente da natureza do produto alimentar, nomeadamente das proteínas e lípidos, com os quais o quitosano vai interagir (López, Lázaro & Marqués, 1997; Shahidi *et al.*, 1999 ; Roller & Fletcher, 2002; López-Caballero, 2005; Pranoto *et al.*, 2005; Cong *et al.*, 2007; Coma, 2008; Fernandez-Saiz *et al.*, 2008; Çetin, Şahin & Saraydin, 2009; Fajardo *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2010; Ojagh *et al.*, 2010; Sánchez-González, Cháfer, Chiralt & González-Martínez, 2010 ; Aider, 2010; Di Pierro

⁶ Inibe o crescimento de algumas bactérias (gram-positiva e gram-negativa) e vírus (Aider, 2010; Di Pierro *et al.*, 2011; Falguera *et al.*, 2011).

⁷ Inibe o crescimento de fungos patogénicos (Falguera *et al.*, 2011).

et al., 2011; Falguera *et al.*, 2011; Sánchez-González *et al.*, 2011; Vu *et al.*, 2011 ; Pinheiro *et al.*, 2012).

A sua atividade antimicrobiana depende do pH, estando favorecida aquando de um pH ácido (Kong *et al.*, 2010).

De acordo com Vu *et al.*, 2011, este polissacarídeo é bastante utilizado para encapsulamentos, uma vez que tem a capacidade de formar géis na presença de determinados catiões bivalentes, como por exemplo o cálcio (Vu *et al.*, 2011).

Relativamente à Concentração Mínima Inibitória (MIC) do quitosano, Roller e Fletcher (2012) afirmam ser muito variável, encontrando-se entre 0,01% e 1%, com uma tendência das leveduras a serem mais sensíveis do que as bactérias (Roller & Fletcher, 2002).

Segundo Di Pierro *et al.*, 2010, a aprovação do quitosano como material de contacto com os alimentos na Europa encontra-se pendente. Porém, o quitosano é um polissacarídeo aprovado como GRAS, desde Março de 2001 como intenção de uso “usar em alimentos em geral, para diversos efeitos técnicos, de acordo com as boas práticas de fabrico” e desde Junho de 2005 também com intenção de utilização como “ingrediente em alimentos, incluindo produtos de carne e aves”. Assim, este alimento é considerado seguro para utilizar em alimentos (Coma, 2008; Di Pierro *et al.*, 2011 ; FDA 2012a; FDA, 2012b).

Nos Estados Unidos, a FDA aprovou o quitosano como GRAS no ano de 1983 (Shahidi *et al.*, 1999).

2.5.2.2.2. Alginato

Os alginatos são polissacarídeos estruturais (hidratos de carbono) que se caracterizam por serem naturais, iónicos, não tóxicos, coloidais e hidrofílicos (solúveis em água), os quais são isolados a partir de algas castanhas das classes *Phaeophyceae*, das espécies: *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata* e *Fucus serratus*. Estes polissacarídeos são macromoléculas lineares que têm a capacidade de formar hidrogéis, após adição de catiões bivalentes de que é exemplo o Ca^{2+} . Os alginatos, são os sais de sódio do ácido algínico, constituído por monómeros de ácido gulurónico (α -L-guluronato) e/ou ácido manurónico (β -D-manurato). A constituição desta macromolécula conta com cerca de 20 monómeros, sendo a distribuição destes de grande relevância na medida em que determina as propriedades do alginato, em especial a capacidade gelificante, espessante e estabilizante. Assim, a rigidez é superior para o caso dos alginatos constituídos com ambos os monómeros, e mais baixa no caso de ser apenas constituído por ácido gulónico (Albarghouthi & Badwan, 2000; Shu & Zhu, 2002; Tamura *et al.*, 2002 ; Krasaekoopt, Bhandari & Deeth, 2004 ; George & Abraham, 2006; Rojas-Graü *et al.*, 2007 ; Hambleton *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2011; Arzate-Vázquez *et al.*, 2012; Bierhalz *et al.*, 2012; Infopédia, 2012; Paşcalău *et al.*, 2012).

Este polissacarídeo é carregado negativamente (Gåserød & Skjåk-Bræk, 1998).

O processo de obtenção dos alginatos a partir das algas passa por várias etapas: obtenção das algas; desmineralização; extração, filtração e decantação; e por fim a coagulação, a partir da qual se obtêm os alginatos, que são moídos após serem neutralizados por secagem (Infopédia, 2012).

Os alginatos são muitas vezes utilizados para efetuar imobilizações e têm vindo a ter uma crescente utilização na indústria alimentar. Vários têm sido os estudos realizados com a formação de revestimentos com géis de alginato contendo agentes antimicrobianos como por exemplo, a nisina. Porém os revestimentos de alginato têm uma fraca resistência à água, pois estes biopolímeros são de natureza hidrofílica. No entanto esta situação pode ser resolvida pela reação dos alginatos com catiões bivalentes, como o cálcio, formando assim um polímero insolúvel. De acordo com Silva *et al.*, (2009), o cloreto de cálcio é, nestes casos, o agente de reticulação mais eficaz. Os fatores que permitem que os alginatos sejam utilizados em revestimentos comestíveis relacionam-se principalmente com o facto de as moléculas coloidais terem propriedades que incluem o espessamento, estabilização, suspensão e formação do filme, produzindo assim um gel forte (López *et al.*, 1997; Rojas-Graü *et al.*, 2007 ; Hambleton *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2010).

Os filmes hidrofílicos, são uma boa barreira a gases (O₂ e CO₂) e possuem boas propriedades mecânicas e baixa humidade relativa (Song *et al.*, 2011).

Com a formação de revestimentos de alginato, e utilização de um agente de reticulação, o revestimento desidrata e fica com uma estrutura bastante forte e firme, sendo então necessária a utilização de um agente plastificante, o qual vai permitir a diminuição das forças intramoleculares existente e assim tornar a cadeia do polissacarídeo mais flexível e menos frágil. Os agentes plastificantes comumente utilizados para estes revestimentos são o glicerol e o sorbitol (Silva *et al.*, 2009).

O alginato é uma substância autorizada pela FDA como GRAS (Song *et al.*, 2011).

Na lista de aditivos alimentares autorizados contam cinco tipos de alginatos, pertencentes ao grupo dos emulsionantes, estabilizantes, espessantes e gelificantes. De acordo com o Decreto-Lei nº 94/2010 e com a Diretiva 2009/10/CE (para o alginato de propilenoglicol), temos as seguintes definições: alginato de sódio (E401) - sal de sódio do ácido algínico; alginato de potássio (E402) – sal de potássio do ácido algínico; alginato de amónio (E403) – sal de amónio do ácido algínico; alginato de cálcio (E404) – sal de cálcio do ácido algínico; e alginato de propilenoglicol (E405) – Éster de 1,2-propanodiol do ácido algínico. A composição do produto varia em função do grau de esterificação e da percentagem de grupos carboxilo livres ou neutralizados da molécula (ASAE, 2011).

2.5.2.2.3. K-carragenina

A k-carragenina é um polissacarídeo natural aniónico e sulfatado, biodegradável e pertencente à família das carrageninas, sendo estas extraídas com água alcalina a partir de

algumas algas vermelhas, as Rhodophyceae, principalmente as pertencentes à família Gigartinaceae e Solieriaceae. A sua estrutura linear é constituída por $\alpha(1\rightarrow4)$ D-galactose-4-sulfato e $\beta(1\rightarrow3)$ 3,6-anidro-D-galactose, sendo as ligações estabelecidas glicosídicas. Não é um composto tóxico e é bastante utilizado na indústria alimentar como gelificante, emulsionante, espessante e agente de estabilização (Mishra, Tripathy & Behari, 2008; Moreno-Garrido, 2008 ; Mishra, Sand, Mishra, Yadav & Behari, 2010; Paşcalău *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2012).

A presença de catiões de potássio ou cálcio, mas mais comumente iões potássio é uma mais valia como agente de gelificação das carrageninas (Paşcalău *et al.*, 2012).

As carrageninas são comumente utilizadas como base para diferentes tipos de imobilização (López *et al.*, 1997).

3. APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS ATIVOS NO PERÍODO DE VIDA ÚTIL DO CHOURIÇO TRADICIONAL PORTUGUÊS

3.1. Justificação e objetivos do trabalho

Na superfície dos chouriços tradicionais Portugueses é comum o desenvolvimento de fungos filamentosos, os quais diminuem a qualidade do produto alimentar tornando-o indesejável para com o consumidor. Surgindo a necessidade de controlar esse desenvolvimento, apostou-se na investigação de um método capaz de contornar esta questão.

Os revestimentos ativos comestíveis são uma nova tecnologia de preservação de alimentos, tendo por objetivos o aumento da segurança dos alimentos e do seu tempo de vida útil. No entanto, a sua aplicação em chouriços secos fermentados são uma novidade.

Assim surgiu este trabalho, que teve como principal objetivo avaliar a eficácia da aplicação de revestimentos ativos em produtos cárneos fermentados, o chouriço, no aumento do seu tempo de vida útil.

Para tal, com a aplicação dos diferentes revestimentos (com matrizes de quitosano, alginato e k-carragenina) em rodelas de chouriço, decidimos quais os que realmente seriam sujeitos a um outro ensaio preliminar: aplicação de revestimentos em tripa seca natural, contaminada e não contaminada. Com esta análise verificámos qual o revestimento ideal a ser aplicado no chouriço tradicional Português, afim de aumentar a sua segurança e tempo de vida útil.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fase I: Desenvolvimento, preparação e efeito antimicrobiano de revestimentos aplicados em rodelas de chouriço

Numa primeira etapa foram desenvolvidos diversos revestimentos, diferenciados pela matriz com que eram compostos e pelos agentes antimicrobianos neles imobilizados. Os revestimentos desenvolvidos e preparados foram aplicados em rodelas de chouriço, com o objetivo de se analisar a sua ação no aparecimento e crescimento de fungos e decidir qual o que melhor se adaptava à aplicação no produto final.

4.1.1. Origem e preparação das amostras

Para o desenvolvimento desta primeira fase de trabalho foram adquiridos chouriços de carne corrente (Izidoro, Portugal) numa superfície comercial. Os chouriços, em forma de bastonete, foram fatiados em pequenas amostras, em forma de rodela, com cerca de 0,5 cm de espessura. As amostras que não foram utilizadas no momento do corte foram então congeladas até ao dia da sua utilização, tendo sido colocadas a descongelar sobre refrigeração cerca de quatro horas antes do seu uso. O ensaio foi realizado em duas réplicas.

4.1.2. Preparação e aplicação dos revestimentos ativos

Foram elaborados diferentes protocolos laboratoriais, num total de 24 revestimentos ativos distintos. Dividimos os revestimentos em três grupos, de acordo com a matriz de base do revestimento, na qual foi efetuada a imobilização dos agentes antimicrobianos (nisina e natamicina): revestimentos com matriz de Alginato, K-Carragenina e Quitosano.

Na Tabela 7 estão representados os diferentes revestimentos testados, assim como a composição de cada um deles. A denominação dada a cada um dos revestimentos apresentados é:

- a) REV1 - revestimento constituído por matriz de alginato ou k-carragenina ou quitosano.
- b) REV2 - revestimento constituído por matriz de alginato ou k-carragenina ou quitosano com incorporação de lactato de sódio (2,4%).
- c) REV3 - revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de nisina.
- d) REV4 - revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de natamicina.
- e) REV5 - revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de lactato de sódio (2,4%) e nisina.
- f) REV6 - revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de lactato de sódio (2,4%) e natamicina.

g) REV7 - revestimento constituído por matriz de alginato, k-carragenina ou quitosano com incorporação de nisina e natamicina

h) REV8 - revestimento constituído por matriz de alginato ou k-carragenina ou quitosano com incorporação de lactato de sódio (2,4%), nisina e natamicina.

Tabela 7 – Composição dos revestimentos estudados.

revestimentos estudados – Ensaios Preliminares									
revestimentos		REV1	REV2	REV3	REV4	REV5	REV6	REV7	REV8
Reagentes									
Alginato	Alginato	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g
	Lactato de Sódio 2,4%	-	0,48 mL	-	-	0,48 mL	0,48 mL	-	0,48 mL
	Nisina	-	-	0,1260 g	-	0,1260 g	-	0,1260 g	0,1260 g
	Natamicina	-	-	-	0,005 g	-	0,005 g	0,005 g	0,005 g
	Ácido Acético 1%	qb (até perfazer o volume pretendido)							
K-Carragenina	K-carragenina	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
	Lactato de Sódio 2,4%	-	0,48 mL	-	-	0,48 mL	0,48 mL	-	0,48 mL
	Nisina	-	-	0,1260 g	-	0,1260 g	-	0,1260 g	0,1260 g
	Natamicina	-	-	-	0,005 g	-	0,005 g	0,005 g	0,005 g
	Ácido Acético 1%	qb (até perfazer o volume pretendido)							
Quitosano	Quitosano	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g
	Glicerol 87%	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL
	Tween 80	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
	Lactato de Sódio 2,4%	-	0,48 mL	-	-	0,48 mL	0,48 mL	-	0,48 mL
	Nisina	-	-	0,1260 g	-	0,1260 g	-	0,1260 g	0,1260 g
	Natamicina	-	-	-	0,005 g	-	0,005 g	0,005 g	0,005 g
	Ácido Acético 1%	qb (até perfazer o volume pretendido)							

Na preparação dos revestimentos de alginato e k-carragenina, os reagentes foram colocados num tubo de falcon e os diferentes reagentes incorporados sob agitação. Perfez-se o volume pretendido com ácido acético 1%, e as referidas soluções foram mantidas em agitação em banho de água (Julabo SW 21) durante toda a noite, a uma temperatura de aproximadamente 22 °C e a 190 rpm (Juck, Neetoo & Chen, 2010).

Quanto aos revestimentos de quitosano, após a junção do quitosano com o ácido acético 1%, as soluções foram sujeitas a agitação magnética (ARE: Heating Magnetic Stirrer – VELP Scientifica) durante 4 horas à temperatura ambiente. De seguida as suspensões

foram sujeitas a centrifugação (Beckman Coulter – Allegra™ 6R centrifuge) ($t=10$ min, $T=20$ °C e rotações = 5750 rpm) para que fossem removidas possíveis impurezas insolúveis e deste modo evitar imperfeições no revestimento (Fajardo *et al.*, 2010). Após transferência das soluções para outros tubos semelhantes adicionaram-se os restantes reagentes às soluções e, sempre que se justificou, as soluções dos revestimentos passaram pelo ultrasons (Ultrasons P-Select) para que fossem removidas as bolhas de ar existentes na solução. Posteriormente as soluções foram mantidas sob agitação em banho de água (Julabo SW 21) durante 30 min após o que se per fez o volume com a solução de ácido acético 1%.

Para efetuar a aplicação dos revestimentos, estes foram colocados em caixas de Petri e as amostras mergulhadas na solução, deixando-se escorrer o excesso. As amostras seguiram para secagem na hote durante 20 minutos e posteriormente foram armazenadas em refrigeração durante 12 dias e depois foram mantidas à temperatura ambiente durante mais 7 dias. No final dos 19 dias procedeu-se à análise microbiológica. Durante todo o período de armazenamento foram feitos registos (a cada 48 horas) de pesagens para cálculos de perda de massa.

Para os revestimentos com matriz de alginato e k-carragenina foi feito um segundo ensaio, no qual as amostras, após revestidas com as diferentes soluções, mergulharam numa solução de cloretos, para que os revestimentos aplicados solidificassem instantaneamente. Nas amostras revestidas de alginato utilizou-se uma solução de cloreto de cálcio 4% (CaCl_2), e nas de k-carragenina uma solução de cloreto de potássio 3,5% (KCl).

O restante processo assemelha-se ao das amostras que não estiveram sujeitas a banho de cloretos, ou seja, secagem na hote e armazenamento.

Durante todo o processo de preparação dos revestimentos foram avaliados visualmente diferentes parâmetros tecnológicos, nomeadamente: dissolução dos reagentes; formação de espuma; variação da cor da solução; formação de grânulos e de bolhas.

Durante a aplicação do revestimento nas rodelas de chouriço, foram avaliados visualmente a viscosidade, a adesividade e a consolidação do revestimento.

4.1.2.1. Soluções de trabalho

Foi necessário proceder à preparação de algumas soluções de trabalho, as quais fizeram parte integrante da composição dos revestimentos ou do ensaio em questão.

4.1.2.1.1. Solução de Ácido Acético 1% (v/v)

Num balão volumétrico de 1 L foi adicionado 10 mL de ácido acético (glacial) (Merck, Alemanha). Per fez-se o volume com água destilada.

4.1.2.1.2. Solução de Glicerol 87% (v/v)

Adicionou-se 10,9968g de Glicerol (Uniquema – Labonal, Lisboa, Portugal) num balão volumétrico de 10 mL e perpez-se o volume com água destilada. Seguiu para agitação a seco (Albalab – Agitorb 160E) a uma temperatura de 30°C, durante 1 hora a 160 rpm.

4.1.2.1.3. Solução de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) a 4% (p/v)

Em água destilada, foram dissolvidos 2,6485g de cloreto de cálcio (Merck, Alemanha) num balão volumétrico de 50 mL. Perfazer o volume com água destilada (Ferreira *et al.*, 2008).

4.1.2.1.4. Solução de Cloreto de Potássio (KCl) a 3,5% (p/v)

Num balão volumétrico de 50 mL, foram dissolvidos 1,7500 g de cloreto de potássio (Merck, Alemanha) em água destilada e perpez-se o volume com a mesma (Silva, 2006).

4.1.3. Taxa de transferência de massa permitida pelo revestimento

As perdas de massa foram realizadas através de pesagens (Mettler AE 200) ao longo do tempo, e foram feitas a partir do dia em que foi aplicado o revestimento, tomando este dia como o dia 0. O dia 1 foi tomado então como referência a 100% da massa e corresponde a cerca de 48 horas após a aplicação.

Aquando da realização das pesagens (a cada 48 horas) efetuámos também uma avaliação visual da cor, cheiro, aspeto (se tinha libertado ou não gordura) e rigidez das rodelas de chouriço.

4.1.4. Análise microbiológica – Contagem de fungos

4.1.4.1. Preparação da amostra

As rodelas de chouriço foram cortadas, com um bisturi estéril e com o auxílio de uma pinça esterilizada, em pequenos pedaços e colocadas num saco estéril com filtro (Lab-Blender 400) e adicionou-se o volume de Triptona Sal⁸ (Tsal) (Scharlau, Spain) correspondente ao peso da respetiva amostra, de modo a efetuar uma diluição de 1:10. Colocou-se o saco no Stomacher Lab-Blender 400 (Comcessus, Lisboa, Portugal) homogeneizando assim a suspensão durante cerca de 2 minutos. A partir desta suspensão inicial (solução-mãe: diluição 10⁻¹) efetuaram-se uma série de diluições sucessivas, com base na ISO 6887-2:2003, até à diluição 10⁻³.

4.1.4.2. Contagem de fungos

A contagem de fungos foi efetuada de acordo com os requisitos descritos na ISO (*International Organization for Standardisation*) 21527-1:2008. Os inóculos foram semeados à superfície efetuando-se a sua contagem após 5 dias de incubação a 25 °C Para cada uma

⁸ Este meio é preparado com adição de 1 g de triptona e 8,5g de cloreto de sódio, a cada um litro de água.

das diluições inoculou-se 0,2 mL da diluição em 5 placas com meio Rose Bengal Agar (Scharlau, Spain) RB, perfazendo um volume total de 1 mL nas 5 placas, as quais foram incubadas na estufa a 25 °C, durante 5 dias. Foi efetuada uma réplica do ensaio.

4.2. Fase II: Isolamento de fungos e determinação da concentração mínima inibitória da natamicina (MIC)

4.2.1. Isolamento de fungos e preparação das respectivas suspensões de esporos

Procedeu-se ao isolamento de fungos que se desenvolveram, de forma visível, na superfície de produtos cárneos fumados: presunto e chouriço tradicional Português (chouriço de porco preto – Alentejo, Portugal). Em ambos os casos, o produto encontrava-se sobre refrigeração, já após abertura da embalagem de origem.

