



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CAVIAR PÉROLA, ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA E  
MICROBIOLÓGICA

GISELE NUNES ALMEIDA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo  
Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira  
Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

ORIENTADOR:

Doutor Mário Alexandre Gonçalves  
Quaresma

2014

LISBOA

---



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

CAVIAR PÉROLA, ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA E  
MICROBIOLÓGICA

GISELE NUNES ALMEIDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo  
Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira  
Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

ORIENTADOR:

Doutor Mário Alexandre Gonçalves  
Quaresma

2014

LISBOA

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Mário Quaresma por ter aceitado orientar este trabalho, por todos os conhecimentos que me ajudou a adquirir, por toda a disponibilidade, simpatia e compreensão demonstradas durante o período de elaboração da Dissertação de Mestrado.

Gostaria de agradecer ao Dr. Fernando Bernardo, Dr.<sup>a</sup>. Anabela Lança e Eng.<sup>a</sup> Maria José Fernandes pelo auxílio prestado na realização das análises e pela disponibilização dos laboratórios e meios utilizados.

Ao Sr. Felipe Silva por disponibilizar a matéria-prima utilizada neste projeto de pesquisa sobre o “Caviar Pérola”.

Aos meus pais e irmãos por suportarem a saudade em prol do meu desenvolvimento pessoal.

Aos amigos que fiz no mestrado e fora dele (Catarina, Kelly, Paula, Telmo, Patrícia, Vânia, Ana, Luis, e Lurdes). Sempre acompanhada por boas pessoas dispostas a me apoiarem.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria José Moreira Batatinha que fez a minha iniciação no mundo maravilhoso das pesquisas científicas e que me mostrou o quanto é possível aprender ao se dedicar a um propósito.

Aos meus tios Sidnéia Nunes e Rui Silva que me proporcionaram esta experiência e a quem agradeço e dedico este trabalho.

# CAVIAR PÉROLA, ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a estabilidade das características físico-químicas e microbiológicas do “Caviar Pérola”, cuja matéria-prima são ovos de caracol da espécie *Helix aspersa maxima*. Testou-se a utilização do sorbato de potássio (E202) como conservante. A análise a composição centesimal dos ovos de *Helix aspersa máxima* revelou um elevado teor de humidade (84,5%). Os valores de hidratos de carbono, proteínas, lípidos e cinzas foram 6,7%; 3,7%; 0,1%; 5% respetivamente. O pH do “Caviar Pérola” utilizado apresentou-se ligeiramente básico (8,40). Observaram-se variação da coloração ao longo do tempo tornando-se progressivamente mais rosado e escuro quando analisados pelo sistema CIE L\*a\*b\*, validando as observações visuais dos ovos no momento das análises. Não se registou evidência da presença de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e fungos em 10 gramas do produto. A adição do sorbato de potássio à solução excipiente não influenciou a conservação do “Caviar Pérola”. A técnica testada para a estabilização do “Caviar Pérola” neste estudo mostrou-se ineficaz para a conservação do produto num prazo comercial útil (3 meses), uma vez que condicionou a estabilidade da cor, sem conseguir inibir o desenvolvimento microbiano.

Palavras-chave: Caviar Pérola, *Helix aspersa maxima*, caracol, estabilidade microbiológica, estabilidade físico-química.

# CAVIAR PÉROLA, PHYSICAL-CHEMICAL STABILITY STUDY AND MICROBIOLOGY

## Abstract

The objective of this study was to analyze the physico chemical and microbiological “Caviar Pérola” stability, whose raw material are snail eggs of the species *Helix aspersa maxima*. We tested the use of potassium sorbate (E202) as a preservative. The chemical composition of the *Helix aspersa maxima* eggs revealed high moisture content (84.5 %). The amounts disclosed for carbohydrates, proteins, lipids and ash were 6.7 %, 3.7 %, 0.1 %, 5 % respectively. The pH of “Caviar Pérola” used was slightly basic (8.40). Observation of the colour varied over time, becoming increasingly pink and dark when analyzed by the CIE L\*a\*b\*, validating the visual observations of the eggs at the time of analysis. There has been no evidence of the presence of *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and fungi in 10 grams of product. The addition of potassium sorbate to the excipient solution did not affect the “Caviar Pérola” preservation. The technique tested for the stabilization of the “Caviar Pérola” in this study proved ineffective for the preservation of the product within a useful commercial period (3 months). It conditioned the colour stability and was unable to inhibit the microbial growth.

Key words: Caviar Pérola, *Helix aspersa*, snail, microbiological stability, physical-chemical stability.

## Índice

	Pag.
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice	v
Índice de Figuras e Gráficos	viii
Índice de Tabelas	ix
Índice de abreviaturas e siglas	x
I INTRODUÇÃO	1
II REVISÃO DE LITERATURA	2
1. Caracol terrestre	2
1.1. Biologia	2
1.1.1. Descrição anatómica	2
1.1.2. Reprodução	4
1.1.3. Ecologia	8
1.1.3.1. Estivação e hibernação	9
1.1.3.2. Atividade sazonal	9
1.1.3.3. Atividade diária	10
1.2. Sistemas de produção	10
1.3. Alimentação	11
1.4. Carne de caracol	12
1.5. Consumo de Caviar e “Caviar Pérola”	14
1.5.1. Consumo de Caviar	14
1.5.2. “Caviar Pérola”	15
2. Segurança alimentar na produção de caracóis	16
2.1. Perigos químicos	17
2.2. Perigos físicos	17
2.3. Perigos biológicos	17
3. Legislação aplicável na produção do “Caviar Pérola”	18
3.1. Regulamento (CE) n.º 178/2002	18
3.2. Regulamento (CE) n.º 852/2004	18
3.3. Regulamento (CE) n.º 853/2004	19
3.4. Regulamento (CE) n.º 1441/2007	20

3.5.	Regulamento (CE) n.º 1169/2011	21
4.	Alimento e Segurança Alimentar	21
4.1.	Deterioração de origem físico-química	23
4.2.	Deterioração de origem microbiana	23
4.3.	Aditivos e Sorbato de Potássio	24
III.	MATERIAL E MÉTODOS	27
1.	Amostragem	27
1.1.	Processamento da amostra	27
1.2.	Teste de conservação do produto	28
2.	Análises físico-químicas	31
2.1	Composição centesimal	31
2.1.1.	Humidade	31
2.1.2.	Cinzas	31
2.1.3	Proteína	32
2.1.4.	Lípidos	33
2.1.5.	Hidratos de carbono	33
2.2.	Determinação do potencial hidrogeniónico das soluções	34
2.3.	Medição da Cor	34
3.	Análises microbiológicas	35
3.1.	Preparação da amostra	35
3.2.	Preparação das suspensões	35
3.3.	Contagem de microrganismos a 30°C	35
3.4.	Contagem de bolores e leveduras a 25 °C	35
3.5.	Contagem de <i>Escherichia coli</i>	36
3.6.	Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	36
3.7	Pesquisa de <i>Listeria spp.</i>	37
3.8	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positivo	37
3.9	Pesquisa de <i>Clostridium perfringens</i>	37
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1.	Análises físico-químicas	38
1.1.	Composição centesimal	38
1.2.	Determinação do Potencial hidrogeniónico (pH) das soluções teste e controlo	40
1.3.	Análise da cor	41

2.	Análises microbiológicas	44
2.1.	Contagem de microrganismos a 30°C	44
2.2.	Contagem de bolores e leveduras a 25°C	47
2.3.	Contagem <i>Escherichia coli</i>	47
2.4.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	48
2.5.	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	48
2.6.	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positivo	48
2.7.	Pesquisa de <i>Clostridium perfringens</i> .	48
V.	CONCLUSÃO	51
	BIBLIOGRAFIA	52

## Índice de Figuras e Gráficos

	Pag.
Figura 1 – Morfologia do caracol <i>Helix aspersa</i> .	3
Figura 2 – <i>Helix aspersa</i> : acasalamento.	5
Figura 3 - Diagrama geral do processo de fertilização cruzada.	6
Figura 4 – <i>Helix aspersa</i> : Tempo (em horas) da ovopostura.	7
Figura 5 – Preparações alimentares à base de caracóis terrestres.	14
Figura 6 – “Caviar Pérola”.	16
Figura 7 – Preparação da amostra.	28
Figura 8 – Acondicionamento do “Caviar Pérola” em frascos com tampa, esterilizados, antes e após a retirada da solução controlo.	29
Figura 9 – Padrões de cor desenvolvidos a partir das coordenadas CIE L*a*b* obtidas através da análise da cor do “Caviar Pérola” ao longo do tempo.	42
Figura 10 – Variação do aspeto dos ovos ao longo do tempo.	42
Figura 11 – Grupo controlo após homogeneização em homogeneizador Stomacher.	43
Figura 12 – Colónias obtidas a partir das suspensões testadas ( $10^{-1}$ a $10^{-6}$ ) e lâmina corada com a técnica de Gram (1000x)	47
Gráfico 1 – Lote 1: Evolução das contagens dos microrganismos totais a 30°C (log UFC/g).	44
Gráfico 2 – Lote 2: Evolução das contagens dos microrganismos totais a 30°C (log UFC/g).	45

## Índice de Tabelas

	Pag.
Tabela 1 – Delineamento experimental.	30
Tabela 2 – Composição centesimal das amostras dos ovos de <i>Helix aspersa máxima</i> e valor energético.	39
Tabela 3 – Parâmetros de cor (L*, a*, b*) para amostra de “Caviar Pérola”	41
Tabela 4 - Contagens dos microrganismos totais a 30°C (log UFC/g).	44

## Lista de Abreviaturas e Siglas

%	Percentagem
°C	Graus Celsius
A.O.A.C.	Association of Analytical Communities
Abr	Abril
ABVT	Azoto Básico Volátil Total
ADI	Acceptable Daily Intake
API	Teste bioquímico miniaturizado para identificação de microrganismos
APIA	Agence de Promotion des Investissements Agricoles
APT	Água Peptonada Tamponada
BHI	Brain Heart Infusion
C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> KO <sub>2</sub>	Sorbato de potássio
CE	Comunidade Europeia
CIELab	Commission internationale de l'éclairage coordenadas L*a*b*
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species
CRBA	Cooke Rose Bengal Agar
CVBLB	Caldo verde brilhante lactose bile 2%
EFSA	European Food Safety Authority
g	Gramma
h	Horas
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
HCl	Ácido clorídrico
INSA	Instituto Nacional de Saúde
ISO	International Organization for Standardization
Jul	Julho
Jun	Junho
Kg	Quilograma
log 10	Logaritmo na base dez
Lux	Intensidade de iluminação
Mai	Maio
Mar	Março
mg	Miligramas
ml	Mililitros
MRVS	Meio modificado Rappaport-Vassiliadis semi sólido
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amónio
NP	Norma Portuguesa
PALCAM	Meio selectivo para o isolamento e detecção de espécies de <i>Listeria spp.</i>
PCA	Plate Count Agar
pH	Potencial Hidrogeniónico
RI	Radiação infravermelha
sp.	Espécie

spp.	Espécies
SPS	Sulfite-polymyxin-sulfadiazine
TBA	Teste do ácido Tiobarbitúrico
TSA	Trypticase Soy Agar
TSI	Triple Sugar Iron (agar)
UE	União Europeia
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV	Radiação ultra violeta



## I. INTRODUÇÃO

Desde sempre que a alimentação, a qualidade e a segurança dos alimentos constituem uma preocupação para o Homem, ainda que estes conceitos tenham evoluído ao longo dos tempos. As mudanças na sociedade, a sofisticação da produção de alimentos, as mudanças nos hábitos de vida, de rotina e de alimentação, resultaram na alteração das preferências do consumidor. A progressiva sofisticação da sociedade leva os consumidores a desejar não somente a satisfação das necessidades básicas, mas produtos e serviços que lhes ofereçam significados simbólicos e emocionais.

O caviar de esturjão é conhecido historicamente como item alimentar de luxo e altamente desejável. O seu comércio na união europeia movimentou aproximadamente 20 milhões de euros no ano de 2009. Devido ao seu elevado valor comercial, têm surgido diversos produtos como “substitutos do caviar”, a maioria dos quais tem origem nas ovas de peixe de variadas espécies (salmão, bacalhau, arenque, entre outras). Entretanto, outros substitutos derivados de produtos de origem vegetal e animal estão a ser comercializados e dentre estes, o “Caviar Pérola”.

O “Caviar Pérola” é obtido a partir dos ovos do caracol da espécie *Helix aspersa maxima*. Não há um modo de processamento padronizado para este produto, a forma de preparação e ingredientes utilizados variam desde o uso de tratamentos térmicos como a pasteurização à utilização de salmouras contendo ervas aromáticas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade do “Caviar Pérola”, elaborado para este estudo, no que se refere às características microbiológicas e físico-químicas.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Caracol terrestre (*Helix aspersa*)

#### 1.1. Biologia

Os caracóis terrestres pertencem ao filo *Mollusca* e classe *Gastropoda*, da qual fazem parte as lesmas e diversos animais marinhos protegidos por concha. A espécie *Helix aspersa*, descrita pela primeira vez por Müller em 1774, pertence à subclasse *Pulmonata* sendo designada como um molusco gastrópode pulmonado. *Helicidae* é o nome da família à qual pertence (White-McLean, 2011).

O *Helix Aspersa* é uma espécie originária da região do Mediterrâneo e da Europa Ocidental, do noroeste da África e da Península Ibérica até à Ásia Menor (Morei, 2012).

##### 1.1.1. Descrição anatômica

O caracol é composto por duas partes: o corpo e a concha (Figura1). O corpo divide-se em três partes – a cabeça, o pé e a massa visceral. A cabeça não se encontra bem demarcada e suporta dois pares de tentáculos retrácteis, dos quais um par de tentáculos telescópicos, com posição dorsal e de maior comprimento em cuja extremidade se situam os olhos e que funcionam como sensores de luz, e um par de tentáculos menores situados ventralmente denominados de tentáculos tácteis que funcionam como estruturas sensoriais tácteis e olfativas (Agro-Services/ Agence de Promotion des Investissements Agricoles [APIA], 2004; Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

Na superfície dorsal, atrás da cabeça, situam-se duas pregas de pele que formam o manto. O espaço entre o manto e o corpo do caracol é a cavidade do manto. Esta cavidade é particularmente vascularizada pois nela se alojam os pulmões e órgãos respiratórios que comunicam com o exterior pelo poro ou orifício respiratório (pneumóstoma) (Hickman et al., 2011).

Na boca possui o órgão mastigador característico, a rádula, semelhante a uma língua com várias fileiras de pequenos denticulos, que raspam os alimentos produzindo partículas menores com o objetivo de facilitar a ingestão (Ribas, 1986).

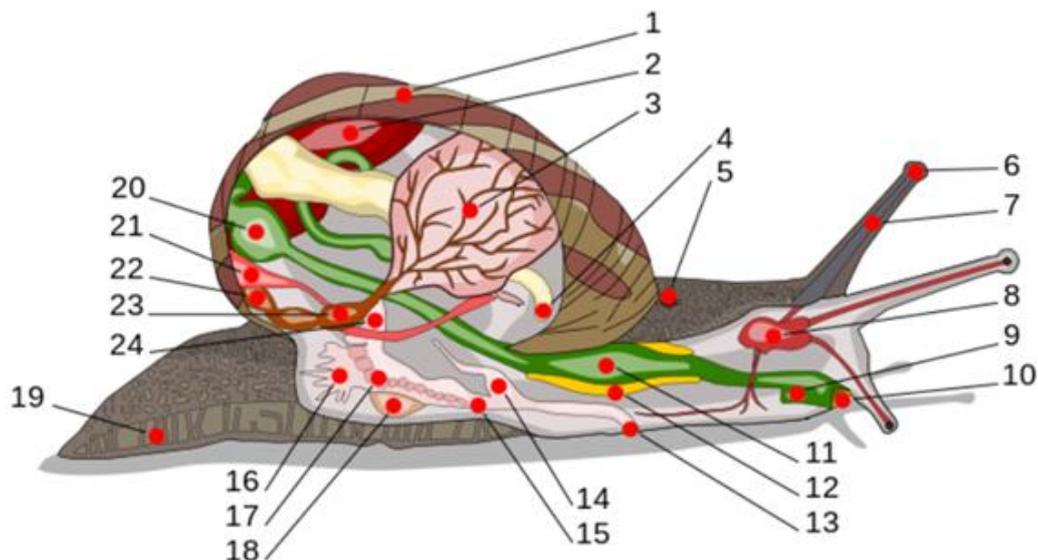
O pé, longo e muscular, ocupa quase toda a superfície ventral. Tal como a cabeça, não se encontra claramente demarcado do resto do corpo e possui uma estria

longitudinal, pouco profunda, que se estende ao longo da parte central do pé. É o órgão muscular de locomoção. O caracol move-se contraindo o seu pé e produzindo um muco, através das células epiteliais, que diminui o atrito e facilita a locomoção (White-McLean, 2011).

A concha caracteriza-se por possuir 4 a 5 espirais, e tem cor castanha interrompida por faixas amarelas. O tamanho do interior está entre 30-35 x 32-40mm. A abertura da concha é oblíqua com a margem branca fletida externamente. O ponto terminal da concha está voltado para dentro (Juříčková & Kapounek, 2009). É constituída por várias camadas, que são compostas de carbonato de cálcio e precipitado orgânico (Toader, 2012).

A massa visceral, em forma de crista, encontra-se alojada na concha. Ela contém os órgãos digestivo, circulatório, urinário, reprodutivo e respiratório. O sistema nervoso está distribuído por todo o corpo. O hepatopâncreas destaca-se dentre os órgãos mais importantes para esta espécie. Este órgão produz enzimas digestivas e possui também células que acumulam reservas de glicogénio, de gorduras e de cálcio (Garcia, 2006).

Figura 1 – Morfologia do caracol *Helix aspersa* (Adaptado de Nordsieck, 2013).



1-concha, 2-fígado, 3-pulmão, 4-ânus, 5-poro respiratório, 6-olho, 7-tentáculo, 8-gânglios cerebrais, 9-ducto salivar, 10-boca, 11-, 12-glândula salivar, 13-poro genital, 14-pênis, 15-vagina, 16-glândula mucosa, 17-oviducto, 18-saco de dardos, 19-pé, 20-estômago, 21-rim, 22-manto, 23-coração e 24-vasos deferentes

A espécie *Helix aspersa* assim como outros caracóis terrestres possuem os dois aparelhos reprodutivos (masculino e feminino), no mesmo indivíduo, são portanto

gastrópodes monoicoicos. O aparelho genital é extremamente complexo, produz esperma, oócitos e ovos, necessitando sempre de outro indivíduo para que ocorra a fecundação. O orifício genital é único e abre atrás da base do tentáculo ocular direito (Cirlan & Sindilar, 2010).

A glândula hermafrodita consiste de quatro lóbulos, cada um dos quais está representada por um grande número de folículos que contêm células germinativas masculinas, células germinativas femininas, células foliculares e células de Sertoli. O pênis é um órgão muscular e suas fibras são circulares, longitudinais, radiais e oblíquas (Cirlan & Sindilar, 2010).

Na estrutura do oviduto existem dois tipos de células: as células ciliadas e células secretoras. A glândula produtora de albúmen é responsável pela formação dos envelopes que envolvem os oócitos fertilizados e o parênquima glandular é constituído por células secretoras do albúmen e células labirínticas (Cirlan & Sindilar, 2010).

O *love dart* (dardo) é um órgão que está envolvido no processo de reprodução e é composto basicamente por carbonato de cálcio podendo ter entre 1 e 30 mm de comprimento. Sua função é penetrar na pele do parceiro no momento do acasalamento. Este “dardo” (*love dart*) transfere uma secreção produzida pelas glândulas mucosas do aparelho genital e contém uma mistura de hormonas que contribuem para os movimentos peristálticos do aparelho genital (Chase & Blanchard, 2006).

### 1.1.2. Reprodução

Durante as fases iniciais da reprodução, o átrio genital é evertido e começa a gradualmente a ser visível como uma protuberância branca no lado direito da cabeça do animal. É então inserido o dardo no parceiro. (Koene, 2006; Landolfa, Green & Chaisea, 2001). Esta etapa não é essencial para que aconteça a reprodução mas as possibilidades de fertilização de um caracol podem ser duplicadas quando está presente (Koene & Chase, 1998).

O disparo do dardo marca o fim do comportamento de namoro e é geralmente realizado por ambos os animais, embora não ao mesmo tempo. Após o lançamento do dardo, o saco do dardo, que produz e armazena o dardo, é forçosamente

projetado do poro genital, expulsando assim o dardo (Koene, 2006; Landolfa, Green & Chasea, 2013).

No seu caminho para fora, o dardo é coberto com muco das glândulas associadas ao saco do dardo. Com resultado do disparo, que é realizado uma vez por cada parceiro, dar-se a perfuração da pele do parceiro de acasalamento e, em quase metade dos casos, o dardo fica alojado (Koene, 2006; Landolfa, Green & Chasea, 2013).

Após esta etapa, o pênis é projetado e cada caracol tenta introduzi-lo no seu parceiro em simultâneo. A cópula tem sucesso quando os pênis de ambos os caracóis são inseridos no canal vaginal dos parceiros. Neste ponto, os espermatozoides são libertados juntamente com o plasma seminal e seguem para o órgão feminino do parceiro (Figura 2) (Koene, 2006; Landolfa, Green & Chasea, 2013).

Após a transferência, os espermatozoides movimentam-se no canal vaginal e chegam ao local de armazenamento de espermatozoides, *bursa copulatrix*, onde são armazenados antes de serem utilizados para a fertilização dos óvulos. O espermatozoide pode ser armazenado por até 4 anos neste órgão (Koene, 2006; Landolfa, Green & Chasea, 2013).

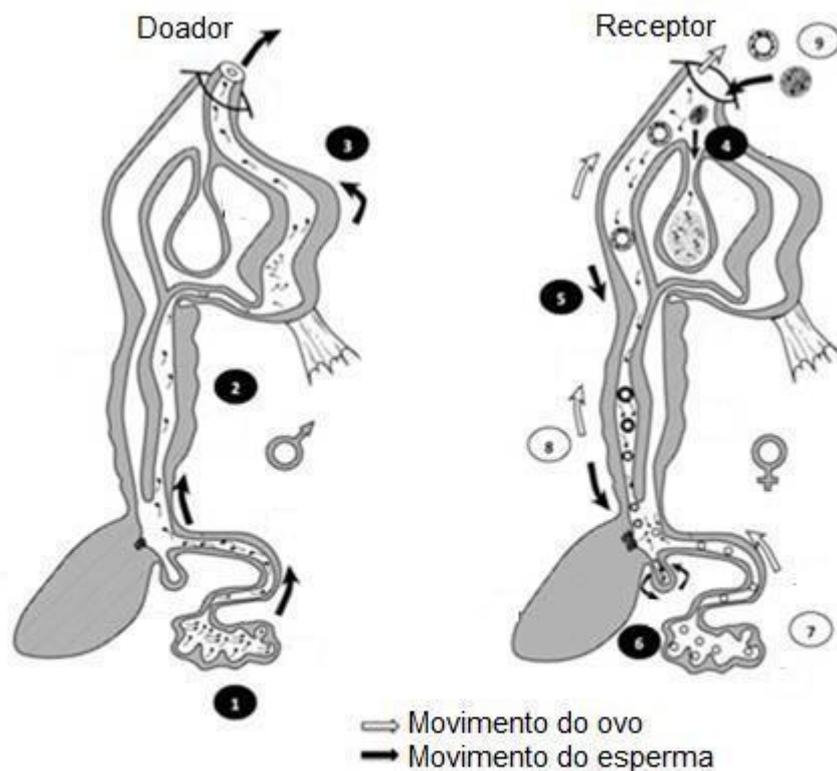
Figura 2 – *Helix aspersa*: acasalamento (Retirado de Tunner (2010)).



Uma pequena percentagem de espermatozoides depositados na *bursa copulatrix* migra para o oviduto e posteriormente migram do oviduto para o complexo bolsa-espermateca onde ocorre a fertilização. Os oócitos são voluntariamente libertados do *ovotestis* para o complexo bolsa-espermateca onde se irão unir com os espermatozoides que ali se encontram (Figura 3) (White-McLean, 2011).

Os óvulos (zigotos) são envolvidos com uma camada de albúmen, produzida pela glândula do albúmen. Os ovos são transportados a partir do complexo de bolsa-espermateca para o oviduto comum e são dispostos em linha (semelhante a um colar de pérolas). Várias camadas de material rico em cálcio são, então, depositadas em torno de cada ovo antes de ser iniciada a postura (White-McLean, 2011).

Figura 3 - Diagrama geral do processo de fertilização cruzada (Adaptado de White-McLean (2011)).



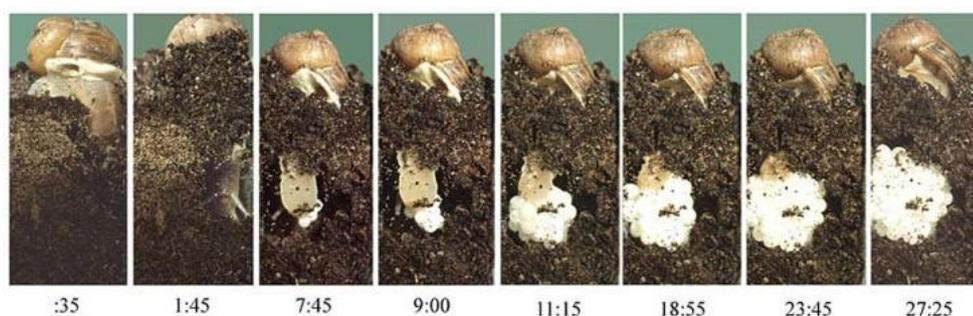
1-liberação dos espermatozoides; 2-introdução do esperma; 3-eliminação através do pênis; 4-entrada na "bursa copulatrix"; 5-migração do espermatozóide; 6-complexo bolsa-espermateca; 7-liberação dos óvulos; 8-trajeto dos Zigotos; 9-ovopostura.

A glândula do albúmen, glândula acessória do aparelho reprodutivo feminino dos gastrópodes pulmonados, fornece os nutrientes responsáveis pelo desenvolvimento embrionário. O fluido secretado pela glândula do albúmen é denominado albúmen ou líquido perivitelino. No caracol gigante africano (*Strophocheilus oblongus*), o ovo pesa aproximadamente 1 a 2,9 g e contém 72% de água, 18% de albúmen e 10% de casca. O albúmen fornece proteína e galactogénio e determina o número de ovos que serão produzidos para postura (Morishita, Mukai & Saleuddin, 1998; Egonmwan, 2007).

A postura dos ovos (ovopostura) ocorre de três a seis dias após a fertilização (Figura 4). Os ovos são brancos, esféricos, com cerca de 3mm de diâmetro. São depositados num ninho construído pelo caracol, escavando um orifício no solo de 1 a 1,5 centímetros de profundidade. O número de ovos depositados de uma só vez varia de 30 a 120. Os ovos são posteriormente cobertos com uma mistura de solo e muco seguido por uma quantidade de excrementos (Canadian Food Inspection Agency, 2011).

A frequência de ovopostura está sujeita à temperatura, humidade e condições do solo. Uma baixa temperatura, baixa humidade e solo seco não são adequados para a preparação de um ninho, o que poderá inibir a postura (Gomot, Gomot & Griffond, 1989). O tempo quente e húmido, induz o aumento do número de posturas, cuja frequência pode ser até de uma vez por mês (Dekle & Fasulo, 2001).

Figura 4 – *Helix aspersa*: Tempo (em horas) da ovopostura (Retirado de Chane (2013)).



A incubação e a eclosão demoram entre 15 e 30 dias e os recém-nascidos, permanecem 2 a 5 dias no ninho antes de vir à superfície para se alimentarem. Durante os meses de Verão, os ovos eclodem em cerca de duas semanas. O peso

dos filhotes varia entre os 0,02 e 0,04 g (Agro-Services/APIA, 2004). As cascas dos filhotes são frágeis, translúcidas e apresentam somente uma espiral, lisa, castanho claro a preto salpicado, sem qualquer padrão de bandas ou manchas enquanto recém-nascidos (Canadian Food Inspection Agency, 2011).

Para atingir a maturidade os caracóis demoram entre 10 meses a 2 anos (Dekle & Fasulo, 2001). A velocidade de maturação é determinada pela concentração de cálcio disponível no seu ambiente (Canadian Food Inspection Agency, 2011). Considera-se um animal adulto quando a sua concha apresenta a consistência firme e dura e com uma ligeira projeção para o exterior (Ribas, 1986).

### 1.1.3. Ecologia

Os fatores ambientais têm um papel determinante no desenvolvimento dos caracóis. Os principais parâmetros ambientais que influenciam o crescimento dos caracóis são a humidade, temperatura, iluminação e características do solo (Perea et al., 2006; Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008; Amaro, 2009).

Assim, os locais considerados favoráveis são formados por solo encharcado, não compactado, que não seja ácido e de composição calcária. O teor de humidade do solo favorável é de 80% da capacidade de campo (capacidade de retenção de água). Na medida em que os caracóis são de hábitos noturnos, nas horas de escuridão, uma humidade do ar superior a 80% promoverá uma boa atividade dos caracóis e conseqüentemente, o seu crescimento (Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

Deve existir um equilíbrio constante entre o teor de água dos tecidos do caracol e a humidade relativa do ambiente. São particularmente ativos na estação chuvosa, enquanto a estação seca causará períodos de dormência. A humidade relativa preferida situa-se entre 75 e 95 % e o vento é prejudicial à criação uma vez que ativa a evaporação e a ocorrência de desidratação (Agro-Services/APIA, 2004; Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

A temperatura do corpo é dependente da temperatura externa. Para o *Helix aspersa*, uma temperatura inferior a 7 °C resultará em hibernação e uma temperatura demasiado elevada, acima de 28 °C, irá induzir à dormência. A temperatura ótima, para que o crescimento dos caracóis ocorra nas melhores condições é de cerca de 20 °C. Verifica-se ainda que temperaturas inferiores a -5 °C são letais para o caracol (Agro-Services/APIA, 2004; Perea et al., 2006; Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

Embora seja um animal cuja atividade ocorre principalmente durante a noite, a luz desempenha um papel importante na função reprodutora e no crescimento e é caracterizada por três parâmetros: fotoperíodo, valor da intensidade luminosa e cor (Agro-Services/APIA, 2004).

Os caracóis necessitam de 12 a 16 horas por dia de fotoperíodo para promover o crescimento. É necessária uma intensidade de luz entre 60-100 lux para promover a reprodução, enquanto 60 lux é suficiente para o seu crescimento. A luz monocromática vermelha estimula a reprodução e a fertilidade. Todavia, para o crescimento, a luz vermelha é mais favorável nas primeiras quatro semanas; a partir desta altura a luz branca é a mais indicada (Agro-Services/APIA, 2004).

#### 1.1.3.1. Estivação e hibernação

Uma das estratégias que explica o seu sucesso ecológico é a capacidade de alterarem o metabolismo e permanecerem, por longos períodos, inativos em resposta às condições ambientais adversas. A estivação e hibernação são respostas endógenas a fatores ambientais como a temperatura e o fotoperíodo (Agro-Services/APIA, 2004, Perea et al., 2006).

Outro mecanismo importante é a adaptação do padrão diário de atividade às condições ambientais, desenvolvendo um ritmo circadiano, caracterizado por um período de descanso, durante o dia, que ocorre em condições de baixa humidade e um ativo, noturno, sob condições de alta humidade relativa (Perea et al., 2006).

Contudo, cada espécie necessita para o seu crescimento e reprodução de um conjunto de condições ecológicas ambientais que estão sujeitos a variações sazonais. O caracol, portanto, tem fases de inatividade sazonais e diárias no ambiente natural (Agro-Services/APIA, 2004).

#### 1.1.3.2. Atividade sazonal

A atividade do caracol começa na primavera, a taxa de atividade da população aumenta lentamente atingindo o pico máximo no verão, e depois diminui até entrar em hibernação no fim do outono (Ribas, 1986).

A hibernação ocorre durante o inverno e o caracol entra em letargia. Uma membrana calcificada, o epifragma, é produzida durante a hibernação para selar a abertura da

concha e evitar a desidratação. O animal vive a partir de suas reservas, principalmente do glicogénio armazenado (Perea et al., 2006)

Durante a hibernação, todos os metabolismos se tornam lentos e um caracol pode perder até 30% do seu peso (perda de água) nesse período. Todavia, na primavera, as reservas perdidas serão, muito rapidamente, recuperadas (Ribas, 1986).

A estivação caracteriza-se por um ritmo de vida lento. Este comportamento é observado em regiões onde o verão é muito quente e seco. Assim como a hibernação, o animal retrai-se no interior da concha e a abertura é fechada, através de membranas secretadas pelo próprio caracol. Durante o período de estivação, a respiração e os movimentos cardíacos estão normais, daí resultar um rápido esgotamento das reservas de água e de energia (Agro-Services/APIA, 2004).

#### 1.1.3.3. Atividade diária

O caracol tem um ritmo de atividade diária intimamente relacionado com o fotoperíodo. Contudo, esta atividade pode ser inibida pela temperatura e humidade adversas. Em condições ótimas de temperatura e humidade, o caracol torna-se ativo a partir do pôr-do-sol tendo em foco a alimentação como atividade principal. A cada três noites de atividade o caracol necessita de uma noite de descanso (Perea et al., 2006).

A fase ativa tem uma duração de seis horas. A fase de inatividade dura pelo menos dezoito horas e durante esta fase, o caracol manifesta pouca atividade locomotora, sexual ou nutricional (Agro-Services/APIA, 2004).

## 1.2. Sistemas de produção

A criação de caracóis (helicicultura) pode ser realizada de forma extensiva, semi-intensiva ou intensiva, em ordem crescente de complexidade, gestão e de recursos financeiros:

- Sistema extensivo: ao ar livre, sistema de criação de caracóis em liberdade.
- Sistema semi-intensivo ou misto: a postura e incubação/eclosão dos ovos ocorre num ambiente controlado, os caracóis jovens são, então, removidos após 6-8 semanas para recintos no exterior, para que cresçam e/ou engordem.

- Sistema intensivo: sistema em cativeiro, por exemplo, em viveiros com túneis de plástico, estufas e edifícios com clima controlado (Amaro, 2009, Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008; Agro-Services/APIA,2004)

Independentemente do tamanho e tipo da exploração de caracóis, as instalações devem ser à prova de fuga e ter espaço adequado. Neste sentido, as densidades de criação adequadas variam entre  $\geq 100$  caracóis por  $m^2$  para os recém-nascidos, até 7-10 caracóis por  $m^2$  para os reprodutores. Os caracóis não toleram o sobrepovoamento, pois impede o seu desenvolvimento e aumenta o risco de doenças. Portanto, as áreas de produção devem estar de acordo com a fase de crescimento dos caracóis (recém nascidos, juvenis, reprodutores, ou adultos, engordados para consumo) (Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

### 1.3. Alimentação

Os caracóis são vegetarianos mas evitam plantas com folhas com tricoma (pelos) ou que produzam substâncias químicas tóxicas. Os caracóis jovens preferem folhas tenras e rebentos; eles consomem cerca do dobro de comida dos caracóis adultos. À medida que se desenvolvem, alimentam-se, cada vez mais, de detritos: folhas caídas e húmus. O tipo alimentação deverá ser mantida ao longo do crescimento, e no caso de ser necessário alterar a dieta, os novos itens alimentares deverão ser introduzidos gradualmente (Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

Também no que diz respeito a alimentação existem diferenças entre os sistemas de criação extensivo, semi-intensivo e intensivo (Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

Num sistema extensivo os caracóis alimentam-se, exclusivamente, de vegetação plantada no local em que se encontram, especificamente para este objetivo, ou seja nos recintos com cercados e de criação em liberdade (Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

Num sistema de criação semi-intensiva de caracóis, fornece-se alimento concentrado aos recém-nascidos, aos juvenis e possivelmente aos caracóis reprodutores que se encontram nas caixas de criação ou num sistema de gaiolas afixadas no solo (Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

Num sistema intensivo de criação, fornece-se alimento concentrado a todos os caracóis, qualquer que seja a fase de crescimento em que se encontrem. Os

caracóis são mantidos em caixas de criação ou em gaiolas afixadas no solo. Neste tipo de sistema, é utilizado alimento concentrado, formulado de maneira a providenciar em cada fase de desenvolvimento todas as proteínas, hidratos de carbono, minerais e vitaminas requeridas para um crescimento ótimo (Cobbinah, Vink & Onwuka, 2008).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de apresentar o balanço nutricional necessário na formulação de rações para os caracóis terrestres (Hayashi, Soares, Boscolo, Galdioli & Furuya, 2000; Soares, Hayashi & Cocito, 2002; Milinsk et al., 2004; Barboza & Romanelli, 2005). Num sistema intensivo, a alimentação é um dos itens mais onerosos ao custo de produção, uma vez que este exige o uso de alimento concentrado equilibrado e de qualidade para se obter índices de desenvolvimento e produção satisfatórios (Hayashi et al., 2000).

Nos sistemas extensivos de produção, usa-se exclusivamente vegetação cultivada nos parques. A vegetação é escolhida tendo em consideração a disponibilização de diferentes espécies vegetais, com tamanho de folha e palatabilidade variados. Esta associação permite que os parques não fiquem completamente desprovidos de vegetação e possam disponibilizar sombra e proteção. As espécies cultivadas como alimento são a beterraba, trevo branco, espinafre, alface, chicória, couve-galega e rabanete, entre outras (Begg, 2006).

#### 1.4. Carne de caracol

A descoberta de conchas de caracol durante escavações arqueológicas confirma que os caracóis foram usados na dieta humana desde tempos pré-históricos. A origem antrópica de acumulações de gastrópodes terrestres tornou-se evidente em certas áreas geográficas e em determinados momentos históricos. Especificamente, o consumo de caracóis terrestres, durante o final do período Paleolítico foram observados em diversas áreas da bacia mediterrânica (Lloveras et al., 2011).

Existem muitas espécies de caracóis, a maioria deles comestíveis, amplamente espalhadas por toda a Europa, Norte da África, Américas e Ásia Menor. As espécies mais populares são *Helix pomatia* e *Helix aspersa* especialmente apreciadas na alimentação humana. Mas há também outras espécies comestíveis como *Helix lucorum*, *Achatina fulica*, *Helix Lacteea*, *Helix hortensis* (Morei, 2012).

Atualmente, os caracóis são um alimento consumido em todo o mundo e a sua comercialização é de grande interesse em muitos países por possuir alto valor económico e ser considerado alimento de luxo (Lubell, 2003).

Na culinária asiática a carne de caracol é considerada uma iguaria. Em alguns países africanos, como a Nigéria e a África do Sul, o caracol gigante africano (*Achatina fulica*) é também um alimento tradicional. Os caracóis são consumidos principalmente na França e na Itália, bem como em Portugal, Espanha, Alemanha e Reino Unido. Em França, o consumo anual é aproximadamente de cinco mil toneladas, das quais 60% são importadas (Lubell, 2003).

Na década de 80 do século passado, o consumo de caracóis foi de cerca de 320 mil toneladas por ano em todo o mundo; a maioria desses caracóis foram recolhidos da natureza a partir de países do Leste Europeu, como a Polónia, Roménia, Bulgária e outros, tendo a helicultura contribuído apenas com 5.000 toneladas. Na década seguinte (anos 90), o consumo cresceu rapidamente, atingindo as 405 mil toneladas por ano, das quais 24 mil toneladas foram produzidas em helicultura. Em 2010 e 2011 registou-se um consumo de cerca de 400 mil toneladas de caracóis (representando 10 bilhões de euros em negócio), dos quais apenas 55 mil toneladas foram produzidas em helicultura (Toader, 2012).

As espécies mais utilizadas na helicultura, e que apresentam características vantajosas como rusticidade, alta prolificidade, crescimento rápido, boa conversão alimentar e carne com excelentes características organolépticas são as espécies *Achatina fulica* e *Helix aspersa*. As espécies do género *Helix* apresentam maior valor económico para a comercialização, devido às suas características desejáveis como a cor mais clara de sua carne que é melhor aceite no mercado consumidor podendo ser preparada das mais variadas formas (Figura 5) (Hayashi, Soares, Matsushita, Galdioli & Cocito, 2004).

Estudos sobre o valor nutricional da carne de caracol revelaram uma importante quantidade de proteína de elevado valor biológico devido ao seu teor em aminoácidos essenciais e um baixo teor em gordura, representando uma fonte proteica alternativa para indivíduos com exigências dietéticas restritivas à gordura. É também rica em vitaminas e minerais, com destaque para o ferro (Barboza & Romanelli, 2005; Çağiltay, Erkan, Tosun & Selçuk, 2011).

Estudos nutricionais desenvolvidos sobre a porção muscular do caracol *Achatina fulica* demonstraram que a composição da carne se aproxima da composição da maioria dos peixes de água doce, apresentando um teor de humidade de 79-84%, proteína de 12-16%, um teor de lípidos de 0,5-0,8% e elevados níveis de minerais (1,5%) como cálcio, manganês, magnésio, zinco, ferro e iodo, apresentando um valor energético relativamente baixo, de cerca de 251-335 KJoules/100g) (Barboza & Romanelli, 2005; Morei, 2012).

Figura 5 – Preparações alimentares a base de caracóis terrestres (Adaptado de BBC (2013) e Msxeroz (2013)).



## 1.5. Consumo de Caviar e “Caviar Pérola”

### 1.5.1. Consumo de Caviar

A progressiva sofisticação das sociedades leva os consumidores a desejar não somente a satisfação de necessidades básicas, mas produtos e serviços que lhes ofereçam significados simbólicos e emocionais (Galhanone & Toledo, 2008).

Os casamentos tardios e a tendência de famílias mais reduzidas traduzem-se num maior rendimento disponível para adquirir produtos mais caros e vivenciar mais atividades de lazer. Da mesma forma, o aumento do número de solteiros é um apelo ao consumo de produtos que aumentem o bem-estar e favoreçam a autoestima (Silverstein & Fiske, 2003).

Na gastronomia, ingredientes considerados luxuosos estão cada vez mais presentes. As ovas de peixe têm sido historicamente vistas como itens alimentares de luxo e altamente desejáveis. As ovas de peixe de maior valor são as de esturjões capturados no Mar Cáspio, constituintes do caviar (Johannesson, 2006). O Regulamento (CE) n.º 865/2006 define caviar como "Ovos não fecundados, mortos e

transformados de todas as espécies de Acipenseriformes; igualmente designados por ovas".

No ano de 2009, o comércio do caviar na União Europeia movimentou aproximadamente 20 milhões de euros (Direcção-Geral dos Assuntos Marítimos e das Pescas, 2012). Desde 1998, o comércio internacional de todas as espécies de esturjões foi regulamentado pela CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), devido a preocupações sobre o impacto da exploração insustentável e o comércio ilegal nas populações de esturjão em estado selvagem. Todos os esturjões e partes ou seus derivados (por exemplo, caviar, carne, pele, etc.) que entram no comércio internacional necessitam da emissão de licenças e certificados da CITES.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos produtos para imitar o caviar, a partir de ovos de outras espécies de peixes e foram denominados "Substitutos de caviar". Usando processos adequados para cada tipo de peixe, é possível fazer produtos semelhantes com ovos de muitas espécies de peixes como Lumpo, Salmão, Truta, Arenque, Atum, Tainha, Bacalhau ou Peixe-voador. O processamento das ovas passa por serem lavadas, limpas de restos biológicos, salgadas e por vezes prensadas ou secas, com ou sem aditivos e corantes (Monfort, 2002; Johannesson, 2006).

Outros produtos também estão sendo desenvolvidos para imitar o caviar, a partir de algas ou soja, por exemplo, utilizando agentes gelificantes para produzir esferas a imitar o aspeto dos ovos (Johannesson, 2006; Regulamento (UE) n.º 738/2013).

Atualmente, existem no mercado mundial, diferentes substitutos do caviar de origem vegetal ou animal, como "Caviar Pérola".

#### 1.5.2. "Caviar Pérola"

O "Caviar Pérola" (Figura 6) é um produto obtido dos ovos da espécie *Helix aspersa maxima* (Gros-Gris) também conhecido como "Caviar Branco", "Perles de France" ou "Pérolas de Afrodite", publicitado pelas qualidades afrodisíacas. Os ovos de caracol têm sido usados como iguarias há séculos sendo referidos em banquetes romanos, egípcios e gregos (Daily Mail Reporter, 2011).

“Caviar Pérola” é um ingrediente que se vem tornando popular na gastronomia moderna. O preço pode chegar a 100 dólares por uma embalagem com 30 gramas e é utilizado para conferir um detalhe de requinte aos pratos. Alguns chefes de cozinha descrevem o *flavour* deste produto como a lembrar sabores terrosos (húmus, terra molhada e trufas), de pinho, cogumelo, cebola e alecrim. (Rummell, 2012).

A produção do “Caviar Pérola” exige um elevado controlo na criação do caracol, para a obtenção de uma matéria-prima com qualidade. No processamento, alguns produtores utilizam a pasteurização. Contudo, há relatos que indicam que esse procedimento elimina os sabores terrosos do caviar. Há produtores que fazem uso de um rápido branqueamento dos ovos num “caldo quente”, a que se segue uma cura em sal, amido, ácido cítrico e alecrim (Guillaume, 2001; Rummell, 2012).

Outros produtores preparam os ovos de caracol numa salmoura, normalmente de flor de sale e embalam a vácuo em ambiente escuro (conservação a 4 °C). Este processo de preparação é praticamente idêntico ao do caviar (Guillaume, 2001; Rummell, 2012).

Figura 6 – “Caviar Pérola” (Retirado de Fichtner (2011)).



## 2. Segurança alimentar aplicada ao produto “Caviar Pérola”.

A comissão do *Codex Alimentarius* define perigo em alimentos como a presença de qualquer agente químico, físico e biológico que possa tornar um alimento prejudicial

para o consumo humano (Codex Alimentarius Commission, 1969). Os perigos para os produtos originários do caracol terrestre podem então ser classificados em perigos químicos, físicos e biológicos.

### 2.1. Perigos químicos

Os gastrópodes pertencem às espécies de invertebrados que exibem das mais elevadas capacidades de acumulação de metais pesados no reino animal. A maior parte dos metais pesados tem como local principal de acumulação o hepatopâncreas. Por essa razão, os caracóis têm servido como bioindicadores de contaminação ambiental (Coughtrey & Martin, 1977; Berger & Dallinger, 1989). Contudo, não existe informação sobre a acumulação de metais pesados no “Caviar Pérola”.

### 2.2. Perigos físicos

Na produção do “Caviar Pérola”, a postura dos ovos em turfa favorece a presença de agentes físicos, como pequenas pedras ou areias por exemplo.

### 2.3. Perigos biológicos

As bactérias, os ácaros e os nematodes são as principais causas de doenças e parasitoses nos caracóis (Amaro 2009). Para o “Caviar Pérola”, estes organismos vivos são considerados perigo biológico uma vez que podem contaminar a matéria-prima.

Reye, Martínez, Martínez e Herrera (2007), apresentaram um estudo cujo objetivo foi identificar e classificar os agentes patogénicos que afetam os caracóis do género *Helix aspersa*. Este trabalho demonstrou que as bactérias isoladas de animais saudáveis pertenciam às espécies *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* e *Escherichia coli* e, portanto, poderão ser classificados como microrganismos comensais destes gastrópodes terrestres.

Os principais agentes causadores de doença em caracóis da espécie *Helix aspersa* pertencem aos géneros bacterianos *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Hafnia sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Arcanobacterium sp.*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* e *Streptococcus sp.*. As enfermidades fúngicas são causadas

pelos géneros *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Geotrichum sp.* e às doenças parasitárias corresponderam espécies da família *Strongyloididae*, *Oxiuridae*, *Nyctotheridae* e ao ácaro *Ricardoella limacum* (Reye et al., 2007).

### 3. Legislação aplicável na produção do “Caviar Pérola”

Para o processamento do “Caviar Pérola”, deverão ser cumpridos regulamentos estabelecidos pela união europeia que definem as normas para a produção e comercialização de produtos alimentares a fim de obter um produto de qualidade.

#### 3.1. Regulamento (CE) n.º 178/2002

O presente regulamento prevê os fundamentos que visam garantir um elevado nível de proteção da saúde humana e dos interesses dos consumidores em relação aos géneros alimentícios, assegurando, ao mesmo tempo, o funcionamento eficaz do mercado interno. É aplicado a todas as fases da produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios e de alimentos para animais.

Este regulamento veio estabelecer os princípios gerais que regem os géneros alimentícios e os alimentos para animais em geral e, em particular, a sua segurança, a nível comunitário e nacional, e estabelece procedimentos para questões com impacto direto ou indireto na segurança dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais. Portanto, é considerado a base da legislação no se refere à segurança dos alimentos.

O regulamento descreve género alimentício como “qualquer substância ou produto, transformado, parcialmente transformado ou não transformado, destinado a ser ingerido pelo ser humano ou com razoáveis probabilidades de o ser”.

#### 3.2. Regulamento (CE) n.º 852/2004

O Regulamento (CE) n.º 852/2004 estabelece as regras gerais destinadas aos operadores das empresas do sector alimentar no que se refere à higiene dos géneros alimentícios, tendo em particular consideração os seguintes princípios:

- a) Os operadores do sector alimentar são os principais responsáveis pela segurança dos géneros alimentícios;

- b) A necessidade de garantir a segurança dos géneros alimentícios ao longo da cadeia alimentar, com início na produção primária;
- c) No caso dos géneros alimentícios que não possam ser armazenados com segurança à temperatura ambiente, a importância da manutenção da cadeia do frio, em especial para os alimentos congelados;
- d) A aplicação geral dos procedimentos baseados nos princípios HACCP, associadas à observância de boas práticas de higiene, deve reforçar a responsabilidade dos operadores das empresas do sector alimentar;
- e) Os códigos de boas práticas constituem um instrumento valioso para auxiliar os operadores das empresas do sector alimentar, a todos os níveis da cadeia alimentar, na observância das regras de higiene e dos princípios HACCP;
- f) A necessidade de serem estabelecidos critérios microbiológicos e requisitos de controlo da temperatura baseados numa avaliação científica do risco;
- g) A necessidade de assegurar que os géneros alimentícios importados respeitem, pelo menos, os mesmos padrões em termos de higiene que os géneros alimentícios produzidos na Comunidade ou padrões equivalentes.

Segundo o Regulamento (CE) n.º 852/2004, o “Caviar Pérola” é classificado como “produto transformado”. Neste regulamento entende-se por “produto transformado” os géneros alimentícios resultantes da transformação de produtos não transformados. Estes produtos podem conter ingredientes que sejam necessários ao seu fabrico, por forma a dar-lhes características específicas.

### 3.3. Regulamento (CE) n.º 853/2004

O presente regulamento estabelece regras específicas para os operadores das empresas do sector alimentar no que se refere à higiene dos géneros alimentícios de origem animal. Estas regras complementam as previstas no Regulamento (CE) n.º 852/2004 e são aplicáveis aos produtos de origem animal transformados e aos não transformados.

Este regulamento referencia os caracóis como gastrópodes terrestres das espécies *Helix pomatia* (Linné), *Helix aspersa* (Müller), *Helix lucorum* e espécies da família

*Achatinidae* e estabelece a forma correta de abate e manipulação para a venda de caracóis para o consumo da carne como a seguir se descreve:

- Os caracóis devem ser abatidos num estabelecimento construído, organizado e equipado para o efeito. Os caracóis mortos por um processo diferente do abate no estabelecimento não devem ser preparados para consumo humano.
- Os caracóis devem ser sujeitos a um exame organolético efetuado por amostragem. Se esse exame indicar que podem apresentar um risco, não devem ser utilizados para consumo humano.
- Após o abate, os hepatopâncreas dos caracóis devem, se puderem representar um risco, ser removidos e não devem ser utilizados para consumo humano.

O Regulamento (CE) n.º 853/2004 não referencia outros produtos derivados do caracol para consumo alimentar como o “Caviar Pérola”. Contudo, o regulamento deverá ser cumprido para o produto em questão por se tratar de um produto de origem animal.

#### 3.4. Regulamento (CE) n.º 1441/2007

O Regulamento (CE) n.º 1441/2007, modifica o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. O Regulamento (CE) n.º 2073/2005 estabelece critérios microbiológicos para certos géneros alimentícios e as regras de execução a cumprir pelos operadores das empresas do sector alimentar quando aplicarem as medidas de higiene gerais e específicas referidas no artigo 4º (Âmbito de aplicação) do Regulamento (CE) n.º 852/2004. O Regulamento (CE) n.º 2073/2005 prevê ainda que os operadores das empresas do sector alimentar assegurem que os géneros alimentícios cumprem os critérios microbiológicos pertinentes estabelecidos no anexo I do referido regulamento.

O “Caviar Pérola” enquadra-se na categoria de Alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de *Listeria monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos.

Este regulamento ainda preconiza para esta categoria, a ausência do microrganismo *Listeria monocytogenes* em 25 g do alimento durante o período em que este permanece sob o controlo do operador responsável pela sua produção e que não

exceda o limite de 100 UFC/g de *Listeria monocytogenes* durante o seu período de vida útil.

### 3.5. Regulamento (UE) n.º 1169/2011

O presente regulamento estabelece os princípios, os requisitos e as responsabilidades gerais que regem a informação sobre os géneros alimentícios e, em particular, a rotulagem dos géneros alimentícios. Estabelece igualmente meios para garantir o direito dos consumidores à informação e procedimentos para a prestação de informações sobre os géneros alimentícios.

O Regulamento (UE) n.º 1169/2011 determina a obrigatoriedade na rotulagem da indicação da data de durabilidade mínima e define-a como “a data até à qual o género alimentício conserva as suas propriedades específicas nas condições de conservação adequadas”. Porém, nada refere relativamente à forma como são determinadas as referidas datas, subentendendo-se que a responsabilidade pela sua determinação é do produtor do alimento.

## 4. Alimento e Segurança Alimentar

Os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto a qualidade dos alimentos, e têm expectativas que essa qualidade seja mantida a um nível elevado durante o período entre a compra e o consumo. Essas expectativas são uma consequência não só da exigência que o alimento deve permanecer seguro, mas também da necessidade de minimizar as alterações indesejadas na qualidade sensorial (Kilcast & Subramaniam, 2000).

O Codex Alimentarius define vida útil de um alimento como “o período durante o qual um género alimentício mantém a segurança microbiológica, a uma temperatura de armazenamento especificada”. Num conceito mais amplo, a vida útil de um alimento é o tempo durante o qual um alimento é seguro, mantém as características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas e cumpre com qualquer alegação nutricional, que figure na respetiva rotulagem, quando armazenado nas condições recomendadas (Kilcast & Subramaniam, 2000).

O Regulamento (CE) n.º 1441/2005, define como período de vida útil o “período correspondente ao intervalo de tempo que precede a data limite de consumo dos

produtos, ou a data de durabilidade mínima, conforme definidas nos artigos 9º e 10º da Directiva 2000/13/CE”.

A vida útil dos géneros alimentícios será afetada pelo teor microbiano das matérias-primas/ingredientes, formulação do produto, estágios de processamento, embalagens, as temperaturas subsequentes empregadas durante o transporte, armazenamento, exposição de retalho, utilização e processamento doméstico (Food Safety Authority of Ireland, 2005).

Muitos fatores podem influenciar a vida útil, e podem ser classificados em fatores intrínsecos e extrínsecos. Fatores intrínsecos são as propriedades do produto final. Eles incluem a atividade de água ( $a_w$ ), valor de pH e a acidez total; potencial Redox (Eh); oxigénio disponível; composição nutricional, microbiota natural, composição bioquímica natural do produto (enzimas, reagentes químicos); uso de conservantes na formulação do produto (por exemplo, sal). Estes fatores são influenciados pelo tipo e qualidade de matéria-prima, a formulação e a estrutura do produto final (Kilcast & Subramaniam, 2000; Food Safety Authority of Ireland, 2005)

Os fatores extrínsecos são os que interferem com as características do produto final. São eles a relação entre tempo e temperatura durante o processamento; controlo da temperatura durante o armazenamento e distribuição; humidade relativa do ar durante o processamento, armazenamento e distribuição; exposição à luz (UV e IR) durante o processamento, armazenamento e distribuição; contagens microbianas ambientais durante o processamento, armazenamento e distribuição; composição da atmosfera dentro da embalagem; tratamento térmico posterior (por exemplo, confeção antes do consumo); manipulação pelo consumidor. Todos esses fatores podem agir de forma interativa e muitas vezes imprevisível, e a possibilidade de interações deve ser investigada (Kilcast & Subramaniam, 2000; Food Safety Authority of Ireland, 2005; Valero, Carrasco & García-Gimeno, 2012).

Um tipo particularmente útil de interação ocorre quando os fatores atuam em conjunto para restringir o crescimento da população microbiana, o chamado "efeito de barreira". Os fatores, individualmente, não são capazes de impedir o desenvolvimento microbiano, mas, em conjunto, proporcionam uma série de obstáculos, permitindo o uso de técnicas de processamento mais suaves, melhorando as propriedades sensoriais e nutricional do produto (Kilcast & Subramaniam, 2000).

A definição de vida útil está relacionada com o posicionamento do produto no mercado em termos de qualidade, exceto nos casos em que a segurança é um problema microbiológico. Portanto, é de grande importância para o operador analisar o comportamento do produto no armazenamento, assim como ter um conhecimento aprofundado do processo de deterioração (Kilcast & Subramaniam, 2000).

#### 4.1. Deterioração de origem físico-química

Deterioração química expressa-se principalmente pelas mudanças de sabor e cor desencadeadas durante o armazenamento dos alimentos. Estas alterações sensoriais podem ser induzidas pela luz, íons metálicos, ou o calor excessivo durante o processamento ou armazenamento. Processos químicos podem também trazer alterações físicas, tais como o aumento da viscosidade, a gelificação, a sedimentação ou mudança de cor (Valero, Carrasco & García-Gimeno, 2012).

#### 4.2. Deterioração de origem microbiana

A degradação dos alimentos ocorre naturalmente por ação de microrganismos que usam os alimentos como fonte de nutrientes, tornando os produtos impróprios para o consumo. No entanto, quando a degradação ainda não é perceptível, podem existir microrganismos específicos, contaminantes do alimento, cujo consumo acarretaria risco para o consumidor e, em situações extremas, poderia causar doenças e até a morte. Estes tipos de microrganismos são designados por patogênicos (Batista & Venâncio, 2003).

Assim, deve-se avaliar o potencial desenvolvimento microbiano nas matérias-primas e no produto final, com particular atenção às espécies patogênicas, devendo o processamento ser definido por forma a garantir a segurança durante o prazo de vida útil do produto (Batista & Venâncio, 2003).

Para o produto alimentar ser microbiologicamente seguro e comercialmente viável, o operador deve produzir um alimento que possua uma proteção antimicrobiana consistentemente, reprodutível e aceitável (Food Safety Authority of Ireland, 2005).

As várias formas de alteração microbiana podem ser evitadas com recurso a técnicas de conservação que impeçam ou inibam o crescimento microbiano, tais

como uso do calor, uso do frio, controlo da humidade, adição de solutos, fermentação, cura, aditivos alimentares, irradiação (Camargo,2006).

#### 4.3. Aditivos e Sorbato de Potássio

Os aditivos alimentares são substâncias adicionadas intencionalmente aos alimentos para executar determinadas funções tecnológicas, como por exemplo colorir, adoçar ou ajudar a conservar os alimentos. Na União Europeia (UE) todos os aditivos alimentares são identificados por um número precedido pela letra E. Os aditivos alimentares são sempre incluídos nas listas de ingredientes dos alimentos em que são usados (EFSA,2013).

Os rótulos dos produtos devem identificar a função do aditivo no alimento acabado (por exemplo, corante, conservante) e a substância específica utilizada, quer referindo-se o número E adequado ou o seu nome (por exemplo, E330, ou ácido cítrico). Os aditivos mais vulgarmente usados nos alimentos são os antioxidantes (visam inibir a oxidação dos alimentos), corantes, emulsionantes, estabilizadores, gelificantes e espessantes, conservantes e adoçantes (EFSA,2013).

Os aditivos alimentares não têm como propósito fornecer nutrientes, devem ser inócuos para o homem, e são utilizadas com o objetivo de contribuir para a melhoria geral do alimento transformado. A sua utilização é realizada com o objetivo de modificar e melhorar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais durante o fabrico, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenamento, transporte ou manipulação de um alimento (Carvalho,2005).

O Regulamento (CE) n.º 1333/2008 descreve aditivo alimentar como:

Qualquer substância não consumida habitualmente como género alimentício em si mesma e habitualmente não utilizada como ingrediente característico dos géneros alimentícios, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos géneros alimentícios, com um objetivo tecnológico na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios.

Como parte das avaliações da segurança dos aditivos alimentares, a EFSA estabelece quando possível (ou seja, quando estiver disponível informação suficiente), uma dose diária aceitável - ADI (Acceptable Daily Intake) para cada substância. A ADI é a quantidade máxima de uma substância que as pessoas podem consumir numa base diária durante toda a sua vida, sem qualquer risco significativo para a saúde (EFSA, 2013).

ADIs são geralmente expressas em miligramas por quilo de peso corporal por dia (mg / kg de peso corporal / dia). A ADI pode ser aplicada a um aditivo específico ou um grupo de aditivos com propriedades semelhantes. Ao reavaliar os aditivos previamente autorizados e após analisar todas as evidências disponíveis, a EFSA pode manter ou alterar o ADI desse aditivo (EFSA, 2013).

Dentre as categorias de aditivos utilizados na produção de alimentos estão os conservantes. Entende-se por conservantes as substâncias que prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos e/ou contra o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Regulamento (CE) n.º 1333/2008).

O ácido sórbico (E200) é um ácido gordo insaturado (ácido hexa-2,4-dienóico), presente em alguns vegetais, sendo fabricado para ser usado como aditivo alimentar através de uma síntese química. Como conservante alimentar são amplamente usados sais de cálcio, de potássio e de sódio sob a designação de sorbatos. Não apresentam qualquer sinal de toxicidade aguda, subaguda ou crónica uma vez que o organismo humano metaboliza o ácido sórbico de forma idêntica aos ácidos gordos insaturados ( $\beta$ -oxidação) (FDA,1975).

No setor dos alimentos processados, os produtos que incorporam sorbatos na formulação são os cremes e margarinas, molhos, maioneses, queijos, produtos de pesca, vinhos, revestimento de produtos cárneos, conservas e verduras ácidas, produtos derivados de frutos, produtos de panificação e confeitaria (Food Ingredients Brasil, 2012).

Como conservantes, os sorbatos agem na inibição de um largo espectro de microrganismos, pouco interferindo no sabor do alimento. Outra vantagem no seu uso é a seletividade da ação antimicrobiana exercida pelos sorbatos. Baixas concentrações de sorbatos (0,3% ou menos) são suficientes para inibir o

desenvolvimento de uma grande variedade de leveduras e bolores, contudo, possui uma ação baixa sobre as bactérias (Food Ingredients Brasil, 2011).

O sorbato de potássio (E202) é solúvel em água e é comercializado na forma refinada, em pó ou granulado e apresenta coloração branca. Doses entre 0,05% e 0,3% são eficazes nos alimentos, embora se possa utilizar uma concentração maior nos alimentos com elevado teor de humidade ou com um elevado teor microbiano. Pode ser diretamente incorporado nos produtos ou através do tratamento das superfícies, por pulverização ou imersão, polvilhamento ou incorporação na embalagem (Food Ingredients Brasil, 2012).

A eficiência antimicrobiana dos sorbatos é reconhecida há mais de 70 anos. A sua eficácia melhora com o aumento da acidez pelo que, para pH superior a 4,0 e inferior a 6,0, os sorbatos apresentam a maior eficiência. Contudo, eles funcionam até pH 6,5, mas são relativamente ineficientes em pH superior a 7,0 (Food Ingredients Brasil, 2011; 2012).

O Regulamento (UE) n.º 1129/2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 relativo aos aditivos alimentares determina que o teor máximo de utilização para o sorbato de potássio poderá variar de acordo com o produto de cuja formulação faz parte. A variação pode chegar a 20 mg/kg para frutos e produtos hortícolas (unicamente no tratamento da superfície de citrinos frescos não descascados), a *quantum satis* para os queijos curados (unicamente para tratamento da superfície de produtos curados).

Pode ser utilizado numa grande variedade de produtos incluindo salmouras diversas, semiconservas à base de peixe, incluindo produtos à base de ovas, na dosagem que pode chegar a 2 g/kg do produto nestes alimentos. Para os ovos e ovoprodutos o regulamento preconiza a utilização de até 5 g/kg de sorbatos unicamente em ovos líquidos (claras, gemas ou ovo total) (Regulamento (UE) n.º 1129/2011).

### III. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a estabilidade do produto, efetuaram-se diversas análises laboratoriais: microbiológica, físicas e químicas. Para esse fim, aplicou-se diversas metodologias que a seguir são descritas.

#### 1. Amostragem

Os ovos de *Helix aspersa maxima*, foram fornecidos por uma helicultura em 2 datas diferentes e identificados como Lote 1 e Lote 2. Os ovos foram recolhidos pelo proprietário e mantidos sob refrigeração até à entrega no laboratório no dia seguinte à recolha.

##### 1.1. Processamento da amostra

Na ausência de informação técnico-científica sobre o modo de fabrico do “Caviar Pérola” desenvolveu-se um protocolo próprio. Para a determinação dos ingredientes, utilizou-se como base informações contidas nos produtos já comercializados em outros países. As quantidades usadas de cada matéria-prima foram determinadas empiricamente.

A principal exigência do produtor assenta na necessidade de estabilizar o produto por um mínimo de 3 meses sem o recurso a tratamento térmico, uma vez que a pasteurização do “Caviar Pérola” resulta na perda de desejáveis características sensoriais. Assim recorreu-se à utilização de sorbato de potássio como agente de conservação.

O processo iniciou-se lavando sucessivas vezes as amostras com o objetivo de eliminar os resíduos sólidos (pedras, areias, terra etc.), ou seja, os ovos foram submetidos a lavagem prévia em água corrente, sendo realizadas posteriormente duas lavagens com água destilada e uma lavagem em água destilada esterilizada (Figura 7).

Após a lavagem, os ovos foram pesados e divididos em duas porções, uma destinada a determinação da composição centesimal, e a outra foi repartida em partes iguais, imerso nas soluções a serem testadas.

Figura 7 – Preparação da amostra.



### 1.2. Teste de conservação do produto

O aditivo escolhido para o processo foi o sorbato de potássio ( $C_6H_7KO_2$ ) (Merck,5118). Obtiveram-se duas soluções uma solução de NaCl a 5% (Merck, 6400.1000) em água destilada (solução controlo) e uma solução de NaCl a 5% adicionada de 0,2% de sorbato de potássio (solução teste). Ambas soluções foram esterilizadas em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Os ovos foram imersos nas soluções, onde permaneceram por 7 dias mantidos sob refrigeração (3 a 6 °C) em câmara frigorífica (Dagard Ibérica). Após este período, foram retirados da solução e colocados em frascos de vidro com tampa (Figura 8), esterilizados. Cada frasco continha 10 g da amostra. Todo procedimento foi realizado em laboratório, de modo asséptico e rápido, a fim de manter a amostra o mínimo de tempo possível à temperatura ambiente.

Figura 8 – Acondicionamento do “Caviar Pérola” em frascos com tampa, esterilizados, antes e após a retirada da solução controle.



Os frascos contendo as amostras foram colocados sob refrigeração (3 a 6 °C) até à realização das análises e a temperatura foi monitorizada através da leitura da temperatura do visor da câmara frigorífica, diariamente, no período da manhã. Cada frasco foi identificado com a solução usada, data da análise e o lote a que pertencia.

A tabela 1 mostra as datas do início das análises para cada característica do produto avaliada no estudo.

Tabela 1 – Delineamento experimental.

Data de recepção da amostra	Data de preparação do lote	Data de início da análise de composição centesimal	Data de Início das análises microbiológicas	Data das medições dos parâmetros de cor
13-Mar	Lote 1: 20-Mar	13-Mar	20-Mar	
			03-Abr	
			17-Abr	
			01-Mai	
			15-Mai	
			29-Mai	
			12-Jun	
23-Abr	Lote 2: 30-Abr	23-Abr	30-Abr	30-Abr
			14-Mai	14-Mai
			28-Mai	28-Mai
			11-Jun	11-Jun
			25-Jun	25-Jun
			09-Jul	09-Jul
			23-Jul	23-Jul

Os dois Lotes foram analisados periodicamente em intervalos de 15 dias por um período de três meses. O objetivo era avaliar as eventuais alterações ocorridas no prazo descrito como o período de vida útil para o “Caviar Pérola” atualmente comercializado (três meses). As análises interrompidas quando o produto não apresentava características satisfatórias, como a alteração de cor, aumento do teor microbiano, perda da consistência e formato original.

## 2. Análises físico-químicas

Para as análises da composição centesimal, foram utilizadas as técnicas descritas no “Official Methods Analysis” da Association of Analytical Communities (A.O.A.C.) (2000). Os ovos foram homogeneizados em aparelho homogenizador (Stomacher Lab-Blender 400).

### 2.1. Composição centesimal

#### 2.1.1. Humidade

Para a determinação da humidade, foi colocada 5g da amostra numa cápsula com areia e uma vareta de vidro previamente seca e anotado a tara. Misturou-se a amostra com a areia utilizando a vareta de vidro. Colocou-se a cápsula na estufa (Memmet U60) à temperatura de  $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.

A cápsula foi sempre manipulada com uma pinça sendo retirada da estufa e colocada num exsiccador para arrefecer. Pesou-se a cápsula em períodos de uma hora até que toda a água tenha sido evaporada, isto é, até peso constante.

Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{(m_2 - m_0)}{m_1 - m_0} \times 100$$

Em que:

$m_0$  é a massa da cápsula com areia e vareta, expressa em g;

$m_1$  é a massa da cápsula com areia, vareta e amostra antes da secagem, expressa em g;

$m_2$  é a massa da cápsula com areia, vareta e amostra depois da secagem, expressa em g.

#### 2.1.2. Cinzas

Para calcular a percentagem de cinzas nas amostras, pesou-se 2g da amostra num cadinho de porcelana, o qual foi previamente incinerado, arrefecido e anotado a tara. O conjunto (cadinho e amostra) foi incinerado num bico de gás, e depois colocado na mufla (Hobersal, 1320) a  $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$  durante 6 horas. O conjunto foi retirado da mufla, colocado num exsiccador para arrefecer e pesado quanto se apresentava a

temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado a cada período de uma hora até peso constante.

Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{(m_2 - m_0)}{m_1 - m_0} \times 100$$

Em que:

$m_0$  é a massa do cadinho vazio;

$m_1$  é a massa do cadinho com a amostra, expresso em g;

$m_2$  é a massa do cadinho com a cinza, expresso em g.

### 2.1.3. Proteína

Para determinar a quantidade de proteína, foi usado o método de Kjeldahl. Iniciou-se com a pesagem de 2g da amostra com auxílio de um recipiente livre de azoto (Macherey-Nagel, 48600). Colocou-se num tubo de Kjeldahl juntamente com um catalisador (Panreac, 174428.1246). Adicionou-se 25 ml de ácido sulfúrico a 95% ( $H_2SO_4$ ) (J.T.Baker, 6057) e levou-se ao digestor de Kjeldahl (Velp Scientifica DK6) onde a amostra foi aquecida em uma escala de tempo até a temperatura de 400 °C para a completa digestão dos componentes da amostra.

A amostra digerida foi então colocada no destilador de Kjeldahl com hidróxido de sódio a 50% (NaOH) (Scharlau, SO04261000) e aqueceu-se para a libertação da amónia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido bórico a 4% (Scharlau, AC05781000), formando borato de amónia. O borato de amónia formado foi titulado com uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol/l (HCl) (Scharlau, AC07671000) padronizado.

Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula:

$$f \times (V_2 - V_1) \times \frac{100}{m}$$

Onde:

$V_1$  é o volume de solução de ácido clorídrico 0,1 M utilizado no ensaio branco;

$V_2$  é o volume de solução de ácido clorídrico 0,1 M utilizado na determinação;

$m$  é a massa da amostra, expressa em gramas;

$f$  é o fator de correção para o ácido clorídrico 0,1M.

Este resultado, multiplicado pelo fator de conversão, indica a quantidade de proteína da amostra. Neste caso o fator de conversão usado foi 6,68 (fator de conversão para os ovos).

#### 2.1.4. Lípidos

Para a determinação dos lípidos, pesou-se 2 g da amostra, colocada em um funil de separação e homogeneizada com 8 ml de água destilada. Adicionou-se 1 ml de hidróxido de amônio a 25% (NH<sub>4</sub>OH) (Merck 1054321000) e homogeneizou-se. Adicionou-se 10 ml de álcool a 96% e homogeneizou-se. Adicionou-se 25 ml de éter (Merck 100.921) e agitou-se por 1 minuto. Adicionou-se 25 ml de éter de petróleo (V. Reis) e homogeneizou-se por 30 segundos.

Este material permaneceu em repouso por um período de 30 minutos para ocorrer a decantação da proteína e outros resíduos. Transferiu-se a fase superior (fração lipídica) para um balão de fundo chato o qual foi previamente aquecido em estufa, arrefecido e anotado a tara (Merck, 6400.1000). Para remover os lípidos existentes na fase inferior (fração proteica) repetiu-se o procedimento a partir da adição do éter e transferiu-se a fase superior para o balão de fundo chato após decantação.

O balão de fundo chato contendo a fração lipídica foi então colocado em rotavapor (Buchi 461) e em seguida colocado em estufa a 103 °C ± 2 por uma hora para eliminar os solventes.

O balão foi retirado da estufa, colocado num exsiccador para arrefecer e pesado quando atingiu a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado a cada período de uma hora até peso constante. A base de cálculo para a quantidade de gordura presente na amostra é a diferença entre o peso final e inicial do balão de fundo chato.

#### 2.1.5. Hidratos de carbono

A determinação da percentagem de hidratos de carbono da amostra foi realizada de forma indireta ou seja, baseou-se na diferença entre a percentagem total (100%) e a percentagem de humidade, proteína, gordura e cinzas somadas.

## 2.2. Determinação do potencial hidrogeniônico das soluções

Após a homogeneização da solução, introduziu-se a mesma num copo plástico de forma a possibilitar a imersão do eléctrodo do potenciómetro (Hanna Instruments, HI 9025).

Foram efetuadas três medições por solução. Em cada medição aguardou-se até à obtenção de um valor constante.

## 2.3. Medição da Cor

Para a Medição Colorimétrica, a amostra foi colocada, de modo asséptico, em sacos transparentes esterilizados, fechados logo em seguida. A caracterização da cor foi realizada por meio do sistema CIE  $L^*a^*b^*$  utilizando um colorímetro Minolta CR-300. O sistema CIE  $L^*a^*b^*$  foi desenvolvido pela Comissão Internationale de l'Éclairage. Tem como princípio posicionar a cor no espaço. O espaço é determinado por uma combinação de coordenadas cilíndricas e cartesianas onde um ponto está associado a uma única cor. São definidas três coordenadas que expressam a cor:  $L^*$ , referente a luminosidade, varia entre o 0 (para o preto) e 100 (para o branco);  $a^*$  indica o tom compreendido entre o vermelho-púrpura (+60) e o verde-azulado (-60); e  $b^*$  indica o tom entre o azul (- 60) e amarelo (+60). O cinzento (acromático) apresenta as coordenadas  $a^*=0$  e  $b^*=0$  (Pacheco Ribeiro, Farinha, Santos & Neves, 2007).

A placa de cerâmica usada para calibração do colorímetro foi posicionada dentro de um saco transparente similar ao utilizado para armazenamento da amostra no momento da calibração. Para cada amostra foram tomadas 3 medidas. Os parâmetros colorimétricos determinados foram: luminosidade ( $L^*$ ), coordenada  $a^*$  (coordenada vermelho-verde), coordenada  $b^*$  (coordenada azul-amarelo). As análises foram realizadas momentos antes da realização das análises microbiológicas.

### 3. Análises microbiológicas

#### 3.1. Preparação da amostra

As amostras foram retiradas da câmara frigorífica e, seguindo as regras de assepsia, foram vertidas em saco estéril, diretamente do frasco sem utilização de utensílios. Cada frasco continha 10 g da amostra. Adicionou-se o volume de 90 ml de água peptonada tamponada (APT) (Biokar Diagnostics, BK018HA) e procedeu-se à homogeneização durante 1 minuto num homogeneizador obtendo assim a suspensão inicial.

#### 3.2. Preparação das suspensões

As suspensões foram obtidas por mistura de 1 ml da suspensão inicial e das diluições subsequentes em nove vezes o seu volume em diluente, repetindo esta operação para cada diluição até se conseguir a diluição decimal considerada adequada.

#### 3.3. Contagem de microrganismos a 30°C

Retirou-se 1 ml de inóculo das diferentes diluições, semeou-se por incorporação, em meio de cultura Plate Count Agar (PCA) (OXOID,CM325), tendo-se efetuado a contagem de colónias após incubação durante 72 h a 30°C, em aerobiose, tal como é preconizado na ISO 4833:2003. O resultado expressou-se em UFC/g.

#### 3.4. Contagem de bolores e leveduras a 25 °C

Como referência para a contagem de bolores e leveduras a 25 °C utilizou-se a Norma Portuguesa NP 3277-1 (1987).

Da suspensão inicial ( $10^{-1}$ ) foram retiradas e semeadas alíquotas de 0,2 ml em 5 placas de Petri em gelose Cooke Rose Bengal Agar (CRBA) (Difco, 0703-17-1). As placas foram incubadas durante 5 dias a 25 °C, sendo posteriormente contadas as colónias existentes nas 5 placas. O resultado expressa-se em UFC/g.

### 3.5. Contagem de *Escherichia coli*

Para a contagem de *E. coli* realizou-se as análises de acordo com o protocolo interno do Laboratório onde inoculou-se volumes de 1 ml das diluições adequadas numa série de 3 tubos para cada diluição contendo caldo verde brilhante lactose bile 2% (CVBLB) (Oxoid, CM0031). Incubou-se os tubos a 37 °C por 48 h. A suspeita de coliformes totais é indicada pela formação de gás nos tubos de Durham ou efervescência quando agitado gentilmente.

Repicou-se cada tubo positivo de CVBLB para outro tubo contendo CVBLB. Incubou-se os tubos a 44°C por 48 h. A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás ou efervescência quando agitado gentilmente.

De cada tubo positivo ao CVBLB, realizou-se a prova do Indol através da inoculação em água peptonada (Biokar diagnostics, BK084) e incubação a 44 °C por 48 h. Após este período adicionou-se 0,5 ml do reagente de indol (Biomerieux, 20100). São considerados positivos para *E.coli*, os tubos que apresentem a coloração vermelha na prova do indol.

### 3.6. Pesquisa de *Salmonella spp.*

A pesquisa de *Salmonella spp.* foi realizada de acordo com o protocolo interno do Laboratório a partir de 10g de amostra. Efetuou-se um pré-enriquecimento com APT durante 18 h a 37 °C. Procedeu-se um enriquecimento, inoculando em caldo Rappaport Vassiliadis modificado (MRVS) (Oxoid, CM 669) em tubo em “U”, 1 ml do pré-enriquecimento em um dos lados do tubo. Estes foram incubados durante 24 h, a 37 °C.

Retirou-se uma alíquota, do lado oposto à inoculação, do meio MRVS. Realizou-se uma sementeira por espalhamento à superfície em gelose Hektoen Enteric Agar (Biokar diagnostics, BK067HA), que se incubou a 37 °C durante 24 h. Da placa de isolamento colheu-se, aleatoriamente, colônias com morfologia elíptica, ou seja, lactose positiva e opacas mas de diâmetros variáveis. Em seguida, as colônias suspeitas de *Salmonella spp.* foram repicadas por picado central e esgotamento a superfície em gelose Triple Sugar Iron agar (TSI) (Oxoid, CM277) em tubo. Incubou-se a 37 °C, durante 24h. Findo o período de incubação, dos tubos cujo resultado foi suspeito ou positivo para a presença de *Salmonella spp.*, foram então isoladas em gelose Trypticase Soy agar (TSA) (Biokar diagnostics, BK047HA) e incubadas a 37

°C, durante 24h, sendo depois classificadas de acordo com os resultados das reações bioquímicas dos testes miniaturizados API20E (Biomérieux 20100).

### 3.7. Pesquisa de *Listeria spp.*

Para a pesquisa de *Listeria spp.*, utilizou-se como referência a Norma ISO 11290-1:1996. Foram utilizadas 10 g de amostra, pesadas assepticamente. O isolamento foi realizado a partir dos meios de enriquecimento mediante sementeira por estria à superfície do meio de cultura PALCAM (Oxoid, CM877), seguido de incubação a 37 °C durante 24 h.

Para confirmação das colónias suspeitas para *L. monocytogenes* efetuou-se a repicagem para meio TSA seguida de incubação a 37 °C durante 24 h, tendo-se realizado os testes da catalase e da oxidase às colónias que apresentaram luminescência azul. Para identificação e confirmação das colónias suspeitas utilizaram-se os testes bioquímicos miniaturizados da galeria bioquímica APIListeria (Biomérieux, 10300).

### 3.8. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo

Para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* foram efetuadas de acordo com o protocolo interno do Laboratório. As placas com meio de cultura Baird-Parker (Oxoid, CM0275) foram semeadas com as diluições adequadas, incubando-se a 37 °C durante 24 h. As colónias suspeitas (negras, com halo transparente) foram repicadas para caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, CM225) incubando-se novamente a 37 °C durante 24 h, efetuando-se posteriormente a prova da coagulase com plasma de coelho liofilizado para os tubos positivos.

### 3.9. Pesquisa de *Clostridium perfringens*

Para a pesquisa de *Clostridium perfringens*, foram colocados em tubos, 1 ml das diluições adequadas e posteriormente adicionado o meio sulfite-polymyxin-sulfadiazine agar (SPS) (Difco, 0845-17-0) e incubado a 44 °C por 24h. Os resultados positivos são verificados pela presença de colónias negras.

Os meios de cultura utilizados para pesquisa ou contagem de *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium* e *E. coli* foram testados com controlos

testemunha positivos. Também foram utilizados controlos positivos, inoculando uma amostra de “Caviar Pérola” com estipes de referência e aplicando os procedimentos de análise anteriormente descritos.

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 1. Análises físico-químicas

##### 1.1. Composição centesimal

Os resultados obtidos na determinação da composição centesimal dos ovos de *Helix aspersa máxima* encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Composição centesimal das amostras dos ovos de *Helix aspersa máxima* e valor energético.

	Lote 1	Lote 2	Média	Desvio padrão
Valor energético (KJ)	182,96	172,5	<b>177,7</b>	± 5,2
Humidade (%)	85	84,0	<b>84,5</b>	± 0,5
Hidratos de carbono (%)	6,5	7,0	<b>6,7</b>	± 0,2
Proteína (%)	4,2	3,1	<b>3,7</b>	± 0,5
Lípidos (%)	0,1	0,1	<b>0,1</b>	± 0,0
Cinzas (%)	4,2	5,8	<b>5,0</b>	± 0,8

Os resultados da composição centesimal permitiram observar que os ovos de *Helix aspersa máxima* são predominantemente compostos por água (84,5%). Os outros componentes nutricionais estão presentes na seguinte percentagem média: hidratos de carbono (6,7%), cinzas (5,0%), proteínas (3,7%) e lípidos (0,1%).

Os ovos de *Helix aspersa máxima* mostram-se muito diferentes na composição centesimal quando comparado com outros ovos de consumo, como ovo de galinha, codorniz ou pata que apresentam teores de 72 a 76% de humidade, 12% de proteína e 9 a 11% em lípidos (Torres et al., 2000).

Quando comparado com o caviar ou outros “substitutos do caviar”, o “Caviar Pérola” produzido para este estudo, revelou diferenças consideráveis. No que diz respeito ao caviar, a composição nutricional varia entre 57-77% em humidade, 17-32% em proteína, 11-18% em lípidos, 1-2% em cinzas. Para os outros substitutos do caviar à base de ovas de peixe, relatam-se valores entre 50 a 85% para humidade, 11,5 a

38% para proteína, 0,3 a 20% para os lípidos e 0,7 a 2,3% para cinzas (Bledsoe, Bledsoe & Rasco 2003).

As ovas de atum (*Katsuwonus pelamis*) apresentam em sua composição centesimal 72,17-73,03% de humidade, 18,16-20,15% de proteína, 3,29-5,68% de lípidos e 1,79-2,10% de cinzas (Intarasirisawat, Benjakul, Visessanguan, 2011).

A composição centesimal do substituto do caviar produzido com ovas de tainha (*Mugil platanus*) apresentou 56, 51% de humidade, 3,34% de hidratos de carbono, 1,85% de cinzas, 25,26% de proteínas 13,04% de lípidos. O baixo teor de humidade está relacionado com o modo de preparação do produto (secagem previa) (Ferreira, 2006).

Por seu lado, quando se compara a composição dos ovos com a carne da espécie originária, *Helix aspersa maxima*, verifica-se resultados semelhantes. Os valores observados são compatíveis aos encontrados para composição da carne de *Helix aspersa* como descreveram Çagiltay, Erkan, Tosun & Selçuk (2011) onde descreveram percentagem para proteína, lípidos, cinzas, água e hidratos de carbono de 9,87%; 0,58%; 1,07%; 82,50% e 5,99%, respetivamente.

Foram realizados alguns testes para avaliar a degradação lipídica e proteica do “Caviar Pérola”. Para o efeito, usamos a determinação do Ácido Tiobarbitúrico (TBA) e do Azoto Básico Volátil Total (ABVT). Contudo, o limite de deteção das técnicas não permitiu quantificar a ocorrência de oxidação, devido aos baixos teores de gordura e proteína presentes no produto avaliado.

## 1.2. Determinação do potencial hidrogeniónico (pH) das soluções teste e controlo

O pH da solução teste, o qual continha sorbato de potássio, apresentou um valor pH de 8,40 e o grupo controlo revelou um resultado semelhante, apresentando pH de 8,48. Ambos os resultados revelam o carácter básico das soluções. O elevado pH conjugado com o elevado teor de humidade (84,5%) dos ovos, permite o desenvolvimento de eventuais contaminações microbianas neste produto. O uso do sorbato de potássio nesta solução torna-se irrelevante pois o sorbato de potássio é ativo em meios ácidos. A eficácia como conservante é relatada para produtos com pH inferiores a 7,0. O que vem a ser revelado no resultado da análise microbiológica.

### 1.3. Análise da cor

Apenas uma amostra foi possível analisar, já que impossibilitou a sua realização a avaria do colorímetro no período das análises do Lote 1. O resultado é expresso no sistema CIE L\*a\*b\* (1976) cujas coordenadas são as mais utilizadas para avaliação da cor em alimentos. O colorímetro realiza as leituras através de reflectância e dá valores para os parâmetros: “L\*” (luminosidade), “a\*” (intensidade de vermelhos) e “b\*” (intensidade de amarelos), também designadas por coordenadas de cromaticidade.

As determinações das leituras de cor com base no sistema CIE L\*a\*b\* (1976) estão expressas na tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros de cor (L\*, a\*, b\*) para amostra de “Caviar Pérola”.

		Dia 1	Dia 15	Dia 30
L*	Teste	64,28	56,02	55,55
	Controlo	62,96	59,16	55,29
a*	Teste	1,39	6,91	9,84
	Controlo	0,96	3,95	8,88
b*	Teste	8,99	8,38	6,45
	Controlo	8,29	9,22	5,33

A avaliação temporal das coordenadas revelou um decréscimo no valor de L\*, significando perda de luminosidade (escurecimento) tanto no grupo teste, como no grupo controlo. O parâmetro a\* aumentou, sugerindo apresentação de um produto com tons mais rosados ou avermelhados. Para a coordenada b\* houve decréscimo, sugerindo tendência para tons menos amarelados.

A figura 9 apresenta a cor captada através do colorímetro. As cores foram obtidas através de um programa informático (<http://www.easyrgb.com/index.php?X=CALC#Result>) que transforma as coordenadas do sistema CIE L\*a\*b\* em padrões de cor. Os dados corroboram com as observações visuais, uma vez que todas as amostras apresentaram variação de cor ao longo do tempo (Figura 10).

Figura 9 – Padrões de cor desenvolvidos a partir das coordenadas CIE L\*a\*b\* obtidas através da análise da cor do “Caviar Pérola” ao longo do tempo.

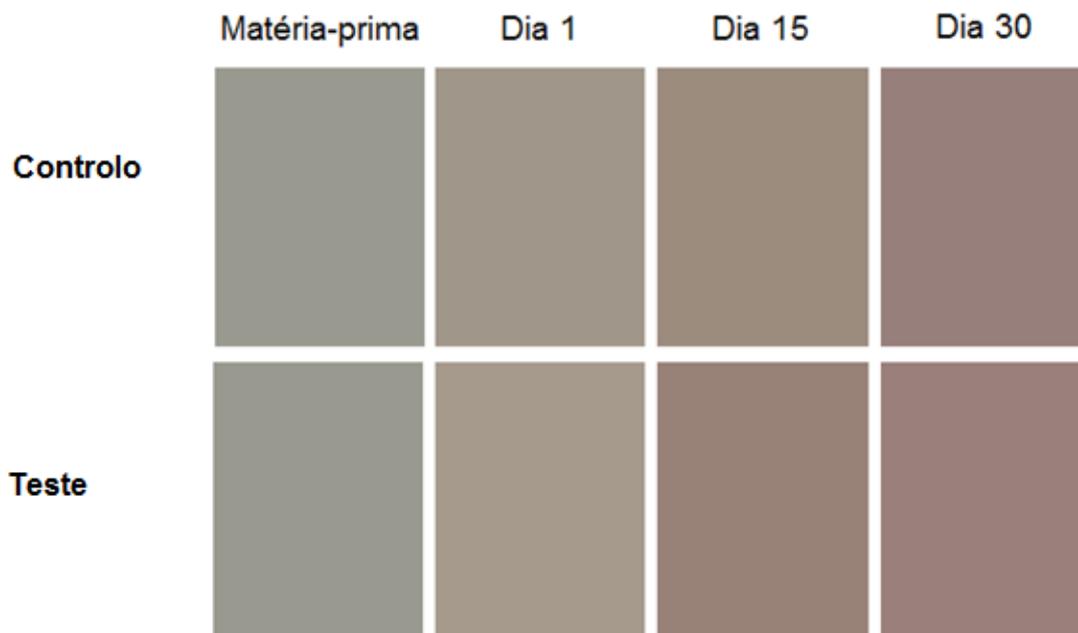


Figura 10 – Variação do aspeto dos ovos ao longo do tempo.

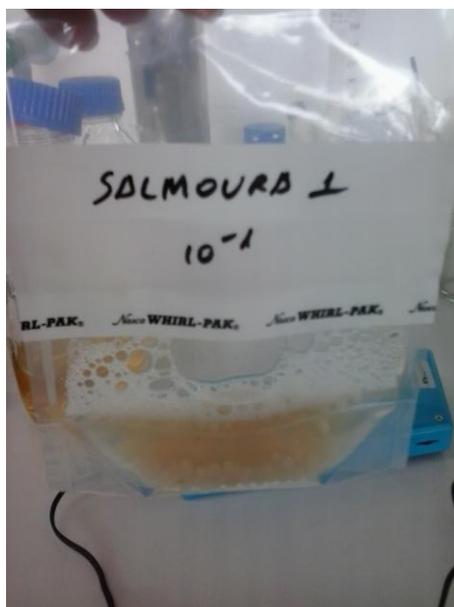


O grupo teste e o grupo controlo do Lote 2 comportaram-se de forma semelhante no que se refere à variação dos valores das coordenadas (decréscimo no valor de L\*, aumento no valor de a\*, decréscimo no valor b\*).

A alteração da cor foi a característica mais marcante para a alteração do produto ao longo do tempo, nas condições deste estudo. É provável que as alterações progressivas da cor decorram de um processo oxidativo. Esta hipótese é corroborada pelo fato de, durante a preparação das amostras para as análises

laboratoriais, com forte agitação e rutura da membrana superficial do ovo surgir uma rápida modificação da cor, com o aparecimento de tons rosados ou avermelhados (Figura 11).

Figura 11 – Grupo controlo após homogeneização em homogeneizador Stomacher.



No que respeita aos alimentos, a cor é uma das características sensoriais mais importantes para a aceitabilidade do consumidor (Lopes, Xavier, Quadri & Quadri, 2007). O impacto visual gerado pela cor sobrepõe-se, frequentemente, ao causado por outros atributos (Tocchini & Mercadante, 2001). A cor dos alimentos sobrepõe-se sobre outras características sensoriais quanto à determinação de preferências de sabor do consumidor. Afeta a capacidade do consumidor de identificar e correlacionar os sabores de forma a distinguir preferências ou perfis de sabor (Garber Jr., Hyatt & Starr Jr., 2000)

Por ser um produto alimentar recente e não existir informação técnico-científica referente à segurança alimentar e aos riscos para a saúde humana e não existir bibliografia suficiente a respeito do produto “Caviar Pérola”, nomeadamente sobre as características sensoriais do produto, não foram realizadas outras provas sensoriais.

## 2. Análises microbiológicas

### 2.1. Contagem de microrganismos a 30°C

Os resultados relativos à evolução das contagens dos microrganismos totais a 30°C estão representados tabela 4 e nos gráficos 1 e 2.

Tabela 4 - Contagens dos microrganismos totais a 30°C (log UFC/g).

		Log 10		
		Dia 1	Dia 15	Dia 30
Lote 1	Teste	4,18	6,11	8,18
	Controlo	4,87	5,99	6,18
Lote 2	Teste	4,17	4,63	5,98
	Controlo	4,86	5,57	4,89

Gráfico 1 – Lote 1: Evolução das contagens dos microrganismos totais a 30°C (log UFC/g).

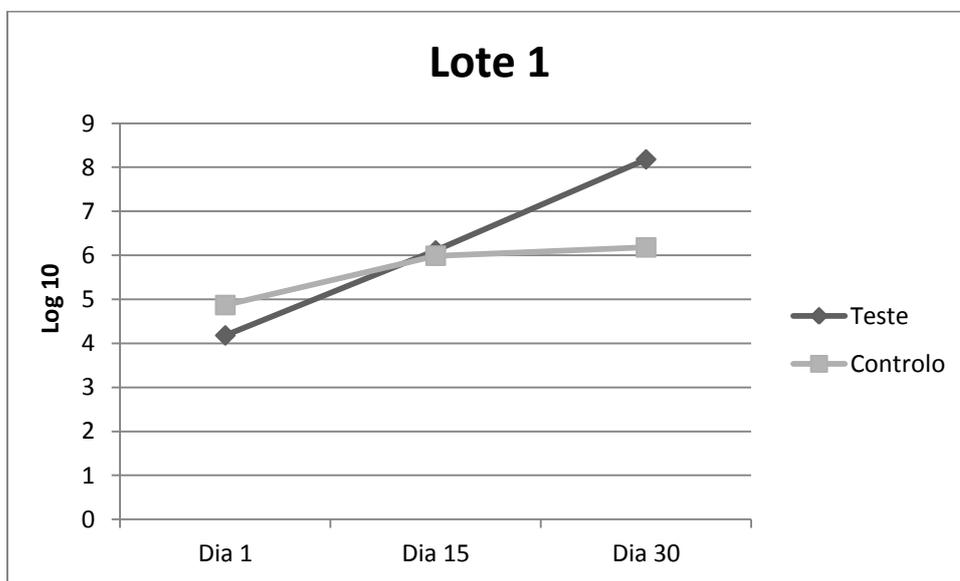
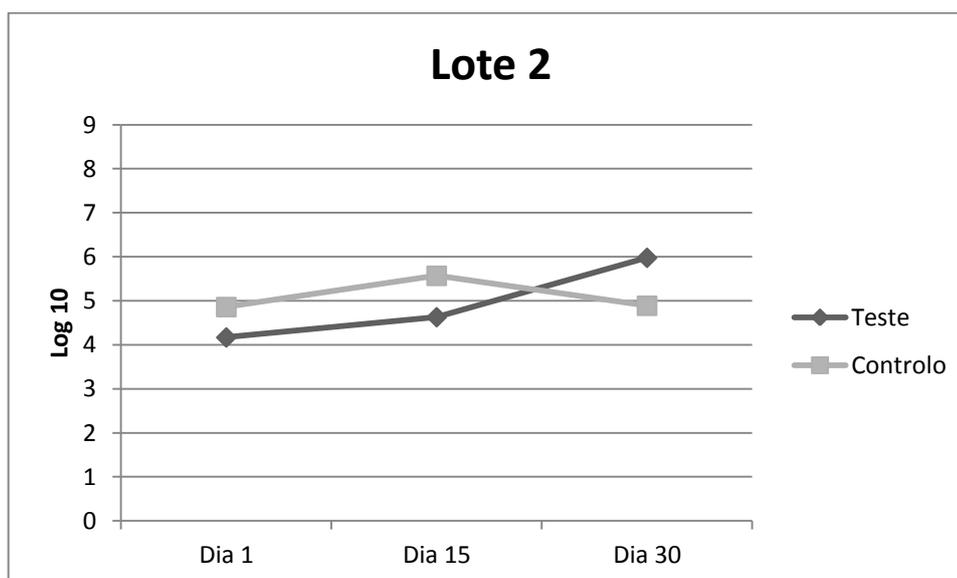


Gráfico 2 – Lote 2: Evolução das Contagens dos microrganismos totais a 30°C (log UFC/g).



No que refere à contagem de microrganismos a 30°C, o número de Unidades Formadoras de Colónias por grama (UFC/g) aumentou ao longo do tempo apresentando-se no trigésimo dia com contagens entre  $10^4$  e  $10^8$ . No que se refere ao grupo teste, ambos os lotes apresentaram crescimento da população microbiana ao longo do tempo. O grupo controlo no que se refere ao lote 1, apresentou crescimento das contagens ao longo do tempo. O lote 2 revelou uma queda no número UFC/g após 30 dias de armazenamento.

O “Caviar Pérola”, assim como outros substitutos do caviar, são preparados para consumo direto, sem qualquer outro tratamento ou seja, um alimento pronto a consumir. Os valores apresentados neste estudo revelam que após 30 dias, o produto não está em condições de consumo sendo classificado como “produto não satisfatório para consumo” segundo a tabela contida no Valores Guia para Avaliação da Qualidade Microbiológica de Alimentos Prontos a Comer Preparados em Estabelecimentos de Restauração (Santos, Correia, Cunha, Saraiva & Novais, 2005).

No que diz respeito ao uso do sorbato de potássio como aditivo conservante, em ambos os lotes registou-se crescimento de população microbiana no grupo teste. O sorbato não parece ter tido ação conservante sobre o produto devido ao pH em que se encontrava a solução teste. A solução apresentou, após a retirada dos ovos, um

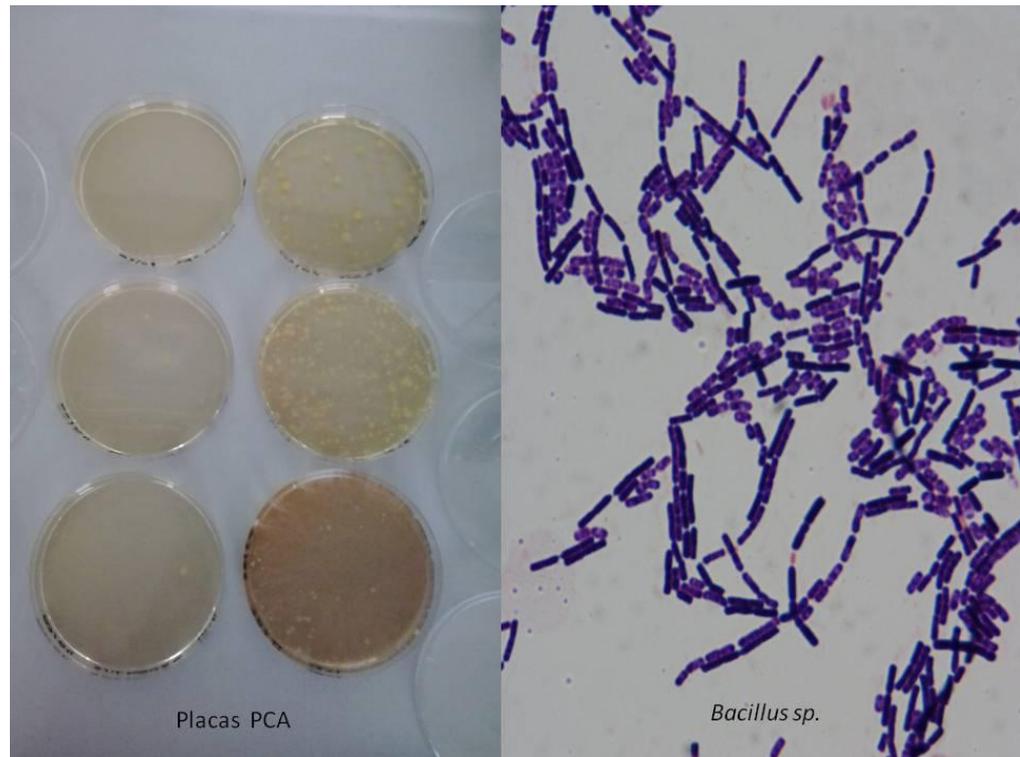
pH de 8,4. O sorbato de potássio tem o seu efeito máximo a valores de pH inferiores a 6,5. Portanto, acredita-se que não houve ação significativa do sorbato de potássio na inibição do crescimento microbiano, visto não ter ocorrido diferença.

A utilização do sorbato de potássio (E202) como aditivo teste decorreu de avaliação do Regulamento (UE) n.º 1129/2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 relativo aos aditivos alimentares. Neste documento, o uso do sorbato de potássio é autorizado para uma vasta gama de produtos incluindo salmouras diversas, semiconservas à base de peixe, produtos à base de ovas numa dosagem média de 2 g/kg de produto.

Todavia, nos produtos em comercialização denominados “Caviar Pérola” não foram encontrados referências quanto ao uso de aditivos. Entretanto, em análises preliminares realizadas, foi observada a rápida degradação do produto devido ao aumento do número de bactérias e fungos. Por esta razão utilizou-se na formulação a adição do sorbato de potássio, por ser um aditivo capaz de inibir ambos os grupos de microrganismos.

No que diz respeito às colónias visualizadas nas placas de PCA, apresentaram-se uniformes, amareladas, brilhantes, irregulares. Todas as placas apresentaram colónias semelhantes. A técnica de coloração de Gram para a visualização da morfologia microbiana foi usada para observar a forma e dimensão dos diferentes agentes microbianos. Foram identificadas bactérias cuja morfologia era compatível com o género *Bacillus sp* (Figura 12) para todas as colónias testadas.

Figura 12 – Colónias obtidas a partir das suspensões testadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) e lâmina corada com a técnica de Gram (1000x).



É provável que a técnica de produção dos ovos em turfa selecione estas espécies de bactérias. Em produtos hortícolas cultivados diretamente no solo, é possível observar *Bacillus sp.* (Mogharbel & Masson, 2005) e estes produtos servem de alimento aos caracóis, fazendo parte da sua microbiota natural.

## 2.2. Contagem de Bolores e leveduras a 25°C

Não se verificou desenvolvimento de colónias de bolores ou leveduras, nas amostras analisadas.

## 2.3. Contagem *Escherichia coli*

Não se verificou desenvolvimento de *E. coli*, nas amostras analisadas.

#### 2.4. Pesquisa de *Salmonella* spp

Não houve evidências da presença de *Salmonella* spp. em 10 gramas, nas amostras analisadas.

#### 2.5. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Não houve evidências da presença de *L. monocytogenes* em 10 gramas, nas amostras analisadas.

#### 2.6. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo

Não houve evidências da presença de *S. aureus* em 10 gramas, nas amostras analisadas.

#### 2.7. Pesquisa de *Clostridium perfringens*.

Não houve evidências da presença de *Clostridium perfringens*., nas amostras analisadas.

Contudo, Reye, Martínez, Martínez e Herrera (2007) em estudo para identificação de agentes bacterianos em caracóis, relataram as seguintes espécies bacterianas: *Salmonella* sp., *Arcanobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Hafnia alvei*, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp, *Streptococcus* sp.. Foram consideradas pelos autores como “flora microbiana normal” *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp. e *Escherichia coli*, já que foram encontradas em caracóis saudáveis.

Os resultados revelados possivelmente estarão relacionados com os cuidados do produtor no que se refere à obtenção dos ovos. A postura dos ovos de *Helix aspersa* utilizados nesta experiência foi realizada em caixas de reprodução onde estas foram forradas com turfa tratada pelo produtor, utilizando o micro-ondas como forma de esterilização. A turfa utilizada foi adquirida a empresa idónea, ou seja, passou por tratamentos industriais para garantir a qualidade e a sanidade. O que poderá ter impedido a contaminação pelas bactérias patogênicas testadas. Além disso o

produtor possui outras medidas de higiene no local da ovopostura (sala de reprodução) impedindo a contaminação por manipulação.

Apesar do NaCl ser considerado um agente conservante pela alteração da pressão osmótica do produto, a solução de NaCl a 5% supostamente não influenciou a população microbiana patogénica pois todas as espécies bacterianas testadas suportam teores de sal iguais ou superiores a 5% (Parfentjev & Catelli, 1964; Montville, 1986; Conner, Brackett & Beuchat, 1986; Thayer, Muller, Buchanan & Phillips, 1987; How et al., 2012)

Entretanto, alguns agentes dos géneros *Bacillus sp.* e *Enterobacter sp.* não foram eliminadas pelos processos de produção, uma vez que surgiram nas amostras analisadas, integrando a carga microbiana estimada na contagem de microrganismos totais a 30 °C.

No que se refere à quantidade de amostra analisada, nas provas laboratoriais e o número de amostras testadas não permitem afirmar com segurança que o “Caviar Pérola” produzido neste estudo não possa conter agentes patogénicos. Trabalhos realizados em alimentos para pesquisa de *Listeria* e *Salmonella* e a própria legislação preconizam a utilização de 25 g de amostra para a realização destas provas para alimentos pronto para consumir (Regulamento (CE) n.º1441/2007; Abdelgadir, Srivastava & Reddy, 2009; Kakiomenou, Tassou & Nychas, 1998; Drosinos, Tassou, Kakiomenou & Nychas, 2000).

Neste estudo, a quantidade da matéria-prima disponibilizada condicionou, devido a sua escassez, a opção dos ensaios analíticos baseados em 10 g e não nas 25 g descritas no Regulamento Europeu n.º 1441/2007.

O objetivo do estudo era avaliar as alterações ocorridas dentro do período descrito como o prazo de validade para o “Caviar Pérola” atualmente comercializado (3 meses). Os dois Lotes foram processados para análises periódicas a cada 15 dias por um período de 3 meses. Entretanto, a modificação de cor registada, juntamente com a elevada carga microbiana após 30 dias da preparação, foram suficientes para determinar a interrupção do procedimento analítico delineado.

Para que o produto seja competitivo no mercado atual, deverá apresentar um prazo de vida comercial útil de, no mínimo, três meses. Possivelmente, os produtos que atualmente se encontram disponíveis no comércio passam por um tratamento térmico como forma de estabilização (pasteurização).

Entretanto, os processos térmicos cuja temperatura seja superior a 55°C, alteram o aspecto do produto que passa a ter uma textura próxima da clara de ovo cozida, ao invés do que se pretende, uma consistência gelatinosa que se apresenta inicialmente nos ovos e que é o esperado pelo produtor. Além disso, alteram a cor do produto. Estes dados foram visualizados em testes efetuados preliminarmente a este estudo.

## V. CONCLUSÃO

O objetivo do presente trabalho foi analisar a estabilidade quanto às características físico-químicas e microbiológicas do “Caviar Pérola” cuja matéria-prima principal são ovos de caracol da espécie *Helix aspersa maxima* provenientes de um produtor português e cujo processamento foi idealizado através de análises da composição de produtos comercializados com a designação de “Caviar Pérola”.

A técnica desenvolvida para produção do “Caviar Pérola” neste estudo mostrou-se ineficaz para a conservação do produto por um prazo comercial útil (3 meses). A alteração da cor e a elevada contagem de microrganismos a 30° C após 30 dias de armazenamento sob refrigeração (3-6° C) impossibilitaria a comercialização e consequentemente o consumo.

A escassez de bibliografia referente aos produtos derivados dos caracóis terrestres incluindo os ovos, foi uma importante limitação no delineamento do estudo. Contudo, este estudo pode ser o ponto de partida para outros sobre o “Caviar Pérola”, tanto no que se refere à formulação do produto quanto a estabilidade do mesmo. A utilização de tecnologias de barreira é um exemplo do que poderá ser usado como modo de conservação.

Paralelamente a estes estudos, outros, como a avaliação sensorial e análise de aceitabilidade do produto pelo consumidor, poderão ser realizados para caracterizar este novo produto alimentar.

## BIBLIOGRAFIA

- Abdelgadir, A.M.M.A. Srivastava, K. K., Reddy, P.G. (2009). Detection of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products. American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 4(4), 101-107.
- Agro-Services / Agence de Promotion des Investissements Agricoles - APIA (2004). Etude sectorielle: L'élevage d'escargots – partie monographique. Tunis-Belvédère: Agence de Promotion des Investissements Agricoles, Ministère de l'Agriculture, de l'Environnement et des Ressources Hydrauliques, République Tunisienne. Acedido em ago 17, 2013, disponível em <http://www.apia.com.tn/ar/images/stories/pdf/escargot.pdf>
- Amaro, F: (2009). Segurança alimentar na produção de caracóis. Controlo da alimentação de base vegetal. Segurança e Qualidade Alimentar, 7, 17-18.
- Association Official Analytical Chemists- AOAC (2000). In Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. (17th ed.). Arlington: AOAC Inc.
- Baptista, P. Venâncio, A. (2003). Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. Escola Superior Agrária Politécnico de Coimbra. Acedido em ago 17, 2013, disponível em [http://www.esac.pt/noronha/manuais/manual\\_4\\_perigos.pdf](http://www.esac.pt/noronha/manuais/manual_4_perigos.pdf)
- Barboza, S.H.R., Romanelli, P.F. (2005). Rendimento de Carcaça E Composição centesimal do Músculo dos Moluscos Escargot (*Achatina fulica*) e Aruá (*Pomacea lineata*). Alim. Nutr., 16(1), 77-82.
- BBC (2013). French Food & drink. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em [http://www.bbc.co.uk/schools/primarylanguages/french/food\\_and\\_drink/photos/escargot/](http://www.bbc.co.uk/schools/primarylanguages/french/food_and_drink/photos/escargot/)
- Begg, S. (2006). Free-range snail farming in Australia: A report for the rural industries research and development corporation. Orange, NSW Australia: Rural Industries, Research Development Corporation,1-40.
- Berger, B., Dallinger R. (1989). Accumulation of cadmium and copper by the terrestrial snail *Arianta arbustorum* L.: kinetics and budgets. Oecologia, 79, 60-65.
- Bledsoe, G.E., Bledsoe, C.D., Rasco, B. (2003). Caviars and Fish Roe Products, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43:3, 317-356, DOI: 10.1080/10408690390826545
- Çağıltay, F., Erkan, N.,Tosun, D., Selçuk, A. (2011). Amino Acid, Fatty Acid, Vitamin And Mineral Contents of The Edible Garden Snail (*Helix aspersa*) Journal of FisheriesSciences.com, 5(4), 354-363. DOI: 10.3153/jfsc.com.2011040
- Camargo, A.C. (2006). USP-CENA/PCLQ. Divulgação da tecnologia de irradiação de alimentos e outros materiais. Conservação de alimentos. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em [http://www.cena.usp.br/irradiacao/cons\\_alim.html](http://www.cena.usp.br/irradiacao/cons_alim.html)

- Canadian Food Inspection Agency. (2011). *Helix aspersa* (European Brown Garden Snail) - Fact Sheet. Canadá: CFIA. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://www.inspection.gc.ca/plants/plant-protection/nematodes-other/european-brown-garden-snail/fact-sheet/eng/1326334238293/1326341285764#>
- Carvalho, P. R. (2005) Aditivos dos Alimentos. Revista LOGOS, 12, 57-69.
- Chase R. (2007) Gastropod reproductive behavior, Scholarpedia, 2(9), 4125. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://dx.doi.org/10.4249/scholarpedia.4125>
- Chase R., Blanchard K.C. (2006). The snail's love-dart delivers mucus to increase paternity. *Proceedings of the Royal Society B* 273, 1471-1475.
- Chase, R. (2013). Ronald Chase, Professor Emeritus. Department of Biology, McGill University Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://biology.mcgill.ca/faculty/chase/index.html>
- Cirlan A., Sindilar E. (2010). Observations regarding the histological structure of the genital system of the garden snail *H. pomatia*. *Lucrări Științifice (seria Medicină Veterinară)* 53, 969-972.
- Cobbinah, J. R., Vink, A. & Onwuka, B. (2008). Snail farming: Production, processing and marketing. Wageningen: Agromisa. Acedido em ago 17, 2013, disponível em <http://www.openideo.com/open/how-might-we-improve-health-care-through-social-business-in-low-income-communities/concepting/grow-edible-snails-to-supplement-caldas-nutrition/gallery/snail-farming-manual.pdf/>
- Codex Alimentarius Commission (1969). General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP, 1, 1-31.
- Conner, D.E., Brackett, R.E., Beuchat, L.R. (1986). Effect of Temperature, Sodium Chloride, and pH on Growth of *Listeria monocytogenes* in Cabbage Juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 59-63.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. (2013). Sturgeons. Switzerland:CITES. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://www.cites.org/eng/prog/sturgeon.php>
- Coughtrey, P.J ., Martin M. H. (1977).The uptake of lead, zinc, cadmium, and copper by the pulmonate mollusc, *Helix aspersa muller*, and its relevance to the monitoring of heavy metal contamination of the environment. *Oecologia*, 27, 65-74.
- Daily Mail Reporter (2011) 'White Caviar'... Is Britain ready for snails' eggs? Mail online. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://www.dailymail.co.uk/news/article-1382476/White-Caviar--Is-Britain-ready-snails-eggs.html>

- Dekle, G.W., Fasulo, T.R. (2001). Brown Garden Snail, *Cornu aspersum* (Müller, 1774) (Gastropoda: Helicidae). EENY-240 (IN396) DPI Entomology Circular 83, 1-4
- Direcção-Geral dos Assuntos Marítimos e das Pescas (2012). O esturção *Acipenser baerii* A pesca e a aquicultura na europa, 56. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em [http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/factsheets-aquaculture-species/sturgeon\\_pt.pdf](http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/factsheets-aquaculture-species/sturgeon_pt.pdf)
- DIRECTIVA 2000/13/CE do parlamento europeu e do conselho de 20 de Março de 2000 relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 109/29.
- Drosinos, E.H., Tassou, C., Kakiomenou, K., Nychas, G-J.E. (2000). Microbiological, physico-chemical and organoleptic attributes of a country tomato salad and fate of *Salmonella enteritidis* during storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions at 4°C and 10°C. E.H. Food Control, 11, 131-135.
- Egonmwan R.I. (2007). Gross morphology and ultrastructural study of albumen gland of the land snail *Archachatina marginata ovum* (Pfeiffer) (*Pulmonata: Achatinidae*). Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(2), 322-325.
- European Food Safety Authority. Food Additives. EFSA (n.d.). Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives.htm>
- FDA - U.S. Food and Drug Administration (1975). Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Potassium sorbate. FDA. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261027.htm>
- Ferreira, F.A. (2006). Desenvolvimento de produto tipo caviar a base de ovas de Tainha (*Mugil platanus*). Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Rio Grande, RS: Fundação Universidade Federal do Rio Grande.
- Fichtner, J. (2011). Caviar d'escargot. Tope. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://blogtope.com.br/blog/wp-content/uploads/2011/10/caviar-escargot.jpg>
- Food Ingredients Brasil (2011). Conservantes. Food Ingredients Brasil, 18, 28-36.
- Food Ingredients Brasil (2012). Conservação de Alimentos por Aditivos Químicos. Food Ingredients Brasil, 22, 34-42.
- Food Safety Authority of Ireland, (2005). Guidance Note No. 18: Determination of Product Shelf-Life. Dublin: FSAI. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Legislation/Food Legislation Links/Minced>

Meat, Meat Preparations and Mechanically Separated Meat (MSM)/gn18.pdf

- Galhanone, R.F., Toledo, G.L. (2008). Os Comportamento do Consumidor de Produtos Luxuosos e Sofisticados: Um estudo empírico. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em [http://www.ead.fea.usp.br/semead/11semead/resultado/an\\_resumo.asp?cod\\_trabalho=308](http://www.ead.fea.usp.br/semead/11semead/resultado/an_resumo.asp?cod_trabalho=308)
- Garber Jr, L.L., Hyatt, E.M., Starr jr., R.G. (2000) The effects of food color on perceived flavor. *Jornal of Marketing Theory and Practice*, 59-72.
- García, E.M. (2006). García, E.M. (2006). Nutrición de caracoles. *idiaXXI*, 90-94. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210227.pdf>
- Gomot, P., Gomot, L., Griffond, B. (1989). Evidence for a Light Compensation of the Inhibition of Reproduction by Low Temperatures in the Snail *Helix aspersa*. Ovotestis and Albumen Gland Responsiveness to Different Conditions of Photoperiods and Temperatures. *Biology of Reproduction*, 40, 1237-1245
- Guillaume, H: (2001). Oeufs d'escargot : le caviar blanc. *Pleasure Blog*. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://www.pleasureblog.net/oeufs-escargot-caviar-blanc/>
- Hayashi, C., Soares C., Matsushita M., Galdioli E. M., Cocito I. (2004). Desempenho e características de carcaça do escargot francês (*Helix aspersa maxima*) alimentado com rações contendo diferentes óleos vegetais. *Ciência Rural*, 34(1).
- Hayashi, C., Soares, C.M., Boscolo, V.R., Galdioli, E.M., Furuya, V.R.B. (2000). Diferentes Fontes Protéicas em Dietas para o Caracol Gigante (*Achatina fulica*) na Fase de Crescimento. *Rev. bras. zootec.*, 29(6), 2080-2086,(Suplemento 1).
- Hickman, C.P., Roberts, L.S., Keen, S.L., Larson, A., l'Anson, H., Eisenhour, D.J. (2011). *Integrated principles of zoology* (15 th edition). New York: McGraw-Hill.
- How, J.A., Lim, J.Z.R., Goh, D.J.W., Ng, W.C., Oon, J.S.H., Lee, K.C., Lee, C.H., Ling, M.H.T. (2013). Adaptation of *Escherichia coli* ATCC 8739 to 11% NaCl. *Hindawi Publishing Corporation Dataset Papers in Biology*, 2013, 1-7. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://dx.doi.org/10.7167/2013/219095>
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessangua, W. (2011). Chemical compositions of the roes from skipjack, tongol and bonito. *Food Chemistry*, 124, 1328–1334.
- ISO 11290-1 (1996). "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*". International Organization for Standardization.

- ISO 4833 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization.
- Johannesson, J. (2006). Lumpfish Caviar – From Vessel to Consumer . Food and Agriculture Organization of The United Nations. Fisheries Technical Paper 485. Roma: FAO.
- Juříčková J., Kapounek F. (2009). *Helix (Cornu) aspersa* (O.F. Müller, 1774) (Gastropoda: Helicidae) in the Czech Republic. *Malacologica Bohemoslovaca*, 8, 53–55. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://mollusca.sav.sk/pdf/8/8.Jurickova.pdf>
- Kakiomenou, K., Tassou, C., Nychas, G.-J. (1998). Survival of *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 383-387.
- Kilcast, D., Subramaniam, P. (2000). The stability and shelf-life of food. (1-333). Boca Raton: CRC Press LLC.
- Koene, J.M. (2006). Tales of two snails: sexual selection and sexual conflict in *Lymnaea stagnalis* and *Helix aspersa*. *Integrative and Comparative Biology*, 46(4), 419–429.
- Koene, J.M., Chase R. (1998). The love dart of *Helix aspersa* Muller is not a gift of calcium. *J. Moll. Stud.*, 64, 75-80.
- Landolf, M.A., David M. Green, D.M., Chase, R. (2001). Dart shooting influences paternal reproductive success in the snail *Helix aspersa* (Pulmonata, Stylommatophora). *Behavioral Ecology*, 12(6), 773–777.
- Lloveras, L.I., Nadal, J., Garcia A.P., Fullola, J.M., Estrada, A. (2011). The land snail midden from Balma del Gai (Barcelona, Spain) and the evolution of terrestrial gastropod consumption during the late Palaeolithic and Mesolithic in eastern Iberia. *Quaternary International* 244: 37-44
- Lopes, T.J., Xavier, M.F., Quadri, M.G.N., Quadri, M.B. (2007). Antocianinas: Uma Breve Revisão das Características Estruturais e da Estabilidade. *R. Bras. Agrociência*, 13(3), 291-297.
- Lubell, D. (2003). Are land snails a signature for the Mesolithic-Neolithic transition? *Documenta Praehistorica XXXI*. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em [http://www.manandmollusc.net/lubell\\_ljubljana1.pdf](http://www.manandmollusc.net/lubell_ljubljana1.pdf)
- Milinsk, M.C., Padre, R.G., Hayashi, C., Soares, M., Souza, N.E, Matsushita, M. (2004). Composição química e perfil de ácidos graxos em escargot (*Helix aspersa maxima*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes proteicas. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 26(4), 469-473.
- Mogharbel, A.D.I., Masson, M.L. (2005). Perigos Associados ao Consumo da Alface, (*Lactuca sativa*), in natura. *Alim. Nutr.*, Araraquara, 16, 83-88.

- Monfort, M.C. (2002). Fish Roe in Europe: Supply and Demand Conditions. FAO/GLOBEFISH Research Programme, 72, 1-47.
- Montville, T.J. (1983). Interaction of pH and NaCl on Culture Density of *Clostridium botulinum* 62A. Applied and Environmental Microbiology, 46(4), 961-963.
- Morei, V. (2012). Heliciculture – Perspective business in the context of sustainable development of rural areas. Scientific Papers Series “Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development“, 12(3), 115-120.
- Morishita F., Mukai S.T., Saleuddin A.S. (1998). Release of proteins and polysaccharides from the albumen gland of the freshwater snail *Helisoma duryi*: effect of cAMP and brain extracts. J. Comp. Physiol. A., 182(6), 817-825.
- Msxeroz, N. (2013). L'Escargot TVB HongKong Drama - Reflection on Life's Hardship. Stories of my life. Acedido em Out 23, 2013, disponível em <http://www.msxeroz.com/2012/10/lescargot-tvb-hongkong-drama-reflection.html>
- Nordsieck, R. (2013). Body Parts and Organs. The Living World of Molluscs. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://molluscs.at/gastropoda/terrestrial/helix.html?/gastropoda/terrestrial/helix/cultivation.html>
- NP 3277-1 (1987). Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: incubação a 25 °C. Lisboa: Instituto Português da Qualidade.
- Pacheco Ribeiro G., Farinha, N., Santos S., Neves J. (2007). Efeito de três alimentos diferentes sobre as características físico-químicas do músculo Longissimus dorsi do porco de raça Alentejana. Revista de Ciências Agrárias, 375-384.
- Parfentjev, I.A., Catelli, A.R. (1964). Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. Journal of Bacteriology , 88, 1-3.
- Perea, J., Martín R., Acero, R., Félix, E., Gómez, A.G., García-Mayoral, A., Peña, F., García, A. (2006). Selección de hábitat en caracoles terrestres y sus aplicaciones a la helicicultura. Arch. Zootec. 55, 1-12.
- Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do parlamento europeu e do conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, L 354, 16-33.
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da comissão de 5 de dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, L 322, 12-29.
- Regulamento (CE) n.º 178/2002 do parlamento europeu e do conselho de 28 de janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a autoridade europeia para a segurança alimentar e

estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, L 31, 1-9.

Regulamento (CE) n.º 852/2004 do parlamento europeu e do conselho de 29 de abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, L 139, 1-54.

Regulamento (CE) n.º 853/2004 do parlamento europeu e do conselho de 29 de abril de 2004 restabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia, L 226.

Regulamento (CE) n.º 865/2006 de 4 de Maio de 2006 que estabelece normas de execução do Regulamento (CE) n.º 338/97 do Conselho relativo à protecção de espécies da fauna e da flora selvagens através do controlo do seu comércio. Jornal Oficial da União Europeia, L 166, 1-69.

Regulamento (UE) n.º 738/2013 da comissão de 30 de julho de 2013 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito à utilização de certos aditivos em sucedâneos de ovas de peixe à base de algas. Jornal Oficial da União Europeia, L 204, 32-34.

Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da comissão de 11 de Novembro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, L 295, 1-177.

Reyes, F.A.M., Martínez, P.A.V., Martínez, G.R., Herrera, L.R. (2007). Diagnóstico sanitario de diversos zocriaderos helicícolas en colombia: Determinación de los principales agentes patógenos que afectan el caracol *Helix aspersa* (O.F. Muller, 1774) en cada de su ciclo biológico. *Revista de Medicina Veterinaria*, 14, 17-35.

Ribas, J. (1986). Criação de caracóis: Nova opção económica brasileira. (4th Ed.). (9-37). São Paulo: Nobel.

Rummell, N. (2012). The Sluggish and the Sumptuous: Snail Caviar Slips onto a Few Menus. *StarChefs*. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://www.starchefs.com/cook/savory/product/escargot-caviar>

Santos, M.I., Correia, C., Cunha, M.I.C., Saraiva, M.M., Novais, M.R. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista da Ordem dos Farmacêuticos* 64, 66-69.

Silverstein, M.J., Fiske, N. (2003). Luxury for the Masses, *Harvard Business Review*, 84 (3), 48-57.

Soares, C.M., Hayashi, C., Cocito, I.C. (2002). Exigência de Proteína para o Escargot Francês, *Helix aspersa maxima* em Fase de Crescimento. *R. Bras. Zootec.*, 31(2), 835-841.

- Thayer, D.W., Muller, W.S., Buchanan, R.L., Phillips, J.G. (1987). Effect of NaCl, pH, Temperature, and Atmosphere on Growth of *Salmonella typhimurium* in Glucose-Mineral Salts Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1311-1315.
- Toader, A. (2012). The influence of feed upon the *Helix* (Sp) edible snails' production performance under the bioeconomic aspect. Summary of Ph.D. thesis. Napoca: University Of Agricultural Science And Veterinary Medicine Cluj-Napoca Doctoral School Faculty Of Animal Sciences And Biotechnologies.
- Tocchini, L., Mercadante, A.Z. (2001). Extração e Determinação, por CLAE, de Bixina e Norbixina em Coloríficos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 21(3), 310-313.
- Torres E.A.F.S., Campos N.C., Duarte M., Garbelotti, M.L., Philippi S. T., Rodrigues R.S.M. (2000). Composição Centesimal e Valor Calórico de Alimentos de Origem Animal. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 20(2).
- Tunner, L. (2010). Wikipedia, the free encyclopedia. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Helix\\_aspersa\\_mating.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Helix_aspersa_mating.jpg)
- Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R.M. (2012). Principles and Methodologies for the Determination of Shelf-Life in Foods. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em [http://cdn.intechopen.com/pdfs/35124/InTech-Principles\\_and\\_methodologies\\_for\\_the\\_determination\\_of\\_shelf\\_life\\_in\\_foods.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/35124/InTech-Principles_and_methodologies_for_the_determination_of_shelf_life_in_foods.pdf)
- White-McLean, J. A. (2011). Terrestrial mollusc tool. Acedido em Ago 17, 2013, disponível em <http://idtools.org/id/mollusc>