



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**EFEITO DA TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NAS
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICAS DA TRIPA NATURAL DE SUÍNO**

CÁTIA FALCÃO MARTINS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

VOGAIS

Doutora Teresa de Jesus da Silva Matos

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

CO-ORIENTADOR

Doutor António José Infante Alfaia

2014

LISBOA



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**EFEITO DA TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NAS
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICAS DA TRIPA NATURAL DE SUÍNO**

CÁTIA FALCÃO MARTINS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA - PRODUÇÃO
ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

VOGAIS

Doutora Teresa de Jesus da Silva Matos

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

CO-ORIENTADOR

Doutor António José Infante Alfaia

2014

LISBOA

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada aos meus pais, aos meus avós e ao meu irmão, que são os pilares que me têm acompanhado na conquista de cada etapa da minha vida.

Aqui está mais uma.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”

Ricardo Reis

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria João Fraqueza, minha orientadora, por todo o apoio prestado, pelos conhecimentos transmitidos e pela revisão do trabalho.

Ao Professor Doutor António Alfaia, meu co-orientador, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e pela revisão do trabalho.

À Professora Doutora Maria Teresa Matos, do ISA, pelo contacto estabelecido, foi a principal responsável pela oportunidade de ter a orientadora que tive e de conhecer todas as pessoas interessantes que conheci na FMV.

À Zé, Lena e Ana por todo o auxílio, prestabilidade, paciência, amizade e simpatia. Obrigada especialmente pelo apoio em todas as atividades de laboratório, por tudo o que me ensinaram.

À Doutora Begoña Hernando da Estación Tecnológica de la Carne, de Guijuelo, Salamanca, pelo acolhimento, apoio e simpatia na nossa estadia em Espanha.

À Professora Doutora Isabel de Sousa, do ISA, pela cedência do equipamento para a realização da medição da resistência mecânica da tripa. À Engenheira Mara Pereira, pela simpatia e disponibilidade, pelo auxílio na montagem do equipamento e, posterior, ajuda na melhor forma de organizar os dados obtidos.

À Professora Doutora Conceição Peleteiro, da FMV, pela realização das análises histológicas, pela disponibilidade demonstrada e por todas as explicações dadas sobre o assunto.

À Andreia, colega de laboratório neste trabalho é há muito minha amiga, uma amiga para a vida que levo da faculdade, por todo o apoio, por todas as palavras de conforto e motivação.

Aos meus amigos, por serem a minha fuga, a minha distração, para recarregar baterias e recuperar forças para conseguir realizar este trabalho.

Aos meus pais pelo carinho, amor e por estarem ao meu lado incondicionalmente, porque nunca me senti pressionada, podendo tomar todas as minhas decisões com o vosso apoio e motivação. Também ao meu irmão, companheiro da vida e, inconscientemente, o meu apoio e incentivo de coragem.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

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

EFEITO DA TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICAS DA TRIPA NATURAL DE SUÍNO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática, de acordo com diferentes níveis de pressão (P) e tempo (t), sobre as características microbiológicas e físicas da tripa natural de suíno, através de análises microbiológicas, testes de resistência mecânica, medições de cor, análises histológicas e medições do ângulo de contacto de superfície.

Pelos resultados obtidos nas análises microbiológicas, verificou-se que a tecnologia de alta pressão foi eficaz na eliminação dos contaminantes microbiológicos do produto, sendo que no tratamento de 400 MPa e 1800 s as contagens dos microrganismos estudados foram inferiores ao limite de deteção (<1 log ufc/g). Os testes de resistência mecânica da tripa revelaram que os tratamentos de alta pressão não afetaram negativamente a sua estrutura, o que foi confirmado a nível microscópico, nas análises histológicas, pela observação das túnicas de tripa inalteradas. Pelas medições de cor detetou-se uma alteração da mesma nas tripas com a alta pressão (diminuição de a*, aumento de b* e de L*). A determinação do ângulo de contacto das amostras não se revelou conclusiva para o efeito estudado.

Os resultados deste trabalho provaram o interesse que a tecnologia de alta pressão hidrostática poderá ter ao nível do processamento da tripa natural, como método eficaz na melhoria da sua qualidade microbiológica, sem prejudicar as suas aptidões tecnológicas.

PALAVRAS-CHAVE: Tecnologia de alta pressão hidrostática, tripa natural, qualidade microbiológica, resistência mecânica

EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE TECHNOLOGY IN MICROBIOLOGICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF PORK NATURAL CASING

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of high hydrostatic pressure technology on the microbiological and physical characteristics of pork natural casing, through microbiological analysis, mechanical resistance tests, color measurements, histological analysis and contact angle measurements. The effectiveness of treatments according to the pressure (P) and time (t) applied was also studied.

The high hydrostatic pressure was effective for microbial contaminants elimination because at 400 MPa and 1800s the microbial counts were lower than the detection limit (<1 log cfu/g). The mechanical resistance tests showed that the high pressure treatments did not negatively affect the structure of natural casings. This was confirmed by histological analysis which revealed casing layers unchanged. By color measurements were detected color change on natural casing (decreased in a* and increased in b* and L*). Determinations of contact angle were inconclusive for the studied effect.

The results of this work proved the interest of high hydrostatic pressure technology in natural casings processing, as an effective method to ensure their microbiological quality without loss of their technological skills.

KEW-WORDS: High Hydrostatic Pressure Technology, natural casing, microbiological quality, mechanical resistance

ÍNDICE GERAL

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Menção ao apoio financeiro.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice Geral.....	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Lista de siglas e símbolos.....	xii
1 - Introdução.....	1
2 - Revisão Bibliográfica	4
2.1 - A Relação entre as indústrias de triparia e salsicharia	4
2.2. - Tipos de invólucros utilizados na indústria de salsicharia.....	5
2.2.1 - Tripa Natural	5
2.2.2 - Tripa Artificial e Tripa Sintética.....	6
2.3 - Definição e comparação das aptidões tecnológicas dos diferentes tipos de invólucros.....	7
2.4 - Qualidade microbiológica da tripa natural	10
2.5 - Métodos inovadores no processamento da tripa natural	12
2.6 - Tratamentos atérmicos no processamento e conservação de alimentos	13
2.7 - Tecnologia de alta pressão hidrostática	14
2.7.1 - Um pouco de história sobre a tecnologia de alta pressão hidrostática	15
2.7.2 - Equipamento utilizado na aplicação de alta pressão	16
2.7.2.1 - Princípios gerais do processo de alta pressão.....	18
2.7.2.2 - Descrição do processo de produção de alta pressão	19
2.7.2.3 - Sistemas de pressurização.....	20
2.8. - Efeito da alta pressão sobre os microrganismos.....	21
2.8.1 - Fatores que influenciam o efeito da alta pressão sobre os microrganismos	24
2.9 - Efeitos da alta pressão nas características químicas do alimento	26
2.9.1 - Efeito da alta pressão sobre as proteínas	27
2.9.2 - Efeito da alta pressão sobre os lípidos.....	29
2.9.3 - Efeito da alta pressão sobre os hidratos de carbono.....	30
2.9.4 - Efeito da alta pressão sobre a água do alimento.....	30
2.9.5 - Efeito da alta pressão sobre os micronutrientes do alimento.....	31
2.10 - Efeito da alta pressão nas características físicas do alimento.....	31
2.10.1 - Efeito da alta pressão sobre a cor do alimento.....	32
2.11 - Combinação da alta pressão com outras estratégias de conservação de alimentos	34
3 - Efeito da tecnologia de alta pressão nas características microbiológicas e físicas da tripa natural de suíno	35
3.1 - Objetivos e Justificação do trabalho.....	35
3.2 - Materiais e Métodos.....	36
3.2.1 - Receção das tripas e sua preparação	36
3.2.2 - Aplicação de alta pressão às amostras de tripa	36
3.2.3 - Análises Microbiológicas	37
3.2.3.1 - Preparação das amostras para análise microbiológica.....	37
3.2.3.2 - Preparação das diluições	37
3.2.3.3 - Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	38
3.2.3.4 - Contagem de <i>Escherichia coli</i>	38

3.2.3.5 - Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.	38
3.2.3.6 - Contagem de <i>Brochothrix thermosphacta</i>	38
3.2.3.7 - Contagem de <i>Enterococcus</i>	39
3.2.3.8 - Contagem de <i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	39
3.2.3.9 - Contagem de bactérias ácido lácticas	39
3.2.3.10 - Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	39
3.2.3.11 - Contagem de <i>Salmonella</i> spp.....	40
3.2.4 - Análises Físicas	41
3.2.4.1 - Análise da resistência mecânica da tripa.....	41
3.2.4.1.1 - Teste de tensão radial da largura da tripa	41
3.2.4.1.2 - Teste de Perfuração	423
3.2.4.2 - Análises Colorimétricas	44
3.2.4.3 - Análises Histológicas	45
3.2.4.4 - Determinação do ângulo de contacto de superfície da tripa	46
3.2.5 - <i>Design</i> experimental e Análise estatística dos resultados	48
4 - Apresentação e Discussão dos resultados	50
4.1 - Avaliação da qualidade microbiológica das tripas utilizadas no estudo	50
4.2 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre a microbiota da tripa natural de suíno	52
4.3 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre as propriedades mecânicas da tripa natural de suíno	57
4.4 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre a cor da tripa natural de suíno.....	61
4.5 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre a microestrutura da tripa natural de suíno	67
4.6 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre o ângulo de contacto de superfície da tripa natural de suíno	71
5 - Conclusões.....	74
6 - Bibliografia.....	77
7 - Anexos	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução da instalação de equipamentos de alta pressão hidrostática nos vários continentes no período de 1990 a 2008	15
Figura 2 - Representação esquemática do equipamento de alta pressão hidrostática semicontínuo	17
Figura 3 - Esquema ilustrativo do funcionamento de uma unidade de alta pressão	20
Figura 4 - Equipamento de alta pressão utilizado.....	36
Figura 5 - Sondas e acessórios adicionados ao texturómetro para realização do teste de tensão radial da largura da tripa, com a amostra a analisar colocada no respetivo local da experiência	42
Figura 6 - Representação esquemática do corte para obtenção de um segmento de tripa com 2 cm (A) e da colocação da amostra nas barras metálicas do equipamento (B).....	42
Figura 7 - Texturómetro com a sonda montada para a realização do teste de perfuração e com a amostra de tripa colocada no respetivo local da experiência.....	43
Figura 8 - Representação esquemática do modelo HSV (hue and chroma value) (A) e da escala de Hue (B)	44
Figura 9 - Processador de tecidos para análise histológica Leica TP1020 (A) e Bancada de inclusão Leica EG1150C (B).....	45
Figura 10 - Representação esquemática do ângulo de contacto formado por uma gota de um líquido na superfície de um sólido e das energias interfase líquido-vapor (y_{LV}), sólido-líquido (y_{SL}) e sólido-vapor (y_{SV})	46
Figura 11 - Representação esquemática do clipe onde a amostra foi colocada para medição do ângulo de contacto (A) e fotografia da amostra colocada no clipe (B).....	47
Figura 12 - Tensiómetro com a amostra colocada no respetivo local da experiência (A) e pormenor da amostra colocada no gancho da balança (B)	48
Figura 13 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre a população de <i>Enterococcus</i> (VAR3) das amostras de tripa.....	55
Figura 14 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre a população de BAL (VAR4) das amostras de tripa	56
Figura 15 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre a força máxima de tensão (VAR5) das amostras de tripa.....	59
Figura 16 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o alongamento (VAR6) das amostras de tripa.....	59
Figura 17 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o índice de luminosidade (VAR8) das amostras de tripa.....	64

Figura 18 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o índice de vermelho (VAR9) das amostras de tripa	64
Figura 19 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o índice de amarelo (VAR10) das amostras de tripa	65
Figura 20 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o valor de chroma (VAR11) das amostras de tripa	65
Figura 21 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o valor do ângulo de Hue (VAR12) das amostras de tripa	66
Figura 22 - Microfotografia do corte histológico da amostra de tripa de controlo com observação das seguintes túnicas: serosa (a), muscular (b), submucosa (c), mucosa (d), H&E	68
Figura 23 - Microfotografia do corte histológico da amostra de tripa submetida ao tratamento de 202 MPa e 960 s, onde se destacam serosa (a), muscular (b), submucosa (c) e mucosa (d), H&E.....	69
Figura 24 - Microfotografia do corte histológico da amostra de tripa submetida ao tratamento de 600 MPa e 960 s com visualização das seguintes túnicas: serosa (a), muscular (b), submucosa (c), mucosa (d), H&E	70
Figura 25 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o ângulo de contacto na superfície exterior das amostras de tripa medido em bromonaftaleno (VAR14).....	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Recomendações microbiológicas para tripas frescas salgadas.....	11
Tabela 2 - Média e desvio-padrão das contagens das análises microbiológicas das amostras de tripa de controlo	50
Tabela 3 - Média e desvio-padrão das contagens das análises microbiológicas das amostras de tripa submetidas a tratamentos com diferentes binómios pressão-tempo	52
Tabela 4 - Efeitos da pressão e do tempo dos tratamentos sobre a microbiota da tripa, pela análise dos níveis de significância (p) e do valor dos coeficientes considerados (R^2 e R^2_{adj})	54
Tabela 5 - Média e desvio-padrão dos resultados das medições da força máxima de tensão (F_T), do alongamento (ϵ) e da força máxima de perfuração (F_P) das amostras de tripas de controlo e das tratadas com alta pressão.....	57
Tabela 6 - Efeitos da pressão e do tempo dos tratamentos sobre a F_T , o ϵ e a F_P , pela análise dos níveis de significância (p) e do valor dos coeficientes considerados (R^2 e R^2_{adj})	58
Tabela 7 - Média e desvio-padrão dos resultados das medições dos parâmetros de cor avaliados nas amostras de tripa de controlo e nas tratadas com alta pressão	62
Tabela 8 - Efeitos da pressão e do tempo dos tratamentos sobre os parâmetros de cor da tripa avaliados, L^* , a^* , b^* , valor de chroma e ângulo de Hue, pela análise dos níveis de significância (p) e do valor dos coeficientes considerados (R^2 e R^2_{adj})	63
Tabela 9 - Média dos ângulos de contacto medidos em água (θ_{H_2O}) e em bromonaftaleno (θ_b), na superfície exterior e interior, das amostras de tripa de controlo e das tratadas com alta pressão	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

a_w - Atividade da água

BAL - Bactérias ácido lácticas

UE - União Europeia

E.U.A - Estados Unidos da América

ENSCA - European Natural Sausage Casings Association

FIPA - Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares

HACCP - Hazard Analysis Critical Control Points

H&E - Hematoxilina & Eosina

INSCA - International Natural Sausage Casing Association

ISO - International Organization for Standardisation

PIF - Pressão isostática a frio

PIQ - Pressão isostática a quente

RSM - Response Surface Design

SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

bp – base pair
°C - graus Celsius
cfu - colony-forming units
cm - centímetro
 ϵ - alongamento
 F_T - Força máxima de tensão
 F_P - Força máxima de perfuração
g - grama
h - hora
L - litro
Log - logaritmo
min - minuto
ml - mililitro
mm - milímetro
MPa - megapascal
mPa.s - milipascal-segundo
mN - milinewton
N - newton
NaCl - cloreto de sódio
P - Pressão
 p - níveis de significância
PA/PE - poliamida/polietileno
s - segundo
t - tempo
ufc - unidades formadoras de colónias
 μm - micrometro
 γ_{LV} - energia da interfase líquido-vapor
 γ_{SL} - energia interfacial entre as fases sólida e líquida
 γ_{SV} - energia da interface sólido-vapor
 θ - ângulo de contacto
 θ_a - ângulo de contacto de avanço
 θ_r - ângulo de contacto de retrocesso

1 - Introdução

Na sociedade moderna verifica-se uma tendência crescente da preferência dos consumidores por produtos alimentares tradicionais porque a população, cada vez mais urbanizada, vê neles uma forma de reviver as raízes e tradições.

Em países do mediterrâneo, como Portugal, os produtos de salsicharia tradicional diferenciam-se no mercado pelas suas características organolépticas ímpares, oriundas não só das particularidades das matérias-primas utilizadas na sua produção, como também do processo de fabrico típico. Assim, a imagem dos produtos tradicionais, por oposição aos produtos industriais, está associada a técnicas de conservação convencionais sem recurso a aditivos químicos alimentares, a receitas típicas de cada região e a sistemas de produção animal extensivos, onde aparece a criação de raças autóctones.

A indústria de salsicharia, nos últimos anos, tem vindo a crescer ao nível da diversidade de produtos apresentada no mercado e em termos de investimento em novas tecnologias, que só aumentam a sua produtividade. Outra das mudanças ligada a esta indústria tem sido o regresso a fórmulas tradicionais, pois estes produtos têm uma procura crescente no mercado.

Uma das preocupações dos consumidores e produtores de produtos cárneos fermentados é a garantia de segurança destes produtos, mas esta é ainda difícil devido à inexistência de uma etapa de fabrico eficaz na eliminação e no controlo do crescimento de microrganismos patogénicos. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* são os microrganismos patogénicos mais frequentes neste tipo de produtos cárneos e no seu ambiente de produção (Talon & Leroy, 2011).

Para garantir que o produto final possa ser consumido sem representar perigo para a saúde, a indústria de salsicharia tem recorrido a tratamentos térmicos. Porém, este tipo de tratamentos leva a modificações nutricionais e sensoriais nos produtos cárneos fermentados. Assim, surgiu a necessidade de procurar uma nova tecnologia que conseguisse contornar os inconvenientes demonstrados pela utilização de tratamentos térmicos.

A aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática é já uma realidade habitual no processamento de vários produtos alimentares, como sumos de fruta, ostras e compotas mas só recentemente começou a ser considerada a sua potencial aplicação em produtos cárneos. Algum destaque tem sido dado na aplicação desta tecnologia emergente por conseguir garantir a segurança microbiológica de produtos cárneos fermentados, fatiados e embalados em atmosfera modificada (tratamentos de 500 MPa durante 5 minutos), com as vantagens adicionais de preservar os nutrientes e as características sensoriais e de

prolongar o período de vida útil destes produtos (Rubio, Martínez, Garcia-Cachán, Rovira & Jaime, 2007).

Contudo a aplicabilidade da tecnologia de alta pressão hidrostática no processamento de produtos cárneos fermentados ainda está a ser estudada.

Uma das matérias-primas auxiliares e praticamente obrigatória na produção de produtos de salsicharia tradicionais é a tripa natural, que é utilizada como invólucro. As tripas são um subproduto do abate de animais de talho e são aproveitadas de forma a serem utilizadas pela indústria de salsicharia.

É fundamental garantir a qualidade de todas as matérias-primas utilizadas porque, só assim, podemos obter um produto final de boa qualidade. Deste modo, as tripas naturais utilizadas na produção de enchidos tradicionais têm de apresentar características de qualidade microbiológica e tecnológica, de forma a não contaminarem o produto na fase de enchimento e sendo capazes de resistir a esta e às subsequentes etapas de fabrico nas melhores condições.

Devido à presença de uma microbiota de origem endógena e exógena no intestino, a tripa natural está certamente contaminada por bactérias, leveduras e bolores (Labie, 1987). O processamento da tripa natural, antes de chegar à indústria de salsicharia, ao nível da triparia, não é eficiente na eliminação destes contaminantes microbiológicos, apesar de se conseguir uma redução considerável na população microbiana se o processamento for realizado convenientemente, aplicando regras de higiene adequadas. Para além disso, os posteriores métodos de conservação da tripa natural, como a salga e a secagem, não são eficientes na eliminação de microrganismos (Chawla, Chander & Sharma, 2006). Vários estudos observaram que esporos de *Clostridium perfringens* e esporos de *Clostridium* sulfito-redutores permaneceram viáveis após o armazenamento da tripa em sal (Houben, 2005; Wijnker, Koop & Lipman, 2006). A dessalga ou a rehidratação da tripa natural, que aumentam a atividade da água (a_w), e a pasteurização, como processamento posterior dos enchidos cárneos que utilizam estas tripas como invólucro, podem fazer com que os esporos bacterianos retomem o seu estado vegetativo elevando o risco sanitário destes produtos para o consumidor final (Mead *et al.*, 1999). Desta forma torna-se evidente a necessidade de introduzir uma etapa no processamento da tripa natural que melhore a sua qualidade microbiológica sem afetar as suas qualidades tecnológicas.

Com o intuito de encontrar uma solução para o problema mencionado anteriormente, desenvolveu-se este trabalho para estudar a potencial aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática em tripas naturais de suíno.

A estrutura desta dissertação iniciou-se com a Revisão Bibliográfica, onde foi efetuada uma contextualização teórica reunindo os principais conhecimentos publicados sobre o tema abordado, com ênfase nas características da tripa natural e na tecnologia de alta pressão hidrostática. Os objetivos foram especificados, justificando-se a necessidade de realização

do trabalho. A parte experimental foi descrita em relação a todas as metodologias e materiais utilizados para a execução da parte prática do trabalho, seguindo-se a apresentação de resultados e sua respetiva análise e discussão tentando, sempre que possível, comparar com as publicações de trabalhos desenvolvidos por outros autores no âmbito do mesmo tema. Nas Conclusões reuniram-se as elações principais que foram conseguidas a partir dos resultados obtidos no trabalho, apurando-se se a tecnologia de alta pressão hidrostática poderá ser implementada no processamento da tripa natural, sendo que nesta parte também se recomendam e propõem futuros trabalhos a realizar.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - A Relação entre as indústrias de triparia e salsicharia

O termo salsicharia inclui produtos de transformação cárnea, englobando não só os enchidos mas também outras carnes curadas, como os presuntos (Patarata, Esteves & Martins, 1998).

A indústria de salsicharia, devido à crescente produção, foi obrigada a adotar novas técnicas de fabrico e a procurar matérias-primas de menor custo para conseguir colocar no mercado um produto com um preço competitivo. Como na aquisição das matérias-primas a qualidade não pode ser descurada, torna-se necessário que a indústria de salsicharia seja capaz de negociar e ter uma boa relação com as indústrias fornecedoras dessas matérias. A indústria de triparia é uma das suas principais fornecedoras.

A valorização da tripa é conseguida através da indústria de salsicharia, de cordoaria, farmacêutica e de produção de farinhas para animais, sendo a de salsicharia a que mais se destaca. Sobre a produção e as trocas comerciais efetuadas com a tripa existe pouca informação.

A triparia pode ser uma indústria instalada fora do matadouro, mas surge por norma associada a este nos tratamentos primários e até secundários.

Em 1992, Fraqueza no seu estudo comprovou que, em Portugal, havia falta de equipamento especializado para o tratamento das tripas, fraca mecanização da secção da triparia e recolha das tripas em condições de higiene que não eram as mais favoráveis. Havia a juntar a todos estes fatores a concorrência da tripa artificial que, ao contrário da tripa natural, respondia às exigências de resistência do enchimento mecanizado e à produção em quantidade e qualidade.

Felizmente, notou-se que foram feitos esforços no sentido de valorizar os intestinos porque se chegou à conclusão que é um produto valioso e que pode envolver uma economia considerável, com lucro para as indústrias envolvidas. Várias foram as razões que contribuíram para o aumento da valorização dos intestinos, onde se destacam as seguintes:

- aumento da procura de enchidos cárneos tradicionais, onde a tripa natural é o invólucro preferido e eleito para garantia das características sensoriais dos enchidos (Patarata *et al.*, 1998);
- melhoria das técnicas de tratamento dos intestinos com mecanização de várias operações, o que aumentou o rendimento de produção, com conseqüente aumento da quantidade tratada de intestinos;
- melhoria das regras de higiene nos matadouros, resultando numa maior qualidade da tripa.

Convém salientar que a boa relação entre a indústria de salsicharia e a indústria de triparia é benéfica para ambas, pois a primeira beneficia por ter uma produção em quantidade e

qualidade de uma matéria-prima que é essencial para o produto final e a segunda garante a valorização do seu produto.

Em 1965, foi criada a INSCA (International Natural Sausage Casing Association), uma associação internacional que reúne indústrias que trabalham com tripa natural, abrangendo, inclusivamente, os fabricantes de equipamentos utilizados no seu processamento. A INSCA tem membros associados de várias nacionalidades. Este tipo de associações é de extrema importância para o crescimento das indústrias, pois reúne possíveis problemas e algumas ideias, o que pode contribuir para a sua inovação e desenvolvimento.

2.2. - Tipos de invólucros utilizados na indústria de salsicharia

Os invólucros utilizados na indústria de salsicharia são as tripas e estas podem classificar-se, quanto à sua origem, como: naturais, artificiais e sintéticas.

2.2.1 - Tripa Natural

A definição de tripa natural abrange diferentes tecidos de animais de talho que são utilizados na produção de invólucros, valorizados pela indústria de salsicharia e derivados do trato gastrointestinal: esófago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e bexiga (Ockerman & Hansen, 2000).

O intestino delgado abrange três porções distintas, o duodeno, o jejuno e o íleo, sendo que a diferenciação entre estes segmentos não é feita em triparia. Estes segmentos são aproveitados na maioria das espécies (Fraqueza, 1992).

O intestino grosso começa na válvula ileocecal e termina no ânus. Todo este segmento é, quase sempre, rejeitado (Fraqueza, 1992).

O tubo intestinal apresenta, histologicamente, quatro túnicas: serosa, muscular, submucosa e mucosa, sendo a serosa a camada mais externa e a mucosa a camada mais interna. Esta estrutura histológica do intestino é alterada após o processamento tecnológico efetuado com vista à sua utilização como invólucro de salsicharia, havendo eliminação da mucosa, seguida da eliminação da gordura, serosa e muscular por esmagamento e, subsequente, raspagem (Houben, Kakker & Keizer, 2005). A tripa natural pronta a ser utilizada pela indústria de salsicharia é constituída pela submucosa que é formada por uma folha cilíndrica de colagénio, bem como por componentes elásticos e é, estruturalmente, a camada mais importante do trato intestinal (Savic & Savic, 2002). Assim, a tripa no final dos tratamentos é formada basicamente por 90% de colagénio e 5% de elastina (Houben *et al.*, 2005).

As tripas naturais, de acordo com o método de conservação, podem ser apresentadas como frescas ou refrigeradas, salgadas e secas.

As tripas naturais frescas são refrigeradas a 2-4 °C quando se pretende fazer a sua utilização num curto espaço de tempo (três a oito dias).

As tripas naturais são salgadas quando se pretende fazer a sua conservação por um período mais prolongado (seis a oito meses). A salga pode ser efetuada de dois modos, salga a seco ou salga em salmoura (Fraqueza, 1992). Estas tripas antes de serem utilizadas têm de ser dessalgadas, devendo ser imersas em água. A duração desta imersão depende da espessura e da qualidade da tripa (Morgado, 1983). A salga é um dos métodos de conservação mais utilizados nas tripas naturais porque reduz a atividade microbiana, sem alterar as suas propriedades tecnológicas (Santos, Müller, Laurindo, Petrus & Ferreira, 2008). A qualidade microbiológica dos produtos salgados é aceitável, no entanto, por vezes, as tripas conservadas em sal seco podem deteriorar-se em qualidade, possivelmente devido ao desenvolvimento de microrganismos halófilos (Rust, 1988; Ockerman & Hansen, 2000). Quando as tripas salgadas são armazenadas a elevadas temperaturas, estes microrganismos podem produzir odores ou pigmentos não desejáveis (Rust, 1988).

Na secagem das tripas naturais utilizam-se dois métodos, secagem feita naturalmente ao ar livre ou secagem artificial em estufas com circulação de ar forçado (Fraqueza, 1992). Utiliza-se o método de secagem maioritariamente em tripas de bovino.

Devido ao desenvolvimento da indústria de salsicharia, onde se verificou um aumento na produtividade e uma evolução das técnicas utilizadas, a indústria de triparia necessitou de procurar novas formas de apresentação da tripa natural para facilitar a sua manipulação por parte da primeira indústria e, assim, surgiram as tripas coladas, as tripas cosidas, entre outras formas de apresentação (Fraqueza, 1992).

As tripas naturais podem ser usadas na produção de qualquer enchido fresco, fermentado ou cozido (Houben *et al.*, 2005).

Os produtos envolvidos por tripa natural apresentam um cheiro, um sabor e uma ligação de massa muito superiores aos que utilizam outro tipo de tripas. A digestibilidade da tripa natural é superior a qualquer outra (Morgado, 1983).

2.2.2 - Tripa Artificial e Tripa Sintética

As tripas artificiais, vulgarmente designadas por tripas de fibras animais ou tripas de colagénio, são constituídas por substâncias de