Assim, com o auxílio de uma zaragatoa, os bolores desenvolvido na superfície do produto foram isolados numa placa com meio de cultura Rose Bengal Agar (RB) (Scharlau, Espanha), e incubou-se a 25 °C durante 5 dias (ISO 21527-1: 2008).

Procedeu-se após incubação à preparação de um esfregaço com o fungo, de modo a visualizarmos ao microscópio e assim procedermos à sua identificação de acordo com a morfologia descrita por Ramirez (1982). De seguida repicou-se o fungo para uma nova placa com meio RB e incubou-se a 25 °C por 5 dias para preparação de uma suspensão de cada um dos fungos isolados. A suspensão foi efetuada através da lavagem da placa de fungos com 10 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion Broth, Scharlau, Espanha) com Glicerol a 15% (Scharlau, Espanha) e Tween 80 a 0,5% (Merck, Alemanha). Com esta suspensão preparada, efetuaram-se uma série de diluições decimais seriadas até 10^{-8} , sendo o soluto diluidor BHI com Glicerol a 15%. As diluições foram feitas de acordo com a ISO 6887-2:2003.

Para cada um dos isolados, procedeu-se à contagem das unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL), existente em cada uma das diluições efetuadas, para termos conhecimento do número de células presente em cada suspensão.

As diferentes diluições foram congeladas a uma temperatura de -23 °C.

4.2.2. Concentração Mínima Inibitória da Natamicina (MIC)

O teste para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) da natamicina sobre os fungos, previamente isolados de produtos cárneos fermentados, foi efetuada com base na metodologia descrita por Betbeze *et al.* (2006) e de acordo com a Norma M38-A (2002), denominada por “Método de Referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos”.

4.2.2.1. Preparação dos inóculos

A preparação foi efetuada tal como descrito no ponto 4.2.1. para os bolores: *Penicillium funiculosum*, *Penicillium pulvillorum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium mirabile*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium humuli*. Conhecidas as concentrações de células presente em cada uma das diluições dos inóculos, utilizou-se aquela que apresentava valores compreendidos entre 5×10^4 e 4×10^5 UFC/mL.

4.2.2.2. Preparação das concentrações do antimicrobiano

Pretendeu-se testar sete concentrações finais do antimicrobiano, sendo elas: 1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL e 15,63 µg/mL. Assim, inicialmente preparou-se uma solução-padrão de 10000 µg/mL (como a natamicina é insolúvel em água, a preparação da solução foi feita num adjuvante de dissolução, o dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma, USA)). A partir da solução padrão, foram preparadas as soluções intermédias (em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich R6504)), as quais foram necessárias para obtermos as concentrações finais desejadas. As concentrações intermédias preparadas foram de 5000 µg/mL; 2500 µg/mL; 1250 µg/mL; 625 µg/mL; 312,5 µg/mL; 156,25 µg/mL e 78,125 µg/mL.

4.2.2.3. Inoculação em meio RPMI

O teste foi efetuado em placas de microdiluição, estéreis e descartáveis, com múltiplos poços. Colocou-se 30 µL da suspensão de inóculo em cada poço, assim como da concentração de natamicina pretendida, e 90 µL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich R6504), ou seja, numa proporção de 1:5 para o inóculo e concentração de agente antifúngico. Efetuaram-se também poços de controlo de crescimento, nos quais foram colocados apenas o inóculo e o meio de cultura (numa proporção de 1:5) e controlo de diluente, com inóculo, meio RPMI e diluente DMSO (inóculo e diluente numa proporção de 1:5).

4.2.2.4. Incubação e leitura

Aquando do término da preparação do teste, foi efetuada uma leitura da densidade ótica (D.O.) dos poços inoculados, a um comprimento de onda (λ) de 600 nm. De seguida as placas de microdiluição foram incubadas a 37 °C, durante 5 dias. Terminado o tempo de incubação, realizou-se a leitura da D.O. (Molecular Devices, Spectra MAX – 340PC) e análise visual de turvação gerada nos poços e resultante do crescimento celular.

4.3. Fase III: Aplicação dos revestimentos em tripa seca natural.

Neste ensaio pretendeu-se estudar o comportamento dos revestimentos em análise quando aplicados em tripa seca natural (invólucro utilizado no chouriço tradicional Português). Para

tal foram simuladas diferentes condições de contaminação da tripa, por *Penicillium funiculosum*, com aplicação dos diferentes revestimentos que foram selecionados da fase I do estudo.

4.3.1. Preparação dos revestimentos

Os revestimentos em estudo selecionados foram os de quitosano com lactato de sódio 2,4% na sua composição. Foi desenvolvido para este ensaio um novo revestimento - o REV6b – que é idêntico ao REV6 mas com uma concentração de natamicina reduzida para metade (Tabela 8). A todos os revestimentos foi aplicado um processo de esterilização por radiação ultravioleta (UV), durante 1 hora, para garantir que não estavam contaminados com fungos.

4.3.2. Origem da tripa seca natural e preparação da mesma

A tripa seca natural de suíno utilizada no estudo é de calibre 50/55 (A nova preferida – Flor da Seara, Pombal, Portugal), e foi cortada em quadrados de 64 cm² para se proceder ao ensaio.

Os quadrados de tripa foram colocados em caixas de petri (as quais foram seladas com fita para que não houvessem trocas de humidade) e estiveram sujeitas a radiação UV durante 1 hora, para garantir que a tripa estava isenta de fungos aquando das análises a serem efetuadas.

4.3.3. Condições de ensaio: Aplicação dos revestimentos e inóculo sobre a tripa e condições de armazenamento

O ensaio foi efetuado para cada um dos revestimentos ativos obedecendo às seguintes condições: aplicação direta do revestimento na tripa (Trev); tripa contaminada após a aplicação do revestimento (Capós) e tripa contaminada antes da aplicação do revestimento (Cantes).

Como controlos foi utilizada a tripa seca natural sem qualquer aplicação e tripa contaminada com uma suspensão de *Penicillium funiculosum*. O volume que foi aplicado na tripa, tanto de revestimento como de inóculo foi de 400µL. O teor inicial de contaminação com *Penicillium funiculosum* foi de 2,3 UFC/cm².

As amostras foram guardadas à temperatura ambiente (≈18/20 °C) até apresentarem desenvolvimento visível de bolores. Uma das condições de armazenamento residiu em permanecer sobre as caixas de petri, algodão embebido em água, renovado a cada dois/três dias, para que as amostras se mantivessem sobre um certo nível de humidade, propício ao desenvolvimento de fungos. As caixas de petri encontravam-se dentro de um recipiente de plástico, tapado com papel kraft. A partir do vigésimo dia (após início do teste) o ambiente foi borrifado com água corrente, de modo a aumentar a humidade e assim acelerar o processo de desenvolvimento fúngico.

Os ensaios foram feitos em duplicado, e as análises realizadas no final de 30 e de 60 dias. Ao longo do tempo, a cada 48 horas, as amostras foram pesadas, para efeitos de perda de massa.

Tabela 8 – Representação dos diferentes revestimentos em estudo nesta fase de teste, assim como a composição de cada um deles e número de amostras.

revestimento de quitosano 0,5% com:	Código do revestimento	Denominação da amostra
(Controlos)		Tripa 1
		Tripa 2
		Tripa Contaminada 1
		Tripa Contaminada 2
Lactato de sódio 2,4%	REV2	Tripa + REV2
		CApós (REV2)
		CAntes (REV2)
Lactato de sódio 2,4% + nisina 1%	REV5	Tripa + REV5
		CApós (REV5)
		CAntes (REV5)
Lactato de sódio 2,4% + natamicina 0,05%	REV6	Tripa + REV6
		CApós (REV6)
		CAntes (REV6)
Lactato de sódio 2,4% + natamicina 0,025%	REV6b	Tripa + REV6b
		CApós (REV6b)
		CAntes (REV6b)
Lactato de sódio 2,4% + nisina 1% + natamicina 0,05%	REV8	Tripa + REV8
		CApós (REV8)
		CAntes (REV8)

4.3.4. Análise microbiológica

4.3.4.1. Preparação da amostra para análise microbiológica

Todas as análises foram efetuadas em condições de assepsia e, a preparação da amostra iniciou-se com a retirada do quadrado de tripa da caixa de petri, com o auxílio de uma pinça esterilizada. Colocámo-la num saco estéril com filtro (Lab-Blender 400) e adicionou-se 100 mL de água peptonada tamponada (APT) (Panreac, Barcelona, Espanha) com Tween 80 (Merck, Alemanha) 0,5%. A suspensão seguiu para o homogeneizador (Stomachaer Lab-Blender 400 – Concessus, Lisboa, Portugal) onde permaneceu durante cerca de 2 minutos para que a lavagem da tripa fosse bem efetuada e se obtivesse uma suspensão homogénea. A partir desta suspensão inicial seguiram-se as diluições seriadas, tendo como soluto diluidor APT com Tween 80 0,5%.

4.3.4.2. Contagem de fungos

A contagem de fungos foi feita de acordo com os requisitos descritos na ISO 21527-1: 2008, onde consta que um volume total de 1 mL de inóculo deve ser distribuído por 5 placas de

RB, com espalhamento em superfície. Seguiu-se incubação a 25 °C durante 5 dias. Os resultados foram expressos em log UFC/cm².

4.3.4.3. Contagem de Aeróbios Totais a 30 °C

Esta análise foi realizada de acordo com as especificações presentes na NP 4405:2002. A sementeira foi feita por incorporação indirecta de 1 mL de inóculo em 15 mL de meio TGA (Tryptone Glucose Agar, Scharlau, Espanha) e homogeneizou-se o inóculo com o meio de cultura. Terminado o tempo de incubação a 30 °C durante 48 horas, contaram-se todas as colónias formadas (NP 4405:2002). Os resultados foram expressos em log UFC/cm².

4.4. Fase IV: Aplicação do revestimento selecionado em chouriço tradicional Português

4.4.1. Colheita das amostras

As amostras de chouriço foram adquiridas num produtor tradicional (Lourinhã, Portugal) que fabrica chouriço tradicional com fumagem efetuada por lenha de azinho.

Após identificação de todas as amostras (chouriços controlo e chouriços a serem revestidos), os chouriços que se destinavam à aplicação do revestimento foram pesados e medidos em comprimento e diâmetro (para determinação da quantidade de revestimento aplicada por dm² de superfície de produto).

4.4.2. Modo de aplicação do revestimento selecionado e preparação das amostras

O revestimento selecionado para aplicação foi o revestimento com base em quitosano com natamicina imobilizada numa concentração de 250 µg/mL. O revestimento manteve-se sobre agitação magnética (Hotplate magnetic Stirrer 34532 – Labometer, Lisboa) durante todo o tempo da aplicação, efetuada com um pincel esterilizado de uso alimentar.

Terminada a aplicação do revestimento os chouriços foram pesados e posteriormente suspensos em ganchos até à secagem total do revestimento.

De seguida procedeu-se ao corte do chouriço em três pedaços (três amostras, devidamente identificadas).

As amostras foram envolvidas em película aderente e armazenadas sob refrigeração a 4 °C, simulando ao máximo as condições de armazenamento utilizadas pelos consumidores em suas casas (Tradisausage, 2006).

Efetuuou-se análise microbiológica e química dos chouriços controlo e dos chouriços revestidos em diferentes tempos de armazenamento. A análise microbiológica foi efetuada em quatro tempos: tempo zero (dia 0); quando o chouriço controlo começou a ganhar bolor na superfície e conseqüentemente um aspeto que levaria à rejeição por parte do consumidor (21 dias); ao fim de 30 e de 60 dias.

Efetuaram-se três réplicas do ensaio.

4.4.3. Análises microbiológicas

4.4.3.1. Preparação da amostra

A amostra foi preparada de acordo com a ISO 6887-2, e iniciou-se com a pesagem de 10 g de amostra em condições de assepsia, para um saco de Stomacher estéril. De seguida adicionou-se ao saco 90 mL de Triptona Sal, efetuando deste modo a suspensão-mãe (10^{-1}) e realizou-se de seguida diluições sucessivas de acordo com a ISO 6887-2:2003.

4.4.3.2. Contagem de Aeróbios Totais a 30 °C

A contagem de aeróbios totais foi realizada de acordo com a NP 4405:2002, tal como já descrito no ponto 4.3.4.3.. E os resultados expressos em log UFC/g. Foram efetuadas três réplicas do ensaio.

4.4.3.3. Contagem de Fungos

A contagem de fungos é realizada de acordo com a ISO 21527-1:2008, tal como já descrito no ponto 4.3.4.2.. E os resultados expressos em log UFC/g. Foram efetuadas três réplicas do ensaio.

4.4.3.4. Contagem de *Staphylococcus coagulase negativos*

De modo a proceder-se à contagem de *Staphylococcus* coagulase negativos procedeu-se à sementeira direta de 0,1 mL do inóculo à superfície do meio MSA (Mannitol Salt Agar, Scharlau, Espanha).

As placas foram incubadas a 37 °C, durante 48 horas e no final efetuou-se a contagem de todas as colónias características que se desenvolveram. As colónias podem apresentar uma coloração amarela ou vermelha, dependendo se o manitol foi ou não reduzido (Talon *et al.*, 2007). Os resultados foram expressos em log UFC/g.

4.4.3.5. Contagem de *Pseudomonas spp.*

A sementeira foi feita por incorporação, com inoculação de 1 mL de inóculo na placa de Petri. O meio seletivo utilizado foi o Agar *Pseudomonas* cetrimida, fucidina, cefalotina (Scharlau, Espanha) com suplemento dos respetivos antibióticos (*Pseudomonas* C-F-C supplement, Oxoid). Após incubação durante 48 horas à temperatura de 30 °C (ISO 13720:2000) foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colónias. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

4.4.3.6. Contagem de Bactérias Ácido Lácticas (LAB)

A sementeira foi efetuada por incorporação indirecta de 1 mL de inóculo em 15 mL de meio de cultura MRS (Man Rogosa Sharpe Agar, Scharlau, Espanha) com suplemento de acetato de tálio a 5% (2 mL/100 mL de meio) e 2-3-5-trifeniltetrazólio 1% (1 mL/100 mL de meio). A incubação das LAB foi efetuada em caixas de anaerobiose e utilizando geradores de anaerobiose (Microbiologie Anaerocult, Merck., Alemanha). Efetuou-se a contagem de todas as unidades formadoras de colónias nas placas (ISO 15214:1998) após incubação à temperatura de 30 °C durante 48 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

4.4.4. Análises físico-químicas

4.4.4.1. Determinação do pH

A determinação do pH inicia-se com a calibração do aparelho, o qual é composto pelo potenciómetro, sonda de temperatura e eléctrodo. A calibração foi efetuada através da utilização de duas soluções-tampão de pH conhecido, sendo elas de 4,00 e 7,00.

De modo a proceder-se à determinação do valor de pH, introduziu-se o eléctrodo e a sonda de temperatura⁹ na amostra de chouriço (após efetuar-se um golpe no alimento) e foi feita a leitura. Para este método de determinação, não destrutivo, o valor é dado com uma precisão de 0,01 unidades de pH (NP 3441: 2008). Foram efetuadas três réplicas do ensaio.

4.4.4.2. Determinação da atividade da água (a_w)

Após preparação da amostra, em quantidade representativa homogeneizada numa picadora elétrica (Moulinex) procedeu-se à determinação da atividade da água.

O aparelho Rotronic-Hygroskop DT (Nova Iorque, EUA), utilizado para a determinação da atividade da água requer calibração antes de ser utilizado. Essa calibração foi efetuada com recurso a padrões certificados de 0,5% de humidade relativa de equilíbrio (HRE), 50% e 80% HRE a uma temperatura de 23°C.

A amostra homogeneizada foi transferida para um copo de poliestireno, o qual foi seguidamente colocado no câmara de análise do aparelho para se proceder à leitura da a_w (Manual de utilização do Rotronic-Hygroskop, 1980). Foram efetuadas três réplicas do ensaio.

4.4.5. Determinação da quantidade de revestimento aplicado por dm² de superfície de chouriço

4.4.5.1. Densidade do revestimento

A densidade do revestimento aplicado no produto alimentar foi determinada pelo método de picnómetro. O resultado obtido foi confirmado pelo método de densimetria. A determinação da densidade do revestimento foi efetuada utilizando um densímetro digital *ANTON PAAR*,

⁹ A sonda de temperatura serve para correção automática da temperatura, uma vez que a temperatura do produto aquando da determinação do pH deve ser de 20 °C±2 °C (NP 3441: 2008).

modelo *DMA 60* associado a uma célula DMA 512. A utilização de um banho de água termostático com refrigeração, modelo F10-UC, acoplado ao densímetro permitiu um rigoroso controlo da temperatura no intervalo de $25,00 \pm 0,01$ °C, minimizando-se assim o erro experimental para valores inferiores a $1,0 \times 10^{-4}$ g cm⁻³ (Riddick *et al.*, 1986; Alfaia, 2006).

4.5. Análise estatística dos resultados

No tratamento dos resultados obtidos recorreu-se à análise descritiva e representação gráfica através do Microsoft Excel versão 2007.

Para estudo dos efeitos dos fatores tipo de revestimento aplicado na tripa seca e condições, em tempos fixos de armazenamento, utilizou-se o modelo de análise de variância univariada one-way ANOVA, utilizando o programa SPSS Statistics 19. Quando o valor F foi significativo recorreu-se ao teste LSD a 95%, 99% e 99,9% de significância (SPSS Statistics 19). Na comparação entre períodos de armazenamento e considerando as diferentes condições efetuou-se *Ttest* para amostras dependentes.

O efeito do revestimento aplicado no chouriço em tempos fixos de armazenamento foi avaliado pelo modelo de análise de variância univariada one-way ANOVA utilizando o programa SPSS Statistics 19. Na comparação entre períodos de armazenamento efetuou-se *Ttest* para amostras dependentes.

5. RESULTADOS

5.1. Fase I: Desenvolvimento, preparação e efeito antimicrobiano de revestimentos aplicados em rodelas de chouriço

5.1.1. Comportamento tecnológico dos revestimentos

Durante todo o processo de preparação dos revestimentos foram avaliados visualmente diferentes parâmetros tecnológicos, nomeadamente: dissolução dos reagentes; formação de espuma; variação da cor da solução; formação de grânulos e de bolhas.

Durante a aplicação do revestimento nas rodelas de chouriço, foram avaliados visualmente a viscosidade, a adesividade e a consolidação do revestimento.

Do conjunto de revestimentos testados (Tabela 7) verificámos que:

- a) Os revestimentos com matriz de k-carragenina revelaram uma elevada dificuldade na dissolução dos reagentes, com a formação de grânulos e de um revestimento demasiado viscoso. Apesar de bastante espessos, os revestimentos 1 e 2 de k-carragenina, foram aplicados nas rodelas de chouriço, mas verificaram-se dificuldades na secagem. Os revestimentos de REV3 a REV8 foram de imediato excluídos de serem aplicados por se considerarem tecnologicamente inviáveis. Em relação às amostras que, após serem revestidas, foram mergulhadas em KCl verificou-se a solidificação imediata do revestimento. Os revestimentos constituídos pela matriz de k-carragenina revelaram-se assim tecnologicamente inadequados para serem utilizados nos estudos de ação antimicrobiana.
- b) Os revestimentos compostos por matriz de alginato apresentaram uma viscosidade bastante inferior aos de k-carragenina. Porém em alguns dos revestimentos era notória a presença de alguns grânulos e espuma. Os revestimentos REV1, REV2, REV3 e REV4 apresentaram baixa adesividade ao produto alimentar, enquanto que os restantes apresentaram melhor adesividade. O REV7 revelou-se demasiado viscoso e com formação de muitas bolhas. Com exceção dos REV1 e REV2 (que não tinham qualquer agente antimicrobiano na sua constituição) os revestimentos apresentavam-se sempre com grânulos por dissolver, os quais com agitação manual pareciam desaparecer no momento. A adição de lactato de sódio 2,4% aos revestimentos (REV2; REV5; REV6 e REV8) facilitou a dissolução dos reagentes. Após aplicação do revestimento, as amostras que mergulharam em CaCl_2 , apresentaram-se ligeiramente baças. O revestimento solidificou instantaneamente.
- c) Os revestimentos de quitosano apresentaram um comportamento vantajoso em relação aos anteriores, na medida em que todos aderiam muito bem ao produto alimentar e não apresentavam uma viscosidade elevada. Porém os revestimentos com natamicina imobilizada (REV4, REV6, REV7 e REV8) apresentaram dificuldades de dissolução do agente antimicrobiano. Mas, de entre estes quatro revestimentos,

os que tinham lactato de sódio 2,4% na sua composição continuavam a aparentar uma maior dissolução, visto que o revestimento se apresentava mais límpido.

- d) Nas amostras que foram sujeitas ao banho de cloretos foi perceptível quais os revestimentos que de facto melhor aderiam ao produto, pois como solidificava logo era possível verificar visualmente a existência de zonas onde o revestimento não tinha aderido de forma adequada; ao adicionar-se nisina aos revestimentos, estes adquiriam uma cor ligeiramente acastanhada, mas que não interferia no aspeto das amostras após aplicação; os revestimentos de quitosano, em comparação com os de alginato e k-carragenina revelaram ser os que tecnologicamente eram mais viáveis; e os que possuíam lactato de sódio 2,4% na sua constituição apresentavam uma maior dissolução dos componentes, ajudando assim a que o revestimento adquirisse uma consistência menos viscosa.

5.1.2. Taxa de transferência de massa permitida pelo revestimento

Não foi possível determinar a taxa de transferência de massa efetuada pelo revestimento, uma vez que as pesagens não foram conclusivas. Diversos parâmetros contribuíram para a variação de massa, tais como a perda de humidade e perda de gordura, possivelmente no fabrico do enchido em teste utilizaram-se gorduras moles que se liquefazem mais facilmente à temperatura ambiente.

5.1.3. Efeito dos diferentes revestimentos ativos em rodelas de chouriço

Os resultados das contagens das colónias de bolores e leveduras foram inconclusivas uma vez que entre as diferentes amostras, os resultados foram sempre <10 UFC/g (nem o controlo apresentou contagens relevantes). O que se deve ao facto de o chouriço utilizado para o efeito ter sido um chouriço corrente (em vez de tradicional), apresentando-se pouco contaminado – por ter sofrido um processamento térmico. Assim, com esta análise microbiológica, nada se pode concluir acerca do efeito redutor dos antimicrobianos (nisina e natamicina) incorporados nos revestimentos aplicados nas amostras.

Contudo, a decisão relativa aos revestimentos que seguiram para a próxima fase de estudo teve por base o comportamento tecnológico dos diferentes revestimentos testados. Assim os revestimentos que prosseguiram no estudo foram os que eram constituídos pela matriz de quitosano e com lactato de sódio na sua composição (REV2, REV5, REV6 e REV8).

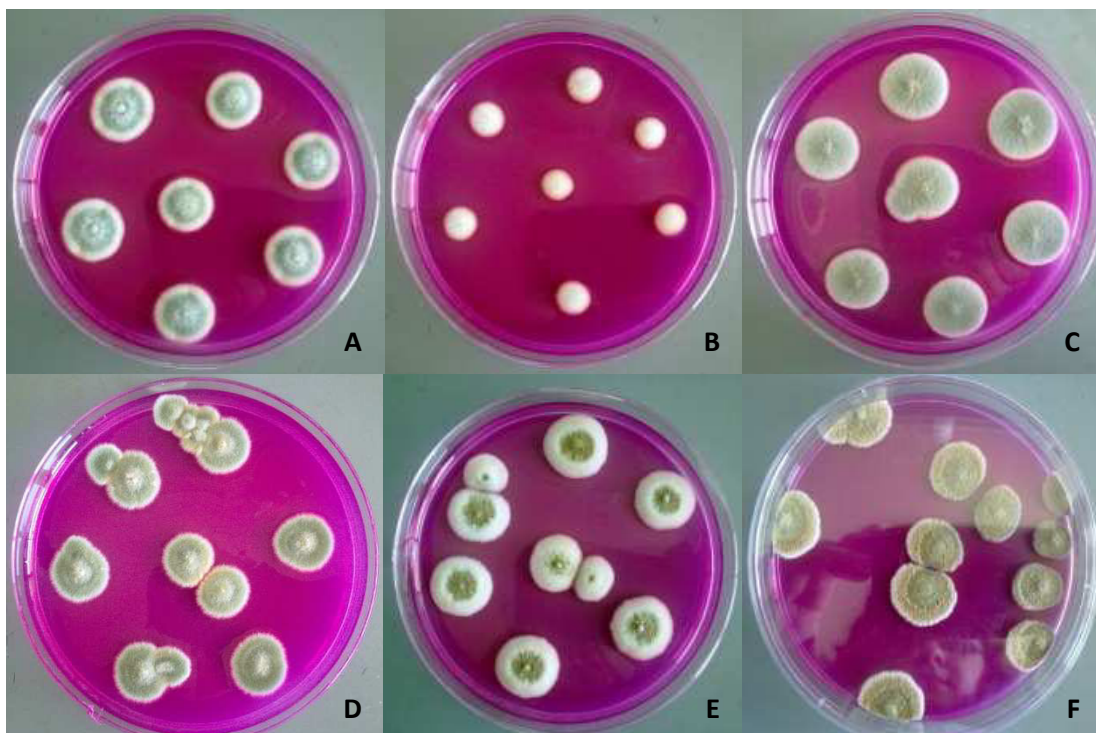
5.2. Fase II: Isolamento de fungos e determinação da concentração mínima inibitória da natamicina (MIC)

5.2.1. Identificação de fungos

A partir dos produtos cárneos presunto e chouriço tradicional Português foi possível isolar e identificar sete fungos distintos: *Penicillium funiculosum*, *Penicillium pulvillorum*, *Penicillium*

janthinellum, *Penicillium mirabile*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium humuli* e uma levedura, *Candida sp.* (Ramirez, 1982). Na Figura 4 podemos observar a morfologia da colônia dos *Penicillium* spp identificados.

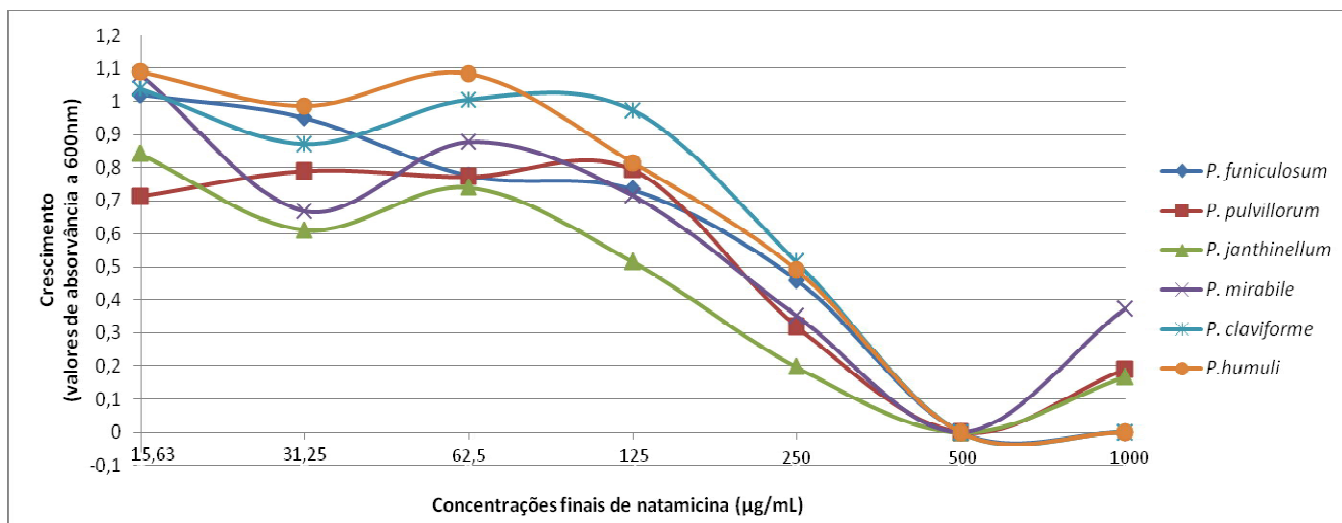
Figura 4 - Identificação de bolores desenvolvidos na superfície de produtos cárneos transformados. A – *P. janthinellum*; B – *P. mirabile*; C – *P. claviforme*; D – *P. humuli*; E – *P. pulvillorum*; F – *P. funiculosum*.



5.2.2. Concentração Mínima Inibitória da Natamicina (MIC)

Os resultados obtidos na determinação da concentração mínima inibitória da Natamicina para os bolores *Penicillium funiculosum*, *Penicillium pulvillorum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium mirabile*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium humuli* encontram-se representados no Gráfico 1. Pela sua análise é possível verificar um acentuado decréscimo no desenvolvimento fúngico nas concentrações de 250 µg/mL e 500 µg/mL. A concentração de antifúngico de 250 µg/mL refere-se à MIC₅₀ enquanto que a de 500 µg/mL corresponde à MIC₁₀₀.

Gráfico 1 – Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) da natamicina para diferentes espécies de *Penicillium*.



5.3. Fase III: Aplicação dos revestimentos em tripa seca natural

5.3.1. Taxa de transferência de massa permitida pelo revestimento

Não foi possível estimar a taxa de transferência de massa permitida pelo revestimento, pois a partir do vigésimo dia, devido ao fato de ter sido submetida a um ambiente mais húmido, tal como descrito na metodologia, observou-se grande oscilação e desvio das pesagens.

5.3.2. Efeito da aplicação dos revestimentos na tripa seca natural

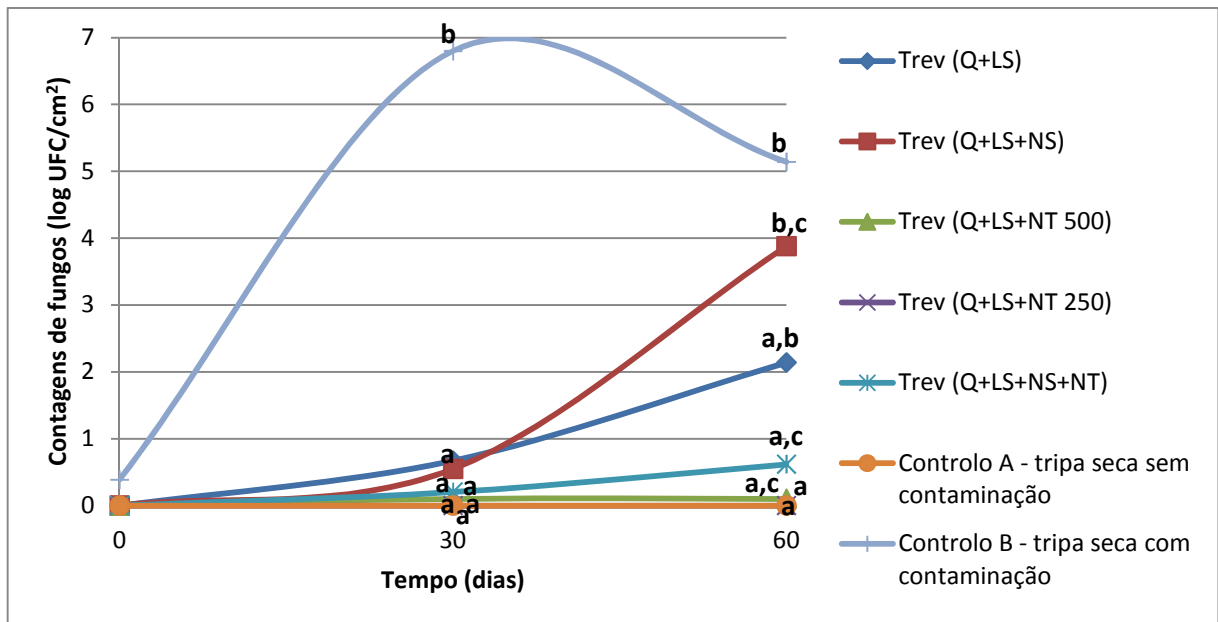
No Gráfico 2 observam-se as contagens de bolores efetuadas ao longo do tempo de armazenamento da tripa não inoculada com os diferentes revestimentos em estudo. Verificou-se que no tempo zero, entre a tripa controlo não contaminada (tripa controlo A) e todas as restantes amostras em estudo não se registaram diferenças significativas na contagem de bolores ($p > 0,05$). A tripa controlo contaminada (tripa controlo B), apresentou inicialmente uma contagem de $0,4 \pm 0,03$ log UFC/g enquanto as restantes não apresentaram qualquer crescimento.

Após 30 dias de armazenamento, foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre a tripa controlo B e todas as restantes amostras (Q+LS; Q+LS+NS; Q+LS+NT₅₀₀; Q+LS+NT₂₅₀; Q+LS+NS+NT), incluindo a tripa controlo A. Para a tripa controlo B houve um crescimento de $6,8$ log UFC/cm², enquanto que para as cinco amostras apenas se registaram valores compreendidos entre 0 e $0,7$ log UFC/cm², sem diferenças estatisticamente significativas entre si e a tripa controlo A (0 log UFC/cm²).

Aos 60 dias de armazenamento verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre a tripa controlo B ($5,1$ log UFC/cm²) e as amostras Q+LS+NT₅₀₀ ($0,1$ log UFC/cm²); Q+LS+NT₂₅₀ (0 log UFC/cm²) e Q+LS+NS+NT ($0,6$ log UFC/cm²). As amostras Q+LS ($2,1$

log UFC/cm²) e Q+LS+NS (3,9 log UFC/cm²) não foram significativamente diferentes da tripa controlo B.

Gráfico 2 – Contagens de bolores ao longo do tempo de armazenamento, para os diferentes revestimentos na condição: tripa revestida sem aplicação de inóculo.



abc- letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ver anexo I)

No que respeita à contagem de bolores ao longo do tempo de armazenamento para as tripas contaminadas antes da aplicação dos diferentes revestimentos (Gráfico 3) verificou-se que no tempo 0 não existem diferenças significativas entre a tripa controlo B e todas as amostras, mas sim entre estas e a tripa controlo A.

Após 30 dias de armazenamento verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a tripa controlo A (0 log UFC/cm²) e todas as cinco condições de revestimento de tripa em estudo, as quais apresentaram contagens muito baixas com valores entre 0 e 0,5 log UFC/cm². Todas estas amostras apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à tripa controlo B (6,8 log UFC/cm²).

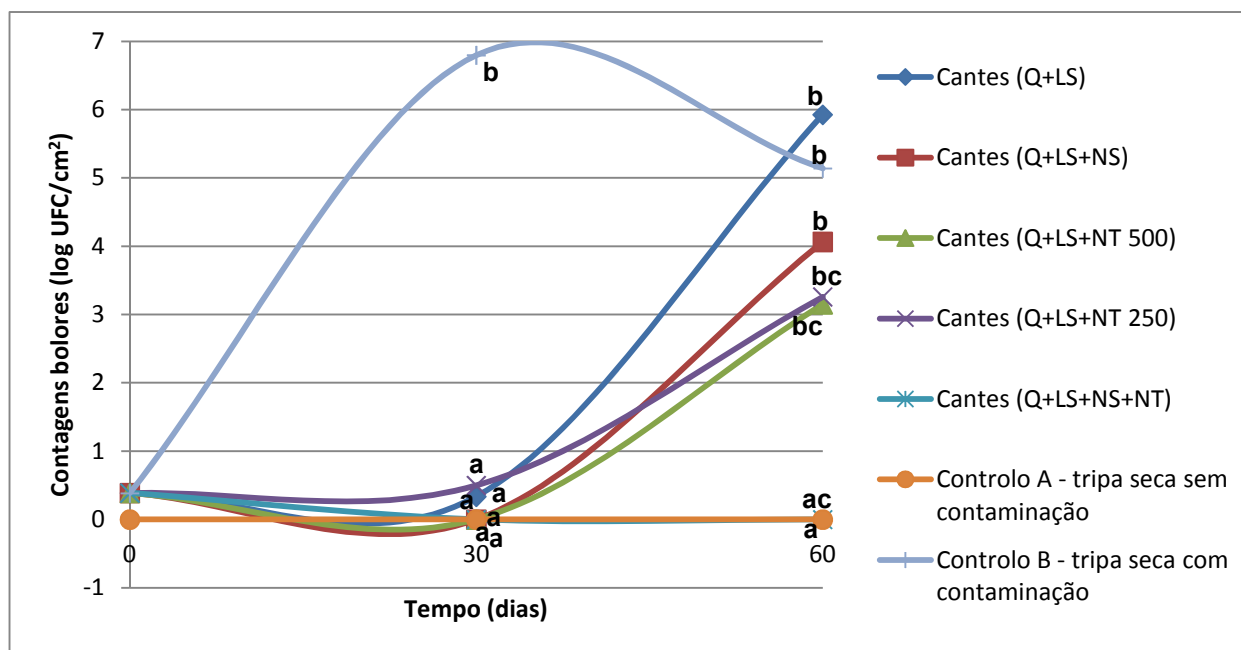
Ao fim de 60 dias de armazenamento a tripa revestida com Q+LS+NS+NT (0 log UFC/cm²) foi a única que apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação à tripa controlo B.

As tripas com os revestimentos Q+LS (5,9 log UFC/cm²); Q+LS+NS (4,1 log UFC/cm²); Q+LS+NT₅₀₀ (3,2 log UFC/cm²) e Q+LS+NT₂₅₀ (3,3 log UFC/cm²) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à tripa controlo B, no entanto as tripas revestidas por natamicina, Q+LS+NT₅₀₀, Q+LS+NT₂₅₀ e Q+LS+NS+NT, não apresentaram diferenças entre si.

Relativamente ao efeito do tempo para cada um dos revestimentos verificou-se que a tripa com o revestimento de Q+LS ao fim de 30 dias mantinha valores idênticos aos do dia inicial,

não havendo diferenças estatisticamente significativas entre eles. Entre o tempo 0 e 60 dias registou-se um aumento significativo de 5,5 log UFC/cm². No que respeita aos revestimentos de Q+LS+NS e Q+LS+ NT₅₀₀ as amostras apresentaram um comportamento idêntico entre si: ao fim de 30 dias não se registaram contaminações, e ao fim de 60 os bolores atingiram valores de 4,1±2,0 e 3,2±4,5 log UFC/cm², para o revestimento de Q+LS+NS e de Q+LS+NT₅₀₀, respetivamente.

Gráfico 3 – Contagens de bolores ao longo do tempo de armazenamento, para os diferentes revestimentos na condição: tripa contaminada antes da aplicação do revestimento.



abc- letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ver anexo I)

A tripa revestida de Q+LS+NT₂₅₀ apesar de ter uma contagem de 3,3 log UFC/ cm² aos 60 dias de armazenamento, este valor não foi considerando significativamente diferente do apresentado em dias anteriores; a tripa revestida de Q+LS+NS+NT apresentou-se sem desenvolvimento de bolores aos 30 dias e assim se manteve após 60 dias de armazenamento. No entanto, apesar de aos 60 dias este revestimento apresentar contagens de 0 log UFC/ cm² e os restantes revestimentos de natamicina não, neste período de tempo não houve diferenças estaticamente significativas no crescimento de fungos entre os três revestimentos em estudo com natamicina imobilizada.

O Gráfico 4 apresenta-nos os resultados relativos à contagem de bolores ao longo do tempo de armazenamento da tripa contaminada após a aplicação dos diferentes revestimentos. Aqui foi possível verificar uma vez mais que para o tempo inicial todas as amostras apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à tripa controlo A, mas não em relação à tripa controlo B.

Posteriormente, aos 30 dias de armazenamento, a contagem de bolores da tripa controlo A (0 log UFC/cm²) foi significativamente menor do que as obtidas nas amostras revestidas

com Q+LS+NS (3,6 log UFC/cm²) e com Q+LS (7,0 log UFC/cm²); este último revestimento não teve qualquer efeito inibitório sobre os bolores apresentando contagens semelhantes às da tripa controlo B (6,8 log UFC/cm²). Nas tripas revestidas com Q+LS+NT₅₀₀ (0 log UFC/cm²), Q+LS+NT₂₅₀ (0,6 log UFC/cm²) e Q+LS+NS+NT (0 log UFC/cm²) o crescimento de bolores foi inibido

Aos 60 dias de armazenamento, observou-se um crescimento significativo de bolores nas tripas revestidas de Q+LS (5,5 log UFC/cm²) e Q+LS+NS (3,3 log UFC/cm²). Estas contagens foram semelhantes às obtidas na tripa controlo B (5,1 log UFC/cm²). Os revestimentos constituídos pelo agente antifúngico imobilizado Q+LS+NT₅₀₀ (0,4 log UFC/cm²); Q+LS+NT₂₅₀ (1,2 log UFC/cm²) e Q+LS+NS+NT (0,3 log UFC/cm²) não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si, nem em relação à tripa controlo A, o que significa que nos três casos a ação antifúngica revelou-se eficaz.

Analisando cada revestimento ao longo do tempo verificamos que não existiram diferenças significativas ao longo dos 60 dias no que respeita aos revestimentos de Q+LS+NS e Q+LS+NT₂₅₀, apesar de se registar desenvolvimento fúngico. Porém, enquanto que a tripa com o revestimento de nisina apresentou um aumento de 4,7 log UFC/cm² do dia 0 para o dia 60, a tripa revestida de natamicina só apresentou um ligeiro crescimento de 0,8 log UFC/cm².

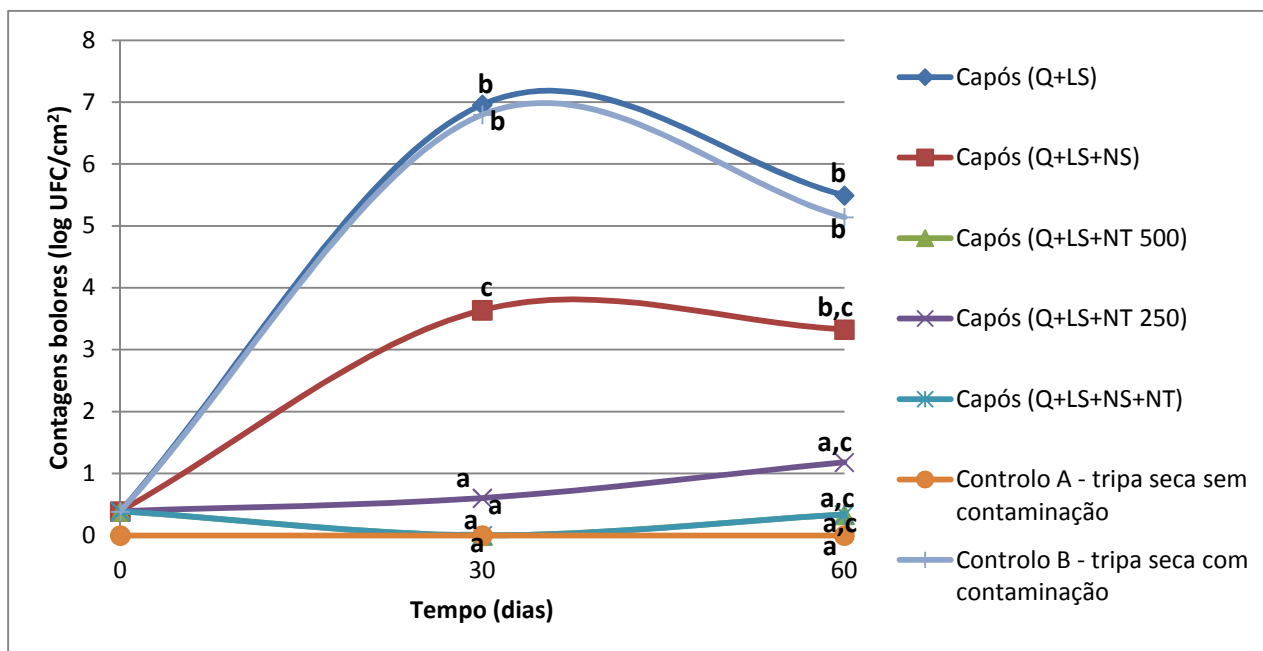
Relativamente às outras três condições de revestimento (Q+LS; Q+LS+NT₅₀₀ e Q+LS+NS+NT), todas revelaram diferenças significativas no crescimento entre os tempos de armazenamento 0 e 30, mas não em relação ao tempo 60. Com o revestimento Q+LS verificou-se crescimento de bolores, tendo-se registado um aumento de 5,1 log UFC/cm² entre o tempo 0 e 60.

No Gráfico 5, apresentam-se os resultados da contagem de aeróbios totais nas tripas revestidas com Q+LS+NS ao longo do tempo de armazenamento, para as diferentes condições de aplicação. Entre o tempo 0 e os 60 dias as contagens aumentaram de um modo bastante significativo, para todas as diferentes condições e revestimentos, não se verificando qualquer tipo de inibição bacteriana por parte da nisina. Inicialmente, para as tripas controlos A e B registaram-se valores de 0,7 e 0,9 log UFC/cm², respetivamente. Ao final de 60 dias essas contagens já se encontravam em 7,0 log UFC/cm² para a tripa controlo A e 7,9 log UFC/cm² para a tripa controlo B.

Estes resultados foram idênticos em todos os restantes revestimentos em estudo (ver anexo I).

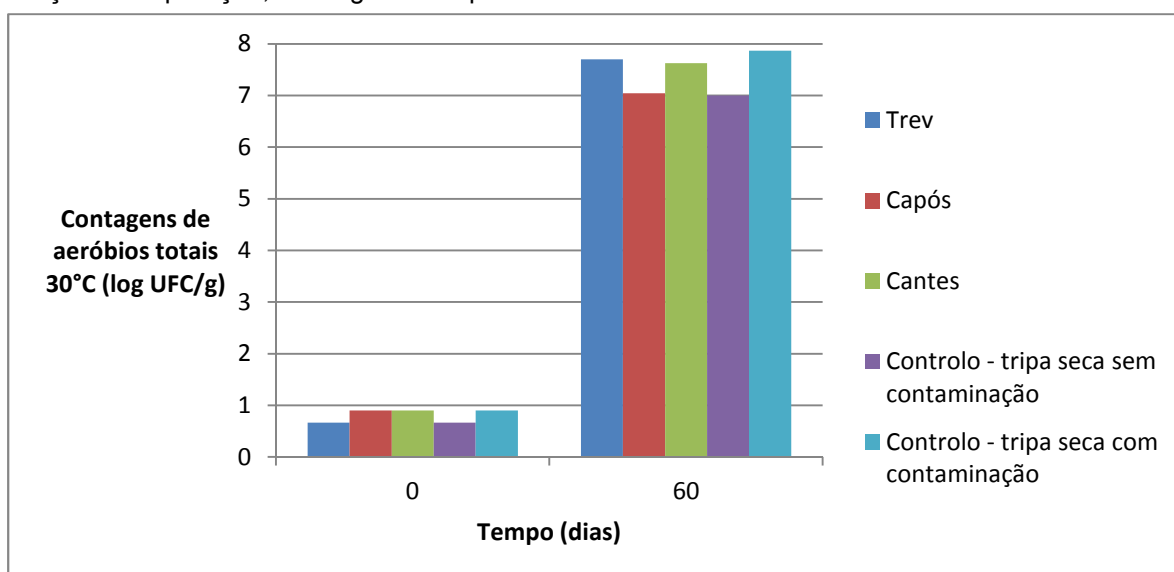
A microflora dominante nas contagens de aeróbios totais obtidas nas tripas em estudo eram bactérias gram-positivas em forma de bacilos que se encontraram inicialmente presentes na tripa seca natural (contaminada e não contaminada) e que permaneceram e dominaram as contagens ao fim de 60 dias.

Gráfico 4 – Contagens de bolores ao longo do tempo de armazenamento, para os diferentes revestimentos na condição: tripa contaminada após a aplicação do revestimento.



abc- letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ver anexo I)

Gráfico 5 – Contagens de aeróbios totais a 30 °C para a tripa revestida por Q+LS+NS nas diferentes condições de aplicação, ao longo do tempo de armazenamento.



5.4. Fase IV: Efeito da aplicação do revestimento ativo no chouriço tradicional Português

5.4.1. Efeito dos revestimentos nas características microbiológicas do chouriço

Tal como se pode observar no Gráfico 6 as contagens iniciais de fungos no chouriço controlo em estudo foram de $3,0 \pm 1,1$ log UFC/g não se verificando qualquer diferença

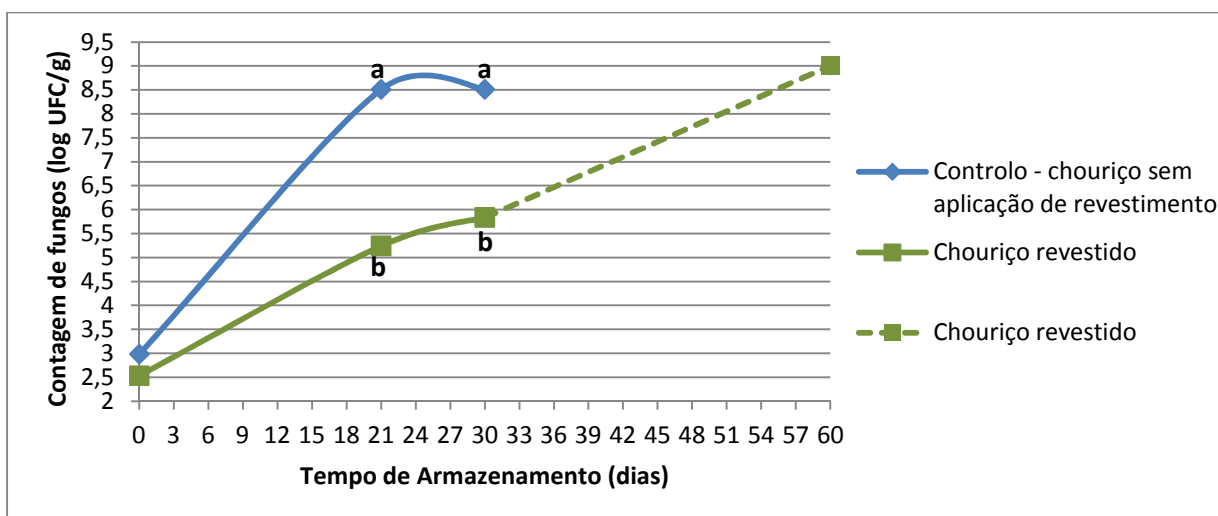
estatística com as obtidas no chouriço com o revestimento aplicado, $2,5 \pm 1,6$ log UFC/g (ver anexo II).

Ao fim de 21 dias de armazenamento foi notória e significativa a diferença existente entre o chouriço controlo que apresentou um crescimento de $8,5 \pm 0,1$ log UFC/g e o chouriço revestido $5,2 \pm 0,8$ log UFC/g. Em ambos os casos houve um aumento do crescimento em relação ao tempo zero, existindo diferenças estatísticas entre os tempos 0 e 21 para o chouriço controlo, diferenças essas que não se registaram no chouriço revestido.

Passados 30 dias de armazenamento manteve-se a diferença estatística do crescimento entre a amostra não revestida ($8,4 \pm 0,1$ log UFC/g) e revestida ($5,8 \pm 0,6$ log UFC/g). Para o chouriço controlo não se registaram alterações em relação aos 21 dias, tal como aconteceu com o chouriço revestido, o qual continuou sem apresentar diferenças estatísticas nas contagens de fungos em relação ao tempo inicial.

Após um armazenamento de 60 dias das amostras em estudo em refrigeração, verificou-se que existiu uma diferença significativa no crescimento de bolores no chouriço revestido, os valores das contagens registadas foram semelhantes às obtidas no chouriço controlo com 30 dias.

Gráfico 6 – Contagens de fungos desenvolvidos no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento.



ab- letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ver anexo II)

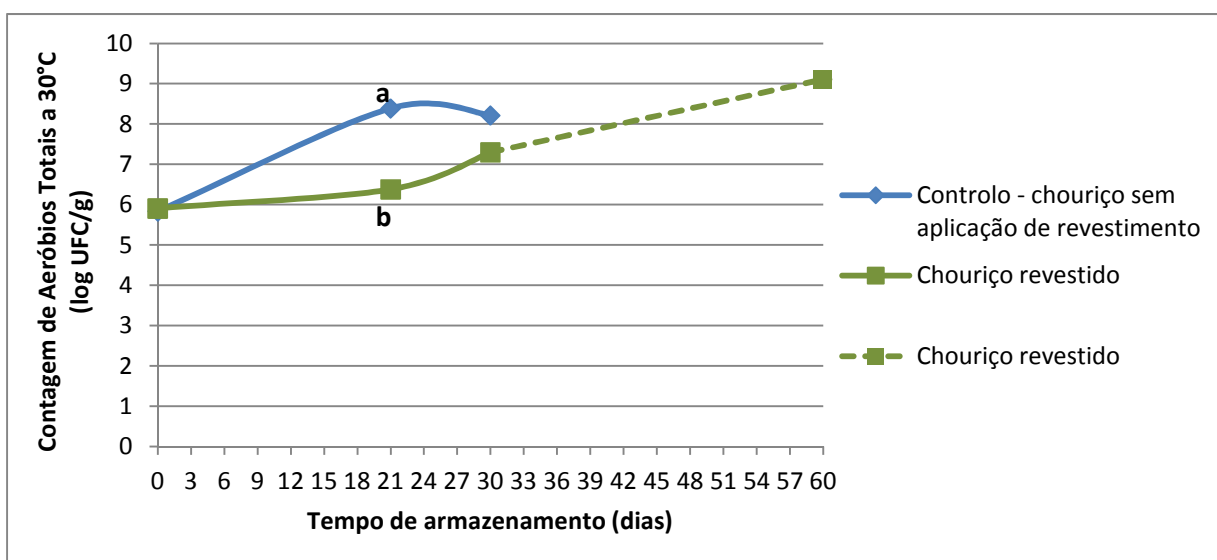
O Gráfico 7 mostra-nos o desenvolvimento dos aeróbios totais a 30°C registado nas amostras submetidas às condições em estudo. Apesar de inicialmente não existirem diferenças significativas entre as amostras chouriço controlo ($5,8 \pm 1,0$ log UFC/g) e chouriço revestido ($5,9 \pm 0,7$ log UFC/g), ao final de 21 dias o crescimento registado foi estatisticamente diferente, apresentando o chouriço controlo $8,4 \pm 0,1$ log UFC/g e o chouriço revestido $6,4 \pm 0,7$ log UFC/g. O aumento das contagens observadas no chouriço controlo entre o tempo inicial de armazenamento e os 21 dias foi significativo enquanto no chouriço

revestido o crescimento observado não foi significativamente diferente entre os dois momentos de armazenamento.

Após 30 dias de armazenamento, já não se registaram diferenças entre as amostras controlo e revestidas, contudo o chouriço revestido teve uma contagem de $7,3 \pm 0,7$ log UFC/g que não diferiu significativamente da obtida aos 21 dias. Ao fim de 60 dias o chouriço revestido ($9,1 \pm 0,5$ log UFC/g) apresentou uma contagem de aeróbios totais semelhante à obtida pelo chouriço controlo ($8,1 \pm 0,2$ log UFC/g) aos 30 dias de armazenamento.

Em relação às bactérias dominantes nesta contagem desenvolvidas nas amostras de chouriço (revestido e não revestido), ao longo do tempo, verificou-se que em todos os casos estamos perante cocos gram-positivos o que é corroborado pelas contagens de *Staphylococcus* apresentadas no Gráfico 8.

Gráfico 7 – Contagens de aeróbios totais a 30 °C desenvolvidos no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento.

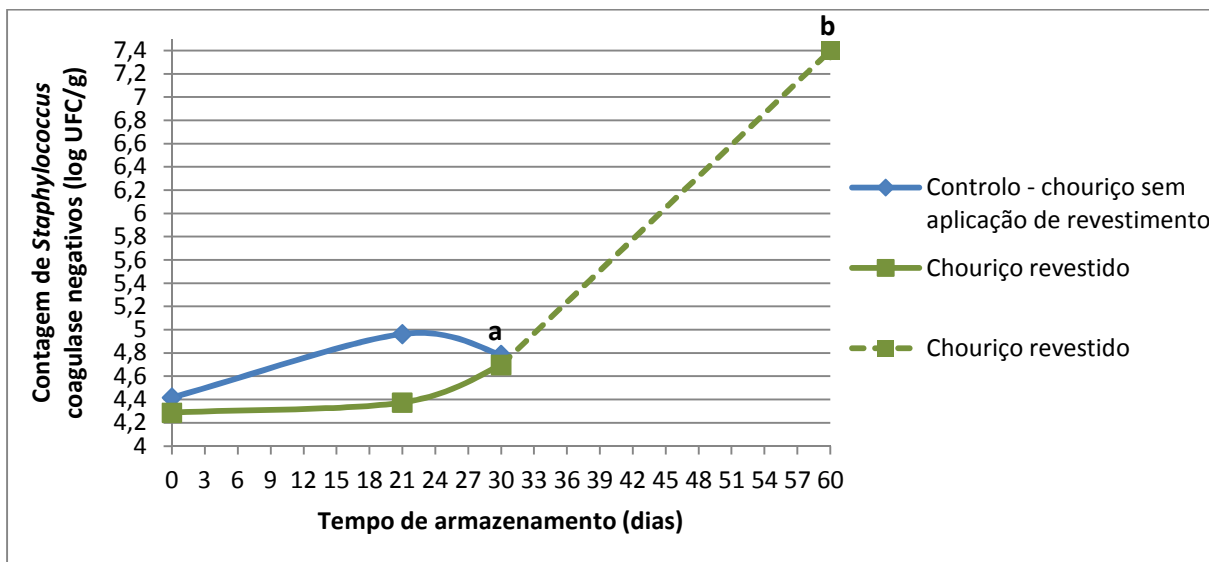


ab- letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ver anexo II)

No chouriço controlo e revestido as contagens de *Staphylococcus* coagulase negativos (Gráfico 8) não apresentaram ser significativamente diferentes ao longo do tempo de armazenamento, nem comparando as duas amostras em cada um dos tempos de armazenamento. O chouriço revestido ao fim de 60 dias ($7,4 \pm 0,5$ log UFC/g), apresentou contagens com diferenças em relação aos 30 dias ($4,7 \pm 0,8$ log UFC/g) assim como para o controlo ($4,8 \pm 0,6$ log UFC/g). Relativamente ao crescimento de bactérias do ácido láctico (LAB), representadas no Gráfico 9, estas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo, quer no caso do chouriço controlo com no do chouriço revestido. Comparando as duas amostras ao longo do tempo, nunca foram registadas diferenças exceto ao fim de 60 dias. O chouriço revestido apresentou aos 60 dias de

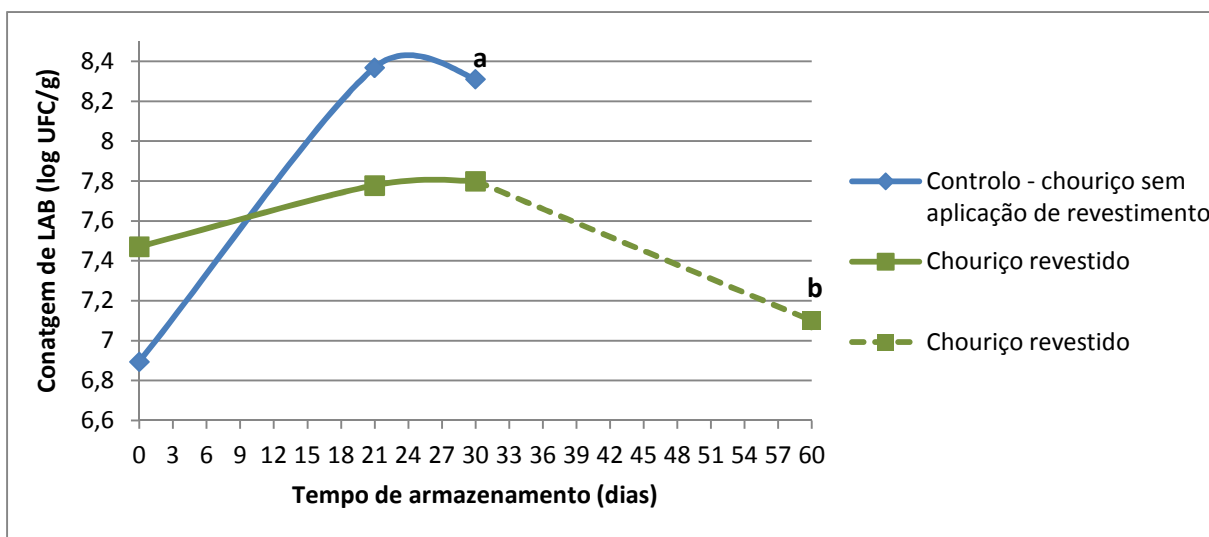
armazenamento contagens de $7,1 \pm 0,4$ log UFC/g significativamente mais baixas do que as apresentadas pelo chouriço controlo ao fim de 30 dias ($8,3 \pm 0,2$ log UFC/g).

Gráfico 8 – Contagens de *Staphylococcus* coagulase negativos desenvolvidos no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento.



ab- letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ver anexo II)

Gráfico 9 – Contagens de LAB desenvolvidas no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento.



ab- letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ver anexo II)

As *Pseudomonas* foram também analisadas nas amostras em estudo (chouriço revestido e controlo) ao longo do tempo, no entanto, nunca se verificou qualquer crescimento destas bactérias.

5.4.2. Resultados físico-químicos

No que respeita à determinação do pH do chouriço (Gráfico 10) verificou-se que para os diferentes tempos de análise (0; 21; 30 e 60 dias) e comparando as duas amostras entre si, nunca se registaram alterações estatisticamente significativas no valor deste parâmetro. Por outro lado, a amostra revestida revelou ter um pH estatisticamente semelhante ao longo do tempo (pH=5,3±0,58 a 6,3±0,82) apesar do ligeiro aumento observado. No chouriço controlo, registou-se entre os 21 e 30 dias de armazenamento, um ligeiro aumento dos valores de 5,6±0,01 log UFC/g para 6,0±0,08 log UFC/g, respetivamente mas sem significado estatístico.

A atividade da água (Gráfico 11) revelou ser estatisticamente semelhante entre o chouriço controlo (0,95±0,001 log UFC/g) e o revestido (0,94±0,006 log UFC/g) no tempo zero e 21 dias, ao contrário do que aconteceu nos restantes tempos de armazenamento, onde se verificaram diferenças estatísticas entre as duas amostras.

Para o chouriço controlo, verificou-se que entre os 0 e os 21 dias não existiram diferenças estatísticas entre os valores de a_w , tal como aconteceu entre os 21 e os 30 dias.

O chouriço revestido não registou alterações de atividade da água que fossem significativas ao longo dos primeiros 30 dias de armazenamento, ao contrário do que se sucedeu ao fim de 60 dias.

Gráfico 10 – Nível de acidez (pH) no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento.

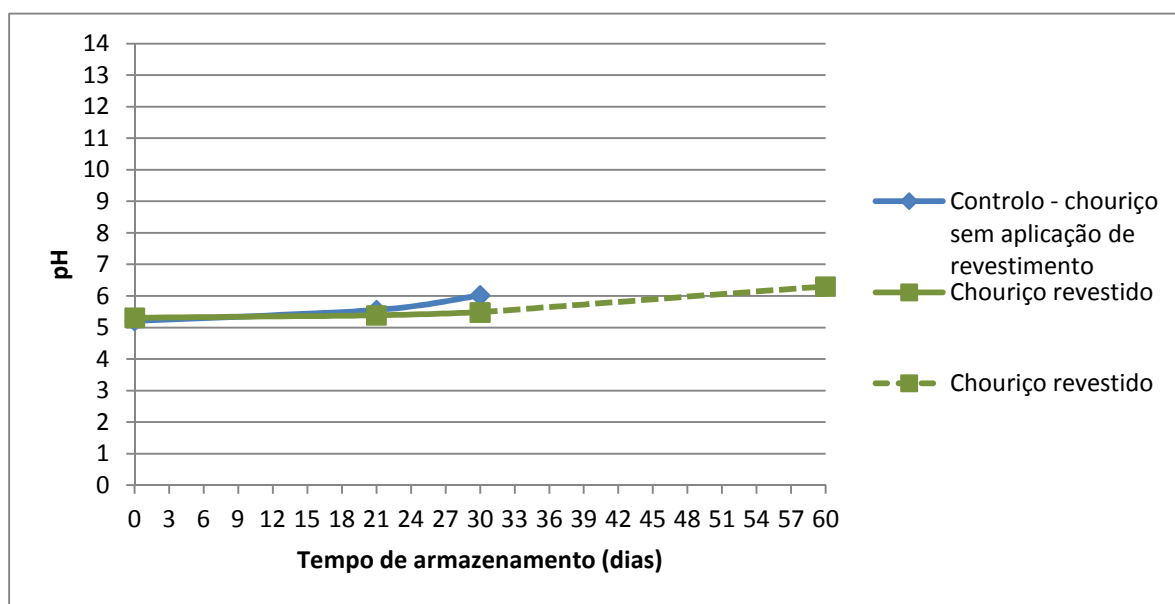
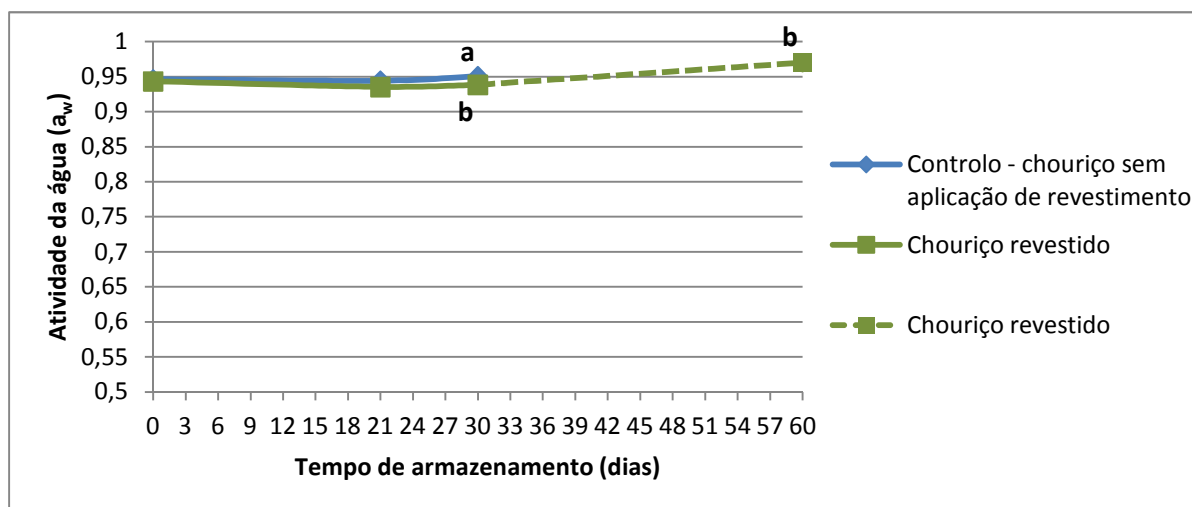


Gráfico 11 – Nível de atividade da água presente no chouriço controlo e revestido, ao longo dos 60 dias de armazenamento.



ab- letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ver anexo II)

5.4.3. Determinação da quantidade de revestimento aplicado por dm^2 de superfície de chouriço

5.4.3.1. Densidade do revestimento

Na Tabela 9 apresentam-se as pesagens efetuadas ao chouriço antes e após a aplicação do revestimento, assim como o comprimento e diâmetro do produto. A densidade foi também determinada para que deste modo fosse calculada a quantidade de revestimento aplicado sobre 1 dm^2 de superfície de chouriço.

Com os valores obtidos estimou-se que o valor de Natamicina incorporado no revestimento aplicado no chouriço foi aproximadamente de $0,1 \text{ mg dm}^{-2}$.

Tabela 9 – Pesagens efetuadas ao chouriço antes e após aplicação do revestimento e, densidade do revestimento constituído por quitosano, lactato de sódio e natamicina (250 µg/mL).

Pesagens e medições ao chouriço		Área superfície do chouriço
Comprimento	39 cm	381,71 cm ²
Diâmetro	3 cm	
Peso inicial	264,30 g	
Peso após aplicação do revestimento	265,89 g	
Densidade pelo método do picnómetro		Densidade
Ensaio com água	Ensaio com o revestimento	1,0074 g/mL
T = 25 °C	T = 25 °C	
m _{picnómetro} = 43,1376 g	m _{picnómetro} = 43,1376 g	
m _{água} = 68,0500 g	m _{revestimento} = 68,3078 g	
Densidade pelo método de densimetria		Densidade
T = 25,00 °C		1,0072±0,0003 g/mL

6. DISCUSSÃO

Na carne e nos produtos cárneos, a contaminação microbiológica surge maioritariamente sobre a superfície do género alimentício, existindo a necessidade de tentar controlar esta microflora, a qual, nos chouriços, é representada principalmente pelos fungos: bolores e leveduras. Assim surgiu a ideia de se aplicar um revestimento ativo comestível sobre o chouriço (Coma, 2008).

Após alguma pesquisa bibliográfica sobre o desenvolvimento e aplicações de revestimentos em produtos alimentares, rapidamente se constatou que este é um assunto relativamente pioneiro. Estão documentados alguns estudos, nomeadamente para aplicações em frutas (Cong *et al.*, 2007; María Alejandra Rojas-Graü, Soliva-Fortuny & Martín-Belloso, 2009; M. A. Rojas-Graü *et al.*, 2007) e produtos lácticos – para controlar o crescimento de bolores na superfície de queijos (Fajardo *et al.*, 2010).

Em 2010, Juck *et al.*, num estudo de aplicação dos revestimentos ativos com o objetivo de controlo do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em fatias de carne de peru, verificaram que os revestimentos de alginato foram eficazes na inibição de *L. monocytogenes* (Juck *et al.*, 2010).

A falta de informação científica documentada sobre a aplicação de revestimentos ativos comestíveis em produtos cárneos fermentados continua e o indesejado desenvolvimento de microflora na superfície de chouriço tradicional Português, conduziram-nos a esta aposta na investigação de formulações de revestimentos ativos destinados a serem aplicados sobre a superfície de produtos cárneos fermentados. Os nossos revestimentos foram desenvolvidos com base nos estudos de Juck *et al.*, (2010) e Fajardo *et al.*, (2010).

Os revestimentos foram desenvolvidos com base em polissacarídeos, sendo eles o alginato, a k-carragenina e o quitosano. Para além de serem polissacarídeos naturais com diferentes aplicabilidades na indústria alimentar, foram também selecionados com base nas suas vantajosas características tecnológicas: o quitosano é um agente antimicrobiano, possuindo características que o tornam ativo contra fungos e é reconhecido como GRAS; por sua vez, os alginatos têm uma boa capacidade para formar hidrogéis e são utilizados como gelificantes e espessantes e integram a lista de aditivos alimentares autorizados; já a k-carragenina é descrita como tendo capacidade gelificante, emulsionante e de atuar como agente de estabilização (EFSA, 2001; Coma, 2008; Moreno-Garrido, 2008 ; Diretiva 2009/10/CE; Hambleton *et al.*, 2009 ; Aider, 2010; Decreto-Lei nº94/2010; ASAE, 2011; Falguera *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012).

Como parte integrante da formulação dos diferentes revestimentos em estudo, para além dos agentes antimicrobianos, utilizaram-se também o ácido acético; lactato de sódio; tween 80 e glicerol (estando este dois últimos apenas presentes na constituição dos revestimentos com matriz de quitosano). Os referidos componentes têm funções tecnológicas específicas, ajudando na formação do revestimento.

Os revestimentos constituídos por matrizes de alginato e de k-carragenina tiveram uma formulação diferente da dos constituídos por quitosano. Os dois primeiros não tinham qualquer agente plastificante ou emulsionante, pelo que demonstraram ter grandes dificuldades tecnológicas. Ficaram muito espessos, com bolhas e grumos por dissolver, possivelmente devido à falta dos referidos agentes na sua constituição. Na verdade, os plastificantes são essenciais na formação dos revestimentos ativos que têm como matriz de base polissacarídeos ou proteínas, pois vão permitir um aumento da flexibilidade e capacidade de formar um filme, através da diminuição das pontes de hidrogénio existente entre as cadeias constituintes do polímero, havendo assim um aumento do espaço intermolecular. Podem também aumentar a permeabilidade ao oxigénio. Apesar de estarmos a estudar revestimentos e não filmes, a utilização de um agente plastificante continua a ser fundamental para diminuir as forças intramoleculares existentes e assim tornar as cadeias mais flexíveis e conseqüentemente adquirirmos uma solução de revestimento pouco espessa (Rojas-Graü *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009 ; Pintado *et al.*, 2010 ; Lian *et al.*, 2012; Paşcalău *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2012). Assim, o agente plastificante utilizado nas matrizes de quitosano, o glicerol, facilitou a conceção do revestimento.

Os revestimentos de quitosano apresentaram-se muito mais eficientes, do ponto de vista tecnológico, não tão viscosos e com uma maior dissolução dos componentes e sem formação de grumos. Nestas matrizes de quitosano foi utilizado Tween 80 a uma concentração de 0,20% e que poderá ter contribuído para a melhor dispersão do revestimento sem formação de bolhas ou grumos. O tween 80 pertence à categoria dos emulsionantes utilizados na área alimentar. De acordo com Pintado *et al.*, (2010), os emulsionantes alimentares são conhecidos por serem compostos não iónicos e por inibirem o crescimento de variados microrganismos, em especial as bactérias gram-positivas e os fungos, quando utilizado sozinho ou em combinação com um agente antimicrobiano ou ácidos orgânicos. Estes autores afirmaram que a utilização de tween 80 a 0,15% como parte integrante da composição de um filme comestível, não afetou a atividade antimicrobiana da nisina nem da natamicina contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Yarrowia lipolytica*, mas sim contra *Listeria monocytogenes* e *P.commune* e *P.chrysogenum*.

O lactato de sódio foi adicionado em alguns dos nossos revestimentos. De acordo com Nykänen *et al.*, (2000), o lactato de sódio retarda o crescimento bacteriano em carne suína, e a combinação do lactato de sódio com nisina tem um efeito sinérgico, tendo sido eficaz na inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em peixe fumado e contra algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas (Nykänen *et al.*, 2000). Porém, o lactato de sódio juntamente com o ácido acético forma o ácido láctico. Este ácido é frequentemente utilizado como aditivo alimentar (visto ser um agente antioxidante) a fim de preservar os alimentos, através da redução/eliminação do crescimento das bactérias patogénicas e de deterioração

(Ramos *et al.*, 2012). De acordo com Ramos *et al.*, (2012), o ácido láctico tem um efeito bactericida contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; não exerce qualquer efeito antimicrobiano contra fungos (baixa eficácia contra leveduras), e é mais eficaz contra bactérias gram-positivas do que gram-negativas (Ramos *et al.*, 2012). Um outro composto eficaz na prevenção do desenvolvimento de leveduras na superfície de produtos alimentares é o ácido propiónico (Ramos *et al.*, 2012).

De acordo com Mastromatteo *et al.*, (2010), os ácidos orgânicos (de que são exemplo o ácido láctico e o ácido acético) são agentes antimicrobianos com variadas aplicações alimentares, sendo ativos contra fungos e bactérias (Mastromatteo *et al.*, 2010).

Em relação aos agentes antimicrobianos incorporados, estes foram selecionados de acordo com os microrganismos alvo. Visto que o nosso objetivo passava pela inibição de fungos na superfície de chouriço, optamos pela natamicina. Por outro lado queríamos avaliar também se a nisina inibiria as bactérias que se desenvolvem no chouriço, ou eventualmente, se existiria um possível efeito sinérgico entre estes dois antimicrobianos. De acordo com Ramos *et al.*, 2012, a natamicina apresenta um forte efeito antimicrobiano contra leveduras, mas não contra bactérias, quando aplicado num filme comestível (Ramos *et al.*, 2012). A natamicina quando imobilizada num filme, com base em proteína de soro de leite, demonstrou inibição de *Yarrowia lipolytica* e *Penicillium commune* e *Penicillium chrysogenum*. Foi também verificado neste estudo que a nisina e a natamicina actuam de forma independente (sem efeito sinérgico ou antagónico) (Pintado *et al.*, 2010).

Porém, em todos os casos do presente estudo de revestimentos concebidos com natamicina foi notória a dificuldade de dissolução da natamicina, a qual se deve à fraca capacidade de solubilização da mesma em água. Também num estudo realizado por Bierhalz *et al.*, (2012) a incorporação de natamicina resultou num filme opaco devido à sua fraca solubilidade, e verificou-se uma redução significativa na resistência à tração, resultante das modificações induzidas com a sua incorporação nas características físicas do polímero. Verificaram também que os filmes de alginato tinham uma elevada opacidade, quando em comparação com os filmes de pectina, o que se pode dever ao grau de reticulação (Bierhalz *et al.*, 2012). Recentemente Bierhalz *et al.* (2012) referiram existir uma boa compatibilidade entre a natamicina e o alginato, criando filmes com boas propriedades físicas e com baixo coeficiente de difusão, ideais para aplicar em queijos e prevenir o desenvolvimento de bolores à superfície. Também, Siragusa e Dickson (citado por Kerry *et al.*, 2006), demonstraram que revestimentos de alginato (compostos por ácidos orgânicos), foram eficazes quando aplicados em carcaças de carne, reduzindo os níveis de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* e *E. coli* O157:H7 (Kerry *et al.*, 2006). Porém os nossos revestimentos de alginato revelaram-se inviáveis, talvez pela não utilização de um agente plastificante (glicerol) na sua composição, o qual é necessário para diminuir as forças intramoleculares e tornar as cadeias mais flexíveis. Num dos ensaios com revestimento de alginato, utilizou-se

um agente de reticulação (cloreto de cálcio), tal como sugerido por Silva *et al.*, (2009) mas não como parte integrante da sua composição, apenas posteriormente na aplicação do revestimento. A cadeia linear dos alginatos permite uma ligação eficaz com os iões de cálcio, permitindo uma reticulação eficaz pelo aumento das forças coesivas entre as cadeias (Bierhalz *et al.*, 2012). De qualquer modo, neste ensaio mais uma vez não tínhamos qualquer agente plastificante. Esta é a justificação sugerida para a inviabilidade dos revestimentos de alginato, uma vez que estes necessitam de cloreto de cálcio na sua composição (como agente de reticulação), o qual por sua vez vai desidratar o revestimento, sendo então necessário também um agente plastificante que permita uma maior flexibilidade do revestimento (Silva *et al.*, 2009 ; Bierhalz *et al.*, 2012). Assim a discrepância entre os resultados tecnológicos dos três tipos de revestimento é justificada uma vez que os revestimentos com matriz de quitosano têm um agente plastificante e emulsionante na sua constituição. A utilização de agentes de reticulação constitui uma maior dificuldade tecnológica pois torna-se necessário mais uma fase no processo.

Durante a aplicação dos revestimentos foi de imediato notória a gordura que se ia libertando da rodela de chouriço que estava a ser mergulhada no revestimento, do mesmo modo que foi possível detetar a existência de certas zonas na rodela deste enchido onde o revestimento não aderiu bem, o que pode dever-se ao facto de se perder gordura, tal fato no chouriço inteiro não acontece.

Após a aplicação dos revestimentos nas rodela de chouriço estas foram controladas ao longo do tempo para verificar perdas de massa. Uma vez que estavam envolvidos diversos fatores, de entre os quais se destacam as perdas de humidade e de gordura, não foi possível concluir qual a capacidade do revestimento em efetuar transferências de massa. Durante todo o tempo de armazenamento um outro fator que tivemos em consideração foi o cheiro, de modo a verificarmos se a aplicação do revestimento seria barreira à transferência do odor característico. Tal não se verificou, uma vez que o cheiro característico se manteve ao longo dos 19 dias de armazenamento.

O chouriço utilizado neste ensaio caracterizou-se por ter um processamento tecnológico com tratamento térmico e como tal foi reduzida a microflora inicial existente, particularmente fungos pelo que não se manifestou o crescimento de fungos e assim nada foi concluído acerca do efeito redutor dos revestimentos aplicados com base na análise microbiológica (contagem de fungos) realizada nas rodela de chouriço.

No entanto, esta fase do estudo foi essencial para a escolha dos revestimentos a utilizar nas fases seguintes. De entre os três tipos de matriz de revestimento, selecionou-se aquela que viria a prosseguir no estudo, com base no seu comportamento tecnológico e alguma informação científica. Os revestimentos com bolhas e/ou espuma revelam um baixo grau de compatibilidade entre os componentes, o que faz com que haja uma reticulação ineficaz

(Bierhalz *et al.*, 2012), sendo então inviáveis, na medida em que vão conferir ao revestimento um aspeto indesejável aquando da sua aplicação sobre o produto alimentar.

De acordo com López-Caballero *et al.*, (2005) as diversas características tecnológicas do quitosano sugerem-no como uma boa aposta futura em diferentes aplicações na indústria alimentar (López-Caballero *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade do quitosano em aumentar o tempo de vida útil de frutos (como morangos, pêsego, uva de mesa e melão) e vegetais, por inibir o crescimento de microrganismos: reduzir a produção de etileno, aumentar a concentração de dióxido de carbono e reduzindo os níveis de oxigénio (Cong *et al.*, 2007; Falguera *et al.*, 2011). Appendini e Hotchkiss (2002) estudaram revestimentos de quitosano a serem aplicados para inibir o desenvolvimento de fungos em frutos e vegetais frescos (Appendini & Hotchkiss, 2002).

Assim, tomámos como relevante prosseguir apenas com os revestimentos constituídos pela matriz de quitosano e com lactato de sódio na sua composição. Para além do comportamento tecnológico e do protocolo de preparação ser menos complexo, estes revestimentos têm a vantagem de serem constituídos por quitosano (agente antimicrobiano) e de possuírem tween 80 na sua constituição.

De modo a darmos início ao desenvolvimento da fase de aplicação dos revestimentos em tripa seca natural foi necessário isolar e identificar fungos. A tripa seca natural é aquela que é normalmente utilizada no fabrico de chouriço tradicional, a qual permite que haja um melhor crescimento de micélios microbianos, quando em comparação com outros tipos de invólucro (Stahnke & Tjener, 2007).

As identificações efetuadas das diferentes espécies de *Penicillium* e de *Candida* em produtos cárneos particularmente no chouriço tradicional vão de encontro ao previsto, uma vez que segundo Garriga e Aymerich (2007), um dos bolores comumente identificados nos enchidos é *Penicillium* spp. e de leveduras é *Candida* sp..

O crescimento de *Penicillium* spp. é favorecido em condições de humidade relativa no intervalo entre 85 a 92% e de temperatura entre os 10 e 20 °C (Spotti & Berni, 2007). Assim, com o intuito de oferecer um ambiente propício ao desenvolvimento fúngico na superfície das tripas inoculadas, recorreu-se a pedaços de algodão embebidos em água sendo o ambiente humidificado posteriormente por aspersão. Contudo este procedimento pode não ter sido o ideal pois correu-se o risco de provocar contaminação cruzada das amostras nos ensaios que se estenderam até aos 60 dias. Uma opção teria sido colocar as amostras em câmara húmida, juntamente com papel embebido em água, e assim garantir condições contínuas e controladas de humidade.

De acordo com o Gráfico 2, relativo às contagens de bolores efetuadas ao longo do tempo de armazenamento, para os diferentes revestimentos na condição em que a tripa foi revestida sem a aplicação de inóculo, verificámos que para o tempo inicial não ocorreram

diferenças no desenvolvimento de bolores entre todos os revestimentos em estudo e a tripa controlo A (não contaminada), o que significa que os revestimentos não conferiram qualquer tipo de contaminação fúngica inicial à tripa revestida em estudo, assim como a tripa por si só. Tal situação já era esperada visto que todos os revestimentos e tripa foram sujeitos a UV de modo a não serem veículos de transmissão/ fonte de contaminação. Por outro lado confirmou-se que o inóculo (aplicado apenas na tripa controlo B) conferiu a baixa contaminação desejada na tripa aquando da sua aplicação.

Relativamente aos valores obtidos, correspondentes ao armazenamento de 1 mês, estes vão de encontro ao esperado, não se registando diferenças estatisticamente significativas entre a tripa controlo A e as amostras revestidas.

No que respeita aos resultados correspondentes a 60 dias de armazenamento, o facto de existirem duas amostras (Q+LS e Q+LS+NS) que apresentaram contaminação de bolores idênticos aos da tripa controlo B, poderá significar que pode ter ocorrido contaminação devido a uma elevada manipulação das amostras quando foram pesadas e borrifadas. No entanto, apesar de justificarmos o sucedido com a possível contaminação cruzada, podemos referir também que os dois revestimentos em causa são os únicos em estudo que não possuem natamicina na sua composição, ou seja, possivelmente todas as amostras foram alvo de contaminação cruzada, mas apenas nestas se desenvolveram os fungos, o que revela eficácia dos revestimentos de natamicina. A natamicina apresenta um forte efeito antimicrobiano contra leveduras, *Yarrowia lipolytica*, e bolores *Penicillium commune* e *Penicillium chrysogenum* mas não contra bactérias (Ramos *et al.*, 2012).

Apesar de se registarem diferenças entre os revestimentos aos 60 dias, é relevante analisar-se também a evolução de cada revestimento e controlos ao longo do tempo. Porém o fato de em todos os revestimentos não terem sido registadas diferenças no desenvolvimento, ao longo dos 60 dias, pode significar que a contaminação cruzada não foi relevante para o caso.

Relativamente à contagem de bolores ao longo do tempo de armazenamento, para os diferentes revestimentos na condição correspondente à contaminação da tripa antes de ser aplicado o revestimento, com este ensaio pretendeu-se simular a situação em que o produto alimentar possa já estar contaminado, a contaminação poderia ter ocorrido durante o seu processo de fabrico e antes de ser aplicado o revestimento, visto que a aplicação do revestimento bioativo só se pretende que seja efetuada no final do processo de produção. No tempo de armazenamento 30 dias verificou-se que nas tripas revestidas com Q+LS e Q+LS+NS, registou-se crescimento de bolores baixo ou ausente apesar de haver referência ao quitosano como agente antimicrobiano e antifúngico, relacionando-se esta inibição de bolores com a capacidade de barreira ao oxigénio que o quitosano adquire quando integra a composição de filmes/revestimentos. Assim verificou-se que o crescimento de fungos foi

inibido, até 30 dias, aquando da aplicação de qualquer um dos revestimentos em estudo, quando a contaminação do produto é efetuada antes de se aplicar o revestimento.

Apesar de ao fim de 60 dias de armazenamento o revestimento de Q+LS+NS+NT ter sido o único que não apresentou crescimento ($0 \log \text{ UFC/cm}^2$), não significa que seja o revestimento ideal a ser aplicado uma vez que é necessário compará-lo estatisticamente com os restantes. Este resultado sugere-nos a hipótese de haver sinergia entre a natamicina e a nisina, no entanto esta é uma afirmação que vai contra aquilo que foi constatado por Pintado *et al.*, (2010), onde afirmam que a nisina e a natamicina atuam de forma independente (Pintado *et al.*, 2010).

Os três revestimentos que se caracterizam por possuir natamicina na sua constituição (Q+LS+NT₅₀₀; Q+LS+NT₂₅₀ e Q+LS+NS+NT) não apresentaram diferenças entre si, o que significa que qualquer um deles é eficaz no combate dos fungos, pelo que não se justifica a aplicação do revestimento que contem os dois antimicrobianos por se tornarem mais dispendiosos em termos económicos.

Ao fim dos 60 dias de armazenamento a tripa com o revestimento de Q+LS apresentou crescimento de bolores assim, o revestimento não apresentava propriedades antimicrobianas, uma vez que o valor registado foi semelhante ao encontrado na tripa controlo B.

Tal como já concluímos anteriormente, até aos 30 dias houve uma inibição do desenvolvimento de fungos (mesmo por parte dos revestimentos sem agente antimicrobiano imobilizado) devido ao efeito barreira ao O₂, proporcionado pelo quitosano, tal como apresentado pelo revestimento de Q+LS+NS e pelos revestimentos de Q+LS+NT₅₀₀ e Q+LS+NS+NT, os quais se apresentaram sem desenvolvimento fúngico aos 30 dias. O revestimento Q+LS+NT₂₅₀ apresentou um crescimento de $0,5 \pm 0,7 \log \text{ UFC/cm}^2$ aos 30 dias, mas este valor não apresenta diferenças estatísticas quando em comparação com os de crescimento nulo, confirmando-se então a eficácia do quitosano como barreira ao oxigénio.

Relativamente aos três revestimentos de natamicina, as tripas aos 60 dias apresentaram-se sem diferenças significativas relativamente ao nível de contaminação por bolores, pelo que qualquer um se revelou eficaz.

Relativamente à contagem de bolores ao longo do tempo de armazenamento, para os diferentes revestimentos na condição em que a tripa foi contaminada após a aplicação do revestimento, este ensaio teve por objetivo simular o efeito dos revestimentos aquando da contaminação do produto alimentar posteriormente a todo o processo de produção e aplicação do revestimento, o que simula as condições de consumo no domicílio do consumidor, após abertura da embalagem.

Ao fim de 30 dias de armazenamento, os resultados obtidos foram de encontro ao previsto e idênticos aos da condição em que a tripa foi contaminada antes da aplicação do revestimento. O revestimento constituído apenas por Q+LS é o único que não apresentava

qualquer agente antimicrobiano imobilizado na matriz de quitosano, e revelou-se incapaz de inibir o crescimento de fungos, tal como aconteceu com o revestimento que continha nisina imobilizada (Q+LS+NS). Isto sugere-nos que a quantidade de quitosano presente na composição dos diferentes revestimentos não é eficaz para que este exerça atividade antifúngica e que realmente na condição da tripa contaminada antes de ser revestida, que a situação aos 30 dias de armazenamento poderá estar relacionada com a criação de uma barreira ao oxigénio, e não por atividade antimicrobiana/antifúngica. Uma vez que os três revestimentos com natamicina na sua composição não apresentaram diferenças estatísticas entre eles, e que são semelhantes à tripa controlo A verifica-se que a aplicação de qualquer um deles será eficaz no controlo do crescimento fúngico.

No que respeita aos dados obtidos para os 60 dias de armazenamento, constatou-se que o revestimento que não possui antimicrobiano imobilizado (Q+LS) e o revestimento de nisina (Q+LS+NS) não inibem o desenvolvimento de fungos, tendo um comportamento semelhante ao controlo B, o que se justifica pela ausência de um agente antifúngico na constituição destes revestimentos. Os restantes três revestimentos, por não apresentarem diferenças, no desenvolvimento, entre si e se compararem à tripa controlo A determinam que qualquer um deles é eficaz no controlo de fungos.

Efetuada uma análise de cada revestimento ao longo do tempo, verificou-se que apesar de não existirem diferenças estatísticas, para os revestimentos de Q+LS+NS e Q+LS+NT₂₅₀ e em ambos houve um aumento no crescimento microbiano tendo este sido bem mais acentuado no caso do revestimento de nisina. Aos 60 dias a tripa revestida com quitosano e natamicina apresentou um ligeiro aumento que pode ser justificado pelo revestimento já estar a perder o seu efeito antifúngico. No entanto, continua sem apresentar diferenças significativas em relação à tripa controlo A e restantes revestimentos de natamicina, para o mesmo período de tempo. Entre estes dois revestimentos (Q+LS+NS e Q+LS+NT₂₅₀), para o mesmo tempo de armazenamento (60 dias) são apresentadas diferenças estatisticamente significativas o que revela uma vez mais que a nisina não exerce qualquer efeito antifúngico. De acordo com Pintado *et al.*, (2010), a nisina apresenta pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, leveduras e bolores.

No que respeita ao revestimento Q+LS, o facto de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre o tempo 0 e 60 prender-se-á na existência de um elevado desvio-padrão, visto que para o tempo 0 o crescimento era de $0,4 \pm 0,04$ log UFC/cm² e no tempo 60 era de $5,5 \pm 2,1$ log UFC/cm².

O facto de as tripas com revestimentos Q+LS+NT₅₀₀ e Q+LS+NS+NT ao final de 60 dias terem registado um crescimento de bolores idêntico àquele que tinham inicialmente sugere uma boa inibição e controlo de fungos à superfície por parte destes devido à composição e concentração dos antimicrobianos. Qualquer um dos três revestimentos de natamicina foi

eficaz no controlo do crescimento de fungos ao longo dos 60 dias do estudo (Handrodinou *et al.*, 2011; Cong *et al.*, 2007; Fajardo *et al.*, 2010)

Em relação aos resultados obtidos para os aeróbios totais, por análise do Gráfico 5 correspondente às contagens de aeróbios totais a 30 °C ao longo do tempo de armazenamento, para o revestimento constituído por Q+LS+NS para as diferentes condições de aplicação, verificou-se que entre o tempo 0 e os 60 houve um aumento bastante acentuado no crescimento, e o mesmo se sucedeu para as três condições de teste (tripa com aplicação de revestimento; tripa contaminada antes de ser aplicado o revestimento e tripa contaminada após aplicação do revestimento), tal como para os cinco tipos de revestimento (Q+LS; Q+LS+NS; Q+LS+NT₅₀₀; Q+LS+NT₂₅₀; Q+LS+NS+NT) (Ver anexo I). Tal situação vem demonstrar-nos que nenhum dos componentes presentes no revestimento tem ação contra as bactérias lá presentes. A nisina não inibiu as bactérias gram-positivas que dominavam a microflora das nossas amostras, apesar de ser referenciados que a nisina tem essa capacidade (EFSA, 2006). Uma vez que as bactérias gram-negativas não se encontravam presentes inicialmente na tripa, nada se pode concluir a cerca da resistência destas aos agentes antimicrobianos.

Segundo a literatura, a nisina tem ação antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas e não inibe fungos (EFSA, 2006). De acordo com Aider (2010), o quitosano tem ação contra fungos e bactérias gram-positivas, sendo as gram-negativas as mais resistentes ao quitosano. Porém com os resultados obtidos é nos possível verificar que as bactérias gram-positivas estão presentes inicialmente e que mantiveram o seu desenvolvimento ao longo dos 60 dias, o que significa que a nisina não atuou como agente antibacteriano, assim como o quitosano. Tal facto pode ser justificado se tivermos em consideração a quantidade de nisina incorporada na matriz do revestimento, assim como de quitosano, os quais podem não ter sido aplicados em quantidade suficiente para exercer ação antibacteriana (Aider, 2010).

De acordo com Roller e Fletcher (2002), a MIC de quitosano é variável, podendo variar entre 0,01% e 1% (sendo as leveduras mais sensíveis do que as bactérias). No nosso caso, a concentração utilizada foi de 0,5%, o que pode não ter sido suficiente para inibir as bactérias (Roller & Fletcher, 2002).

De acordo com Cleveland e Chikindas (2001), a nisina não é eficaz em aplicações de carne devido à incapacidade da nisina em se distribuir uniformemente nestes produtos, ou por interferência com determinados componentes existentes nos produtos à base de carne, como é o caso dos fosfolípidos (Cleveland & Chikindas, 2001). Este é então mais um fator que levou à exclusão da utilização do revestimento com nisina e natamicina incorporados.

De acordo com Millette *et al.*, (2007), num estudo, a nisina foi imobilizada em alginato e foi aplicada na superfície de carne bovina, o que levou à redução da bactéria *Brochothrix*

thermosphacta, de 3 log UFC/cm² para 2 log UFC/cm², ao fim de 7 dias de armazenamento (Millette *et al.*, 2007).

Apesar do controlo das perdas de massa permitidas pelo revestimento ter sido inviável, consideramos que é importante que as perdas de massa sejam determinadas, na medida em que permitirá uma melhor compreensão e otimização do revestimento ativo (Mastromatteo *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos permitiram-nos seleccionar o revestimento mais viável para se aplicar no chouriço e assim determinar os seus efeitos na matriz alimentar. Perante os resultados, e de uma forma geral, verificou-se que o quitosano por si só não teve qualquer ação antifúngica e que a nisina quando incorporada no revestimento também não revelou uma ação eficaz. Por outro lado, os resultados obtidos com os três revestimentos com natamicina incorporada mostraram não resultar em qualquer diferença estatisticamente significativa entre eles, no que respeita à ação antifúngica, e que portanto, tanto o revestimento com natamicina numa concentração de 500 µg/mL como de 250 µg/mL, revelam ser eficazes, o que vai de encontro ao valor de MIC determinado em 250 µg/mL.

O alginato e k-carragenina são dois polissacarídeos já utilizados para a formulação de revestimentos a serem aplicados em queijos. De acordo com Fajardo *et al.*, (2010), não se verificaram diferenças no desenvolvimento de fungos entre o queijo controlo e o queijo revestido, ao contrário do que aconteceu no estudo de Cerqueira *et al.*, (2010), onde as diferenças foram notórias, tal como no nosso caso (Cerqueira *et al.*, 2010; Fajardo *et al.*, 2010).

De acordo com Fajardo *et al.*, (2010), os revestimentos de quitosano são uma boa barreira ao oxigénio, mas permeável ao vapor de água (devido à natureza hidrofílica do quitosano, que permite que as moléculas de água interajam com a matriz, aumentando a sua taxa de permeabilidade). Aquando da incorporação de natamicina, o revestimento mantém a sua permeabilidade ao vapor de água, mas aumenta a permeabilidade ao oxigénio e dióxido de carbono (Fajardo *et al.*, 2010). Segundo Darmadji e Izuminoto (1994) (citado por Coma (2008)), o quitosano quando aplicado em carne, numa concentração de 0,01% inibe o crescimento de *E. coli* e *Pseudomonas* (Coma, 2008). Yingyuad *et al.*, (2006) (citado por Coma, 2008) demonstraram que a aplicação de quitosano sobre a carne de porco, sendo esta embalada a vácuo, é uma boa associação no controlo do desenvolvimento de LAB (Coma, 2008).

Fajardo *et al.*, (2010), afirmou que a quantidade de aditivo a incorporar nos alimentos deve ser limitado pelo nível mais baixo que garanta o efeito desejado (Fajardo *et al.*, 2010).

Tendo em consideração os nossos resultados experimentais suportados pela informação disponível na literatura consultada, decidimos que o revestimento que iríamos aplicar no chouriço seria o constituído por natamicina, a uma concentração de 250 µg/mL. A exclusão do revestimento composto por nisina e natamicina imobilizadas foi feita tendo em

consideração o anteriormente citado, e pelo facto de não existirem diferenças significativas entre os resultados e assim não ser necessário um gasto acrescido de aditivos e desta forma ir ao encontro das preferências dos consumidores a qual se prende pelo consumo de géneros alimentícios com o mínimo recurso a aditivos, dando preferência à incorporação de aditivos de origem natural.

Em relação à concentração mínima inibitória da natamicina (MIC), tal como referido, esta foi fixada em 250 µg/mL (MIC₅₀). A MIC₅₀ é aquela que inibe metade dos microrganismos. Porém no decorrer do método experimental surgiram diversas dificuldades, sendo a principal a insolubilidade da natamicina. A natamicina revelou ser extremamente insolúvel em água, pelo que se utilizou um diluente, o DMSO.

No que respeita à insolubilidade da natamicina a solução poderá passar por solubilizar o antimicrobiano numa solução de ácido acético e depois neutralizar essa mesma solução.

De acordo com os dados de densidade ótica (DO) obtidos para a MIC (a qual pretendeu determinar a concentração mínima de antifúngico que permite a inibição total do crescimento de fungos), e representados no Gráfico 1, estima-se que a concentração de 250 µg/mL corresponda à MIC₅₀ e que a de 500 µg/mL à MIC₁₀₀. Porém, optou-se por utilizar a MIC₅₀, pois de acordo com os resultados do teste em que a tripa foi inoculada e revestida com os diferentes revestimentos, verificou-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas, no crescimento de fungos, em relação aos dois revestimentos com natamicina imobilizada (250 µg/mL e 500 µg/mL). Por outro lado, foi também uma forma de testarmos quantos logaritmos conseguiríamos diminuir com a aplicação de um revestimentos com natamicina imobilizada numa concentração que corresponde a uma MIC₅₀.

Fajardo *et al.*, (2010), testaram um revestimento de quitosano com imobilização de natamicina, aplicando-o na superfície de queijo para inibir o desenvolvimento de fungos. Este revelou-se eficaz e a MIC do revestimento foi determinada em 500 µg/ml, tendo sido testada através da aplicação direta do revestimento (a diferentes concentrações) sobre pedaços de queijo. Estes resultados vão de encontro aos por nós obtidos, apesar de termos optado pela aplicação da MIC₅₀. De qualquer modo, as matrizes alimentares são bastante diferentes, podendo haver interferência na ação do antifúngico. Por outro lado, o quitosano como matriz para imobilização de natamicina já foi testado em melão, revelando-se eficaz (Cong *et al.*, 2007). A MIC de natamicina foi determinada em 20 µg/mL para *Alternaria alternate* e *Fusarium semitectumby* (Cong *et al.*, 2007).

A aplicação do revestimento de quitosano com imobilização de natamicina (numa concentração de 250 µg/mL) no chouriço tradicional Português, foi tecnologicamente um processo simples e sem dificuldades de aplicação podendo ser facilmente reproduzido em condições de produção industrial.

Ao fim de 11 dias o desenvolvimento fúngico começou a ser visível na superfície do chouriço, e este ao final de 21 dias apresentava-se já com características organolépticas

consideradas repugnantes para o consumidor. Assim foi efetuada uma primeira análise, tendo as restantes sido efetuadas ao fim de 1 e 2 meses.

As leveduras crescem especialmente em aerobiose, pelo que o seu desenvolvimento na superfície de produtos cárneos se encontra favorecido (Selgas & Garcia, 2007).

Relativamente à contagem de fungos (Gráfico 6) verificou-se que apenas ao final de 60 dias é que o chouriço que tinha sido sujeito à aplicação do revestimento apresentou destes microrganismos com contagens semelhantes à do chouriço controlo com 30 dias de armazenamento. Isto revela a eficácia do revestimento no período em estudo. No entanto, visivelmente, a contaminação do chouriço revestido apresentava-se de forma diferente à do controlo. Enquanto que no controlo a contaminação se distribuía uniformemente no produto, no chouriço revestido haviam locais onde a contaminação não estava presente, o que nos sugere que talvez o revestimento tenha sido mal aplicado, por ter sido com um pincel e não a mergulhar o produto na solução de revestimento. Uma outra justificação poderá passar pelo que foi verificado por Bierhalz *et al.*, (2012) quando afirmou que a incorporação de natamicina num filme não teve uma distribuição uniforme devido a sua baixa solubilidade (Bierhalz *et al.*, 2012).

Posto isto, foi tempo de verificar a interferência do revestimento com outros microrganismos. A contagem de aeróbios totais presentes num produto alimentar dão-nos ideia da qualidade microbiológica do produto, caracterizando-o em termos de condições de manipulação e estado de alteração do produto alimentar. Porém, no caso dos produtos fermentados, como é o caso do chouriço, esta carga microbiana é sempre elevada, tal como podemos comprovar pelos valores obtidos inicialmente para o chouriço controlo e revestido, 5,8-5,9 log UFC/g. Este valor vai de encontro ao descrito por Ribeiro (1974), que referencia uma carga de 5 log UFC/g como padrão neste produto quando pronto-a-consumir (Ribeiro, 1974). Este valor foi aumentando ao longo do tempo de armazenamento (Gráfico 7), chegando a valores compreendidos entre 8 e 9 log UFC/g, os quais são justificados pelo desenvolvimento de fungos na superfície do produto e não pela deterioração do produto, uma vez que nunca se registaram valores de crescimento de *Pseudomonas* ao longo do tempo, nem em nenhuma das amostras em análise. As *Pseudomonas* são cocos gram-negativos (Ordóñez & Hoz, 2007) e foi possível comprovar a sua ausência no chouriço.

De acordo com Garriga e Aymerich (2007) é comum a presença de *Pseudomonas*, no início do processo de fabrico de chouriço. Alguns autores afirmam que durante o processo de produção que estas se desenvolvem e aumentam, enquanto outros afirmam que a quantidade de *Pseudomonas* se mantém constante ou pode até mesmo desaparecer até ao final do processo de produção, como foi o nosso caso (Garriga & Aymerich, 2007) o que se coaduna com os resultados obtidos no presente estudo.

Em relação às bactérias do ácido láctico (LAB) estas fazem parte integrante da microflora intrínseca dos produtos cárneos fermentados e podem atingir um crescimento tal que pode

chegar até entre 6 a 9 log UFC/g (Garriga & Aymerich, 2007; Lebert *et al.*, 2007). Os resultados obtidos vão de encontro ao esperado, no entanto ao final de 60 dias, o chouriço revestido apresenta uma contagem inferior àquela que se registou no chouriço controlo ao fim de 30 dias, mas mantém-se dentro do limite esperado. Estas bactérias são cocos gram-positivos e tal como podemos verificar estão sempre presentes no chouriço revestido e não revestido ao longo do tempo.

De acordo com um estudo realizado por Coma (2008), o ácido acético, quando presente numa matriz de quitosano e aplicado na superfície de produtos cárneos, não inibe o desenvolvimento das LAB. Assim, o facto de o revestimento ser constituído pelo referido ácido, não é motivo de inibição destas bactérias (Coma, 2008).

A aplicação do revestimento não revelou alterações no desenvolvimento de *Staphylococcus* coagulase negativos tal como aconteceu com os parâmetros físico-químicos, pH e a_w .

Tal como já tinha sido comprovado no teste efetuado na tripa seca natural, o quitosano não demonstrou qualquer efeito sobre as bactérias presentes nas matriz alimentar, uma vez que as bactérias gram-positivas lá se mantiveram presentes ao longo de todo o tempo de armazenamento, tal facto pode justificar-se pela complexidade da matriz alimentar (Aider, 2010). Coma (2008), cita que para alimentos com concentrações moderadas de sal (NaCl), pode haver inibição da ação antimicrobiana do quitosano, o que o poderá prever a sua inatividade no revestimento aplicado no chouriço.

7. CONCLUSÕES

As indústrias alimentares tentam cada vez mais responder às necessidades e expectativas do consumidor, dando sempre garantias de qualidade e segurança alimentar.

Com este trabalho pretendeu-se ir de encontro àquilo que é útil e benéfico ao consumidor de chouriço tradicional Português, ou seja, com o desenvolvimento deste revestimento ativo comestível, o consumidor vê o produto alimentar aumentar o seu tempo de vida útil após abertura da embalagem, sem que haja desenvolvimento da microflora fúngica na superfície do chouriço.

De entre as três matrizes de revestimentos testados (alginato, k-carragenina e quitosano) aquele que revelou ter uma melhor formulação e comportamento tecnológico foi o de quitosano.

No entanto, o quitosano por si só não revelou qualquer efeito inibidor sobre as bactérias gram-positivas presentes na tripa seca natural, tal como aconteceu com a nisina. Porém o revestimento de quitosano demonstrou ser uma forte barreira ao oxigénio, tendo a capacidade de inibir eficazmente o desenvolvimento de fungos na superfície do produto até pelo menos 30 dias após a sua aplicação e independentemente da existência de outros agentes antimicrobianos na sua constituição.

A nisina e a natamicina, quando imobilizadas no revestimento de quitosano e aplicadas em tripa seca natural revelaram a possibilidade de exercerem um efeito sinérgico na inibição de fungos. No entanto, não apresentaram diferenças significativas entre os restantes revestimentos constituídos apenas pelo agente antifúngico, a natamicina.

Assim sendo, os revestimentos de quitosano com imobilização de agentes antimicrobianos revelaram ser eficazes quando aplicados quer antes quer após a tripa seca natural estar contaminada. No entanto, só os revestimentos constituídos pelo agente antifúngico (natamicina) apresentaram eficácia contra o desenvolvimento de fungos até aos 60 dias.

O desenvolvimento das LAB, *Staphylococcus* coagulase negativos, a_w e pH mantêm-se praticamente concordantes entre a amostra revestida e não revestida, não sendo por isso afetados significativamente pela incorporação do revestimento ativo no produto.

A concentração mínima inibitória (MIC) para a natamicina determinada foi de 250 $\mu\text{g/mL}$ (MIC_{50}) e a utilização desta concentração nos revestimentos resulta num valor de incorporação por área superficial de produto aproximado de 0,1 mg/dm^2 , o que é bastante inferior ao valor indicado na Diretiva 95/2/CE da Comissão Europeia, como máximo permitido (1,0 mg/dm^2).

A partir de produtos cárneos fermentados isolámos e identificámos diferentes fungos: *Penicillium funiculosum*, *Penicillium pulvillorum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium mirabile*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium humuli*, como bolores; e *Candida sp.* como levedura.

A aplicação do revestimento de quitosano com natamicina imobilizada, em chouriço tradicional Português revelou ser eficaz no controlo do desenvolvimento de fungos na

superfície do produto alimentar. Enquanto o chouriço controlo (não revestido) ao fim de 21 dias já se apresentava visivelmente contaminado, só ao fim de 60 dias é que o chouriço revestido apresentou contagens semelhantes a estas. Ao longo de 30 dias o chouriço revestido nunca apresentou diferenças em relação ao tempo inicial.

Posto isto, verificámos que a aplicação do revestimento ativo aumenta o tempo de vida útil do chouriço tradicional Português.

Contudo, estudos posteriores são necessários, os quais passam inclusivamente por uma análise sensorial, para que seja analisado se o revestimento causa alterações organolépticas ao produto alimentar e seja efetuado um estudo de vida útil pormenorizado, de modo a sabermos ao certo quanto tempo o revestimento é capaz de estar ativo sobre a superfície do produto alimentar.

É importante desenvolver estudos que determinem que tipo de ligação é estabelecida entre o quitosano e a natamicina, para que assim se compreenda melhor o comportamento do revestimento para com o produto alimentar

A baixa solubilidade da natamicina é um fator que também deve ser resolvido, assim como apostar em testes que determinem a velocidade de libertação da natamicina a partir do revestimento em causa. É desejável que haja um baixo coeficiente de difusão da natamicina do revestimento para o alimento, para que assim se mantenha uma concentração acima do limite de inibição dos microrganismos alvo, na superfície e o efeito antimicrobiano se mantenha durante mais tempo. A determinação de aspetos como adesão, coesão, solubilidade, transparência, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água e gases, são também importantes de estudar.

Relativamente à oxidação do produto alimentar, será também importante determinar o Índice de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) ao longo do tempo, de modo a verificar se o revestimento influencia a oxidação do chouriço.

8. BIBLIOGRAFIA

- Ahn, D. U. & Min, B. (2007). Packaging and Storage. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 289-300). Iowa, EUA: Blackwell.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- Akkuş Çetinus, Ş. & Nursevin Öztıp, H. (2003). Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(7), 889-894.
- Albarghouthi, M., Fara, D. A., Saleem, M., El-Thaher, T., Matalka, K. & Badwan, A. (2000). Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 206, 23-34.
- Altun, G. D. & Cetinus, S. A. (2007). Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry*, 100(3), 964-971.
- Andrés, A., Barat, J. M., Grau, R. & Fito, P. (2007). Principles of Drying and Smoking. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 37-48). Iowa, EUA: Blackwell.
- Appendini, P. & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113-126.
- Arnau, J., Serra, X., Comaposada, J., Gou, P. & Garriga, M. (2007). Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science*, 77(1), 81-89.
- Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., Calderón-Domínguez, G., Terres-Rojas, E., Garibay-Febles, V., Martínez-Rivas, A. & Gutiérrez-López, G. F. (2012). Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 289-299.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Economia [ASAE] (2011). *Avaliação de Riscos: Riscos químicos – Aditivos Alimentares*. Acedido em Out.11, 2011, disponível em: <http://www.asae.pt/aaaDefault.aspx?f=1&back=1&codigono=5960596361426144AAA AAAA>
- Azeredo, H. M. C. d. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42(9), 1240-1253
- Azevedo, C. (2008). A célula. *Bioquímica: Organização molecular da vida* (pp. 121-138). Lisboa, Portugal: Lidel.
- Betbeze, C.M., Wu, C.C., Krohne, S.G. & Stiles, J. (2006). In vitro fungistatic and fungicidal activities of silver sulfadiazine and natamycin on pathogenic fungi isolated from horses with keratomycosis. *AJVR*, 67, 1788-1793.
- Bierhalz, A. C. K., da Silva, M. A. & Kieckbusch, T. G. (2012). Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 110(1), 18-25.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Flores, M., Aristoy, M. C., Toldra, F. & Flores, J. (2006). Sensory improvement of dry-fermented sausages by the addition of cell-free extracts from *Debaryomyces hansenii* and *Lactobacillus sakei*. *Meat Science*, 72(3), 457-466.

- Botrel, D. A., Soares, N.F.F., Geraldine, R.M., Pereira, R.M. & Fontes, D. A. F. (2007). Quality of minimally processed garlic (*Allium sativum*) coated with antimicrobial edible coating with antimicrobial edible coating. *Ciência Tecnologia Alimentar*, 27, 32-38.
- Bruna, J. M., Hierro, E. M., de la Hoz, L., Mottram, D. S., Fernández, M. & Ordóñez, J. A. (2003). Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol*, 85(1-2), 111-125.
- Bruna, J. M., Hierro, E.M., Hoz, L., Mottram, Donald.S., Fernández, M. & Ordóñez, J. A. (2001). The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, 59, 97-107.
- Carvalho, L. (2010). Identificação e caracterização de isolados de *Staphylococcus*: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade Técnica de Lisboa.
- Casaburi, A., Aristoy, M. C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldra, F. & Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, 76(2), 295-307.
- Cerqueira, M. A., Sousa-Gallagher, M. J., Macedo, I., Rodriguez-Aguilera, R., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A. & Vicente, A. A. (2010). Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of "Regional" cheese. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 87-94.
- Çetin, Ş. A., Şahin, E. & Saraydin, D. (2009). Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization. *Food Chemistry*, 114(3), 962-969.
- Chi, S.-P. & Wu, Y.-C. (2007). Spices and Seasonings. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 87-100). Iowa, EUA: Blackwell.
- Chiou, S.-H. & Wu, W.-T. (2004). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, 25(2), 197-204.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Cocconcelli, P. S. (2007). Starter Cultures: Bacteria. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 137-146). Iowa, EUA: Blackwell.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1-2), 90-103.
- Cong, F., Zhang, Y. & Dong, W. (2007). Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 71-75.
- Decreto-Lei nº 192/89 de 8 de Junho. *Diário da República nº 131 - I série*. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Lisboa.
- Decreto-Lei nº 363/98 de 19 de Novembro. *Diário da República nº 268 - I série*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

- Decreto-Lei nº 350/2007 de 19 de Outubro. *Diário da República nº 202 – I série*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Decreto-Lei nº94/2010 de 29 de Julho. *Diário da República nº 146/2010 – 1ª Série*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., Brink, B., Hagen, B., Montel, C., Zanardi, E., Murbrek, E., Leroy, F., Vandendriessche, F., Lorentsen, K., Venema, K., Sunesen, L., Stahnke, L., De Vuyst, L., Talon, R., Chizzolini, R. & Eerola, S. (2000). Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Research International*, 33, 171-180.
- Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L. & Porta, R. (2011). Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2324-2327.
- Directiva 95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Fevereiro de 1995, nº L61/1. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.
- Directiva 2008/84/CE da Comissão de 27 de Agosto de 2008, nº L44/11. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Directiva 2009/10/CE da Comissão de 13 de Fevereiro de 2009, nº L44/62. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Directiva 2010/69/UE da Comissão de 22 de Outubro de 2010, L279/22. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Directiva Sanitária nº 77/99/CEE do Conselho, de 21 de Dezembro de 1976.
- Dura, M. A., Flores, M. & Toldra, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Science*, 68(2), 319-328.
- Elias, M. (2004). Caracterização, conservação e produção biotecnológica de paio de porco alentejano. Tese de Doutoramento em Engenharia Alimentar. Évora: Universidade de Évora.
- Elias, M., Fraqueza, M. J. & Barreto, A. (2006). Caracterização do processo de fabrico do chouriço tradicional alentejano. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 13, 1-10.
- European Food Safety Authority [EFSA]. (2006). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to the use of nisin (E234) as a food additive. *The EFSA Journal*, 314, 1-16.
- European Food Safety Authority [EFSA]. (2009). Scientific opinion on the use of natamycin (E235) as a food additive – EFSA Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS). *EFSA Journal*, 7(12), 1412.
- European Food Safety Authority [EFSA]. (2011). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to chitosan and reduction in body weight (ID 679, 1499), maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4663), reduction of intestinal transit time (ID 4664) and reduction of inflammation (ID 1985) pursuant to article 13 (1) of regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 9 (6), 2214.
- Faia, A. M. & Castro, L. T. d. (1998). Metabolismo microbiano produtor de energia. *Microbiologia* (pp. 99-124). Lisboa, Portugal: Lidel.

- Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A. & Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101(4), 349-356.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A. & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292-303.
- Fernandes, M.J. (2010). Factores que estabelecem as condições de armazenamento dos produtos alimentares: avaliação do pH e actividade da água (a_w). In aulas de Química dos Alimentos – Prática. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade Técnica de Lisboa.
- Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M., Hernandez-Munoz, P. & Ocio, M. J. (2008). Characterization of antimicrobial properties on the growth of *S. aureus* of novel renewable blends of gliadins and chitosan of interest in food packaging and coating applications. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *International Journal Food Microbiology*, 124(1), 13-20.
- Ferreira, L., Afonso, C., Vila-Real, H., Alfaia, A. & Ribeiro, M.H.L. (2008). *Food Technology Biotechnology*, 46 (1), 146-150.
- Flores, J. (1997). Mediterranean vs northern European meat products. Processing technologies and main differences. *Food Chemistry*, 59, 505-510.
- Flores, M. & Toldrá, F. (2011). Microbial enzymatic activities for improved fermented meats. *Trends in Food Science & Technology*, 22(2-3), 81-90.
- Fraqueza, M.J.R. (1992). Utilização e valorização das tripas de animais de abate nas indústrias de carne portuguesas. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em ciências e tecnologia de alimentos. Universidade Técnica de Lisboa.
- Fraqueza, M.J., Patarata, L. (2006). Recomendações Práticas de Higiene para enchidos tradicionais fermentados e secos. Guia Prático. Lisboa.
- Garriga, M. & Aymerich, T. (2007). The Microbiology of Fermentation and Ripening. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 125-136). Iowa, EUA: Blackwell.
- Gåserød, O., Jolliffe, I.G., Hampson, F.C., Dettmar, P. & Skjåk-Bræk, G. (1998). The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 175, 237-246.
- George, M. & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Journal Control Release*, 114(1), 1-14.
- Giancone, T., Torrieri, E., Pierro, P. D., Mariniello, L., Moresi, M., Porta, R. & Masi, P. (2008). Role of constituents on the network formation of hydrocolloid edible films. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 195-203.
- Gil, M. H. & Ferreira, P. (2006). Polissacarídeos como biomateriais. *Grupo Glúcidos - Química*, 100, 72-74.

- Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C. M. & Jouenne, T. (2012). Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Acta Biomater*, 8(5), 1670-1684.
- Gonçalves, S. (2009). Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade Técnica de Lisboa.
- Güçbilmez, Ç. M., Yemenicioğlu, A. & Arslanoğlu, A. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, 40(1), 80-91.
- Guiga, W., Swesi, Y., Galland, S., Peyrol, E., Degraeve, P. & Sebti, I. (2010). Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 352-360.
- Hambleton, A., Debeaufort, F., Bonnotte, A. & Voilley, A. (2009). Influence of alginate emulsion-based films structure on its barrier properties and on the protection of microencapsulated aroma compound. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2116-2124.
- Ho Lee, C., Soon An, D., Cheol Lee, S., Jin Park, H. & Sun Lee, D. (2004). A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol. *Journal of Food Engineering*, 62(4), 323-329.
- Hondrodimou, O., Kourkoutas, Y. & Panagou, E. Z. (2011). Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Food Microbiol*, 28(3), 621-627.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S. & Comi, G. (2009). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology*, 26(1), 65-70.
- Incze, K. (2007). European Products. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 307-318). Iowa, EUA: Blackwell.
- Infopédia. *Alginato*. Acedido em Ag. 31, 2012, disponível em: [http://www.infopedia.pt/\\$alginato](http://www.infopedia.pt/$alginato).
- Instituto Nacional de Estatística - INE (2010a). *Estatísticas da Produção Industrial 2008*. Lisboa
- Instituto Nacional de Estatística - INE (2010b). *Estatísticas da Produção Industrial 2009*. Lisboa
- Instituto Nacional de Estatística - INE (2012). *Estatísticas da Produção Industrial 2010*. Lisboa
- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – INSA (2010). *Tabela de Composição de Alimentos*. Acedido em Maio 15, 2012, disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetalleAlimento.aspx?ID=IS341>
- ISO 21527-1 (2008). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds*. The International Organization for Standardization. Suíça.

- ISO 6887-2 (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs- preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 2-Specific rules for the preparation of meat and meat products*. The International Organization for Standardization. Suíça.
- ISO 13720 (2000). *Meat and meat products. Enumeration of Pseudomonas spp.* The International Organization for Standardization. Switzerland.
- ISO 15214 (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal methods for detection and enumeration of mesophilic lactic acid bacteria- Colonycount technique at 30 °C*. The International Organization for Standardization. Suíça.
- Jiang, Z., Neetoo, H. & Chen, H. (2011). Efficacy of freezing, frozen storage and edible antimicrobial coatings used in combination for control of *Listeria monocytogenes* on roasted turkey stored at chiller temperatures. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Food Microbiology*, 28(7), 1394-1401.
- Juck, G., Neetoo, H. & Chen, H. (2010). Application of an active alginate coating to control the growth of *Listeria monocytogenes* on poached and deli turkey products. *International Journal Food Microbiology*, 142(3), 302-308.
- Kerry, J. P., O'Grady, M. N. & Hogan, S. A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74(1), 113-130.
- Khan, M. I., Arshad, M. S., Anjum, F. M., Sameen, A., Aneeq ur, R. & Gill, W. T. (2011). Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Research International*, 44(10), 3125-3133.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *International Journal Food Microbiology*, 144(1), 51-63.
- Kopermsub, P., Mayen, V. & Warin, C. (2011). Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. *Food Research International*, 44(2), 605-612.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8), 737-743.
- Labadie, J. (2007). Spoilage Microorganisms: Risks and Control. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 421-426). Iowa, EUA: Blackwell.
- Lebert, I., Leroy, S. & Talon, R. (2007). Microorganisms in Traditional Fermented Meats. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 113-124). Iowa, EUA: Blackwell.
- Lei nº 75/2009 de 12 de Agosto. Diário da República nº155 – I série. Assembleia da República. Lisboa.
- Leistner, L. (1987). Shelf-Stable Products and Intermediate Moisture Foods Based on meat. In Institute of food technologists (Ed.), *Water Activity: theory and applications to food* (pp. 295-327). Chicago, Illinois: IFT-Basic Symposium Series.
- Leistner, L. & Gorris, L. G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 41-45.

- Leroy, F., Verluyten, J. & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *International Journal Food Microbiology*, 106(3), 270-285.
- Li, J., Cai, J., Zhong, L. & Du, Y. (2012). Immobilization of a protease on modified chitosan beads for the depolymerization of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2697-2705.
- Lian, Z.-X., Ma, Z.-S., Wei, J. & Liu, H. (2012). Preparation and characterization of immobilized lysozyme and evaluation of its application in edible coatings. *Process Biochemistry*, 47(2), 201-208.
- Liu, L., Kerry, J. F. & Kerry, J. P. (2007). Application and assessment of extruded edible casings manufactured from pectin and gelatin/sodium alginate blends for use with breakfast pork sausage. *Meat Science*, 75(2), 196-202.
- López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M. & Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- López, A., Lázaro, N. & Marqués, A. M. (1997). The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel-beads. *Journal of Microbiological Methods*, 30, 231-234.
- Lu, F., Ding, Y., Ye, X. & Liu, D. (2010). Cinnamon and nisin in alginate–calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1331-1335.
- Manual de utilização do Rotronic-Hygroscop (1980). Badenerstrasse-Zürich.
- Marcuzzo, E., Sensidoni, A., Debeaufort, F. & Voilley, A. (2010). Encapsulation of aroma compounds in biopolymeric emulsion based edible films to control flavour release. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 984-988.
- Martin-Sanchez, A. M., Chaves-Lopez, C., Sendra, E., Sayas, E., Fenandez-Lopez, J. & Perez-Alvarez, J. A. (2011). Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-cured meat product (salchichon) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. [Comparative Study]. *Meat Science*, 89(1), 35-44.
- Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A. & Del Nobile, M. A. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 591-598.
- Mecitoğlu, Ç., Yemencioğlu, A., Arslanoğlu, A., Elmacı, Z. S., Korel, F. & Çetin, A. E. (2006). Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *Food Research International*, 39(1), 12-21.
- Mendes, A. A., Oliveira, P. C., Castro, H. F. & Giordano, R. L. C. (2011). Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, 34, 831-840.
- Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W. & Lacroix, M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, 18(7), 878-884.

- Mishra, D., Tripathy, J. & Behari, K. (2008). Synthesis of graft copolymer (k-carrageenan-g-N,N-dimethylacrylamide) and studies of metal ion uptake, swelling capacity and flocculation properties. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 524-534.
- Mishra, M. M., Sand, A., Mishra, D. K., Yadav, M. & Behari, K. (2010). Free radical graft copolymerization of N-vinyl-2-pyrrolidone onto k-carrageenan in aqueous media and applications. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 424-431.
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Bioresour Technology*, 99(10), 3949-3964.
- Norma M38-A (2002). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard NCCLS document M38-A*. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- NP 588 (2008). Norma Portuguesa para carnes e produtos cárneos: Definição e classificação. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 589 (2008). Norma Portuguesa para Chouriço de carne: Definição, classificação, características e acondicionamento. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 3441 (2008). *Carnes e produtos cárneos. Medição do pH. Método de Referência*. Instituto Português da Qualidade.
- NP 4405 (2002). *Norma Portuguesa para Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30 °C*. Instituto Português da Qualidade.
- Nykänen, A., Weckman, K. & Lapveteläinen, A. (2000). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 63-72.
- Ockerman, H. W. & Basu, L. (2007). Production and Consumption of Fermented Meat Products. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 9-15). Iowa, EUA: Blackwell.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. & Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1), 193-198.
- Ordóñez, J. A. & Hoz, L. d. I. (2007). Mediterranean Products. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 333-347). Iowa, EUA: Blackwell.
- Pampulha, M. E. (1998). Nutrição e Crescimento de Microrganismos. *Microbiologia* (pp. 81-98). Lisboa, Portugal: Lidel.
- Parente, A. M. & Sousa, J. C. F. d. (1998). Características morfológicas e ultraestruturais dos microrganismos procariotas. *Microbiologia* (pp. 19-52). Lisboa, Portugal: Lidel.
- Paşcalău, V., Popescu, V., Popescu, G. L., Dudescu, M. C., Borodi, G., Dinescu, A., Perhaita, I. & Paul, M. (2012). The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films. *Journal of Alloys and Compounds*, 536, S418-S423.
- Petäjä-Kanninen, E. & Puolanne, E. (2007). Principles of Meat Fermentation. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 31-36). Iowa, EUA: Blackwell.

- Patarata, L. (2002). Caracterização e avaliação da aptidão tecnológica de bactérias do ácido láctico e *Micrococcaceae* em produtos de salsicharia. Tese de Doutoramento. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Medeiros, B. G. d. S., da Silva, L. H. M., da Silva, M. C. H., Carneiro-da-Cunha, M. G., Coimbra, M. A. & Vicente, A. A. (2012). Interactions between κ -carrageenan and chitosan in nanolayered coatings—Structural and transport properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1081-1090.
- Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S. & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21(3), 240-246.
- Piper, C., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. (2009). Discovery of medically significant lantibiotics. *Current Drug Discovery Technologies*, 6, 1-18.
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K. & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38(8), 859-865.
- Qualfood – Base de dados de qualidade e segurança alimentar (2011). *Glossário - Agentes Antimicrobianos*. Acedido em Out. 1, 2011, disponível em: http://qualfood.biostrument.com/index.php?option=glossario&word=&letter=*&pag=5®pag=10
- Quintas, A. & Ascenso, C. (2008). Glicólise. *Bioquímica: Organização molecular da vida* (pp. 333-352). Lisboa, Portugal: Lidel.
- Quintavalla, S. & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62, 373-380.
- Ramirez, C. (1982). *Manual and atlas of the penicillia*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Biomedical Press.
- Ramos, Ó. L., Silva, S. I., Soares, J. C., Fernandes, J. C., Poças, M. F., Pintado, M. E. & Malcata, F. X. (2012). Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*, 45(1), 351-361.
- Regulamento (CE) nº 1935/2004 de 27 de Outubro, nº L338/4. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Ribeiro, A. M. R. (1974). Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 5(1), 17-25.
- Rojas-Graü, M. A., Tapia, M. S., Rodríguez, F. J., Carmona, A. J. & Martín-Belloso, O. (2007). Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 118-127.
- Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M. & Fletcher, H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science*, 62, 165-177.
- Roncalés, P. (2007). Additives. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 77-86). Iowa, EUA: Blackwell.

- Ruiz, J. (2007). Ingredients. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 59-76). Iowa, EUA: Blackwell.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 277-283.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Hernández, M., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2011). Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control*, 22(8), 1302-1310.
- Selgas, M.-D. & Garcia, M.-L. (2007). Starter Cultures: Yeasts. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 159-169). Iowa, EUA: Blackwell.
- Selgas, M. D., Trigueros, G., Casas, C., Ordóñez, J. A. & García, M. L. (1995). Potential technological interest of a *Mucor* strain to be used in dry fermented sausage production. *Food Research International*, 28, 77-82.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. & Jeon, Y.-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51.
- Shu, X. Z. & Zhu, K. J. (2002). The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53, 193-201.
- Silva, I. (2006). *Hidrólise de naringina por ação da naringinase imobilizada em k-carragêneo: aplicação no controlo da qualidade de sumos de citrinos*. Dissertação de Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Lisboa: Faculdade de Farmácia—Universidade de Lisboa.
- Silva, M. A. d., Bierhalz, A. C. K. & Kieckbusch, T. G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 736-742.
- Soares, N. F. F., Silva, W.A., Pires, A.C.S., Camilloto, G.P. & Silva, P. S. (2009). New developments and applications in food packaging. *Revista Ceres*, 56, 370-378.
- Song, Y., Liu, L., Shen, H., You, J. & Luo, Y. (2011). Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). *Food Control*, 22(3-4), 608-615.
- Spotti, E. & Berni, E. (2007). Starter Cultures: Molds. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 171-176). Iowa, EUA: Blackwell.
- Stahnke, L. H. & Tjener, K. (2007). Influence of Processing Parameters on Cultures Performance. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 187-194). Iowa, EUA: Blackwell.
- Sunesen, L. O. & Stahnke, L. H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages—selection, application and effects. *Meat Science*, 65(3), 935-948.
- Tai, Y. C., McGuire, J. & Neff, J. A. (2008). Nisin antimicrobial activity and structural characteristics at hydrophobic surfaces coated with the PEO-PPO-PEO triblock surfactant Pluronic F108. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Colloid Interface Sci*, 322(1), 104-111.

- Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E. H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M. J., Patarata, L. & Laukova, A. (2007). Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Sci*, 77(4), 570-579.
- Tamura, H., Tsuruta, Y. & Tokura, S. (2002). Preparation of chitosan-coated alginate filament. *Materials Science and Engineering C*, 20, 143-147.
- Thomas, R., Anjaneyulu, A. S. & Kondaiah, N. (2008). Development of shelf stable pork sausages using hurdle technology and their quality at ambient temperature (37±1 degrees C) storage. *Meat Science*, 79(1), 1-12.
- Toldrá, F., Nip, W.-K. & Hui, Y. H. (2007). Dry-fermented sausage: An Overview. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 321-325). Iowa, EUA: Blackwell.
- Tradisausage. (2006). Tradisausage - Assessment and Improvement of Safety of Traditional dry Sausages from producers to consumers Retrieved 20 Julho 2012, from <http://www1.clermont.inra.fr/tradisausage/index.htm>
- U.S. Food and Drug Administration [FDA] (2012a). *GRAS notice inventory*. Acedido em Ag. 16, 2012, disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=grasListing&id=73>
- U.S. Food and Drug Administration [FDA] (2012b). *GRAS notice inventory*. Acedido em Ag. 16, 2012, disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=grasListing&id=170>
- Vu, K. D., Hollingsworth, R. G., Leroux, E., Salmieri, S. & Lacroix, M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44(1), 198-203.
- Wu, Y.-C. & Chi, S.-P. (2007). Casings. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 101-110). Iowa, EUA: Blackwell.
- Zeuthen, P. (2007). A Historical Perspective of Meat Fermentation. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 3-8). Iowa, EUA: Blackwell.

ANEXO I – Tabela com médias, desvio-padrão e significância relativos à análise de bolores e aeróbios totais a 30°C da tripa seca natural

		Contagem de Bolores								
		Tripa contaminada antes			Sign.	Tripa contaminada após			Sign.	
dias	n	0	30	60		0	30	60		
0 tripa sem nada	2	0,0±0,0 a	0,0±0,0 a	0,0±0,0 a	NS	0,0±0,0 a	0,0±0,0 a	0,0±0,0 a	NS	
1 tripa contaminada	2	0,4±0,03 bA	6,8±0,7 bB	5,1±0,6 bC	*	0,4±0,03 bA	6,8±0,7 bB	5,1±0,6 bC	*	
2 Q+LS	2	0,4±0,04 bA	0,3±0,5 aAB	5,9±0,3 bB	*	0,4±0,04 bA	7,0±0,6 bB	5,5±2,1 bAB	*	
3 Q+LS+NS	2	0,4±0,04 bA	0,0±0,0 aA	4,1±2,0 bAB	*	0,4±0,04 b	3,6±3,7 c	3,3±4,7 b,c	NS	
4 Q+LS+NT	2	0,4±0,04 bA	0,0±0,0 aB	3,2±4,5 bcAB	*	0,4±0,04 bA	0,0±0,0 aB	0,4±0,5 acAB	*	
5 Q+LS+NT (1/2 concentração)	2	0,4±0,04 b	0,5±0,7 a	3,3±4,6 bc	NS	0,4±0,04 b	0,6±0,6 a	1,2±1,7 ac	NS	
6 Q+LS+NS+NT	2	0,4±0,04 bA	0,0±0,0 aB	0,0±0,0 acB	*	0,4±0,04 bA	0,0±0,0 aB	0,3±0,5 acAB	*	
Significância		***	***	*		***	*	*		

NS não significante, * p<0,05, *** p<0,001

ABC- letras diferentes na mesma linha correspondem a médias significativamente diferentes

abc- letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes

		Contagem de Bolores				
		tripa só com aplicação do revestimento			Sign.	
dias	n	0	30	60		
0 tripa sem nada	2	0,0±0,0 a	0,0±0,0 a	0,0±0,0 a	NS	
1 tripa contaminada	2	0,4±0,03 bA	6,8±0,7 bB	5,1±0,6 bC	*	
2 Q+LS	2	0,0±0,0 a	0,7±0,0 a	2,1±3,0 ab	NS	
3 Q+LS+NS	2	0,0±0,0 a	0,5±0,5 a	3,9±0,7 bc	NS	
4 Q+LS+NT	2	0,0±0,0 a	0,1±0,1 a	0,1±0,1 ac	NS	
5 Q+LS+NT (1/2 concentração)	2	0,0±0,0 a	0,0±0,0 a	0,0±0,0 a	NS	
6 Q+LS+NS+NT	2	0,0±0,0 a	0,2±0,0 a	0,6±0,9 a,c	NS	
Significância		***	*	*		

NS não significante, * p<0,05, *** p<0,001

ABC- letras diferentes na mesma linha correspondem a médias significativamente diferentes

abc- letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes

ANEXO I (continuação) – Tabela com médias, desvio-padrão e significância relativos à análise de bolores e aeróbios totais a 30°C da tripa seca natural

		Contagem Aeróbios Totais a 30°C								
		tripa contaminada antes		Sign.	tripa contaminada após		Sign.	tripa só com aplicação do revestimento		Sign.
dias	n	0	60		0	60		0	60	
0 tripa sem nada	2	0,7±0,01 aA	7,0±0,0 aB	***	0,7±0,01 aA	7,0±0,0 aB	***	0,7±0,01 aA	7,0±0,0 aB	***
1 tripa contaminada	2	0,9±0,02 bA	7,9±0,2 bB	*	0,9±0,02 bA	7,9±0,2 bB	*	0,9±0,02 bA	7,9±0,2 bcB	*
2 Q+LS	2	0,9±0,02 bA	8,2±0,8 bB	*	0,9±0,02 bA	8,1±0,1 bB	**	0,7±0,01 a	8,5±2,1 b	NS
3 Q+LS+NS	2	1,8±0,02 b	7,6±0,9 ab	NS	0,9±0,02 bA	7,0±0,06 abB	**	0,7±0,01 a	7,7±1,0 ab	NS
4 Q+LS+NT	2	0,9±0,02 bA	6,6±0,0 aB	**	0,9±0,02 bA	7,0±0,0 abB	***	0,7±0,01 aA	7,0±0,0 acB	***
5 Q+LS+NT (1/2 concentração)	2	0,9±0,02 bA	7,4±0,5 abB	*	0,9±0,02 bA	6,7±0,4 aB	*	0,7±0,01 aA	7,0±0,0 acB	***
6 Q+LS+NS+NT	2	0,9±0,02 bA	6,7±0,07 aB	**	0,9±0,02 b	6,2±0,7 a	NS	0,7±0,01 aA	7,0±0,0 acB	***
Significância		***	*		***	*		***	*	

NS não significante, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

AB- letras diferentes na mesma linha correspondem a médias significativamente diferentes

abc- letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes

ANEXO II – Tabela com médias, desvio-padrão e significância relativos à análise microbiológica e físico-química do chouriço tradicional Português

		Contagem de Bolores					Contagem de AT 30°C				
dias	n	0	21	30	60	Sign.	0	21	30	60	Sign.
0 Controlo	3	3,0±1,12 A	8,5±0,11 aB	8,4±0,10 aB		*	5,8±1,0 A	8,4±0,11 aB	8,1±0,20 C		*
1 Revestido	3	2,5±1,64 A	5,2±0,81 bA	5,8±0,58 bA	9,0±0,48 B	*	5,9±0,67 A	6,4±0,68 bA	7,3±0,70 A	9,1±0,47 B	*
Significância		NS	***	**	NS		NS	***	NS	NS	

		Contagem de LAB					Contagem de <i>Staphylococcus coagulase negativos</i>				
dias	n	0	21	30	60	Sign.	0	21	30	60	Sign.
0 Controlo	3	6,9±1,18	8,4±0,08	8,3±0,23 a		NS	4,4±0,11	5,0±0,39	4,8±0,59 a		NS
1 Revestido	3	7,5±0,71	7,8±0,61	7,8±0,08	7,1±0,39 b	NS	4,3±0,41 A	4,4±0,13 A	4,7±0,80 A	7,4±0,53 bB	*
Significância		NS	NS	NS	*		NS	NS	NS	***	

		pH					a _w				
dias	n	0	21	30	60	Sign.	0	21	30	60	Sign.
0 Controlo	3	5,2±0,46	5,6±0,01	6,0±0,08		NS	0,95±0,001	0,94±0,004	0,95±0,003 a		NS
1 Revestido	3	5,3±0,58	5,4±0,16	5,5±0,07	6,3±0,6	NS	0,94±0,006 A	0,94±0,002 A	0,94±0,003 bA	0,97±0,002 bB	**
Significância		NS	NS	NS	NS		NS	NS	***	***	

NS não significante, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

ABC- letras diferentes na mesma linha correspondem a médias significativamente diferentes

ab- letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes

■ - as contagens obtidas para o chouriço revestido ao fim de 60 dias de armazenamento foram comparadas com as obtidas para o controlo ao fim de 30 dias de armazenamento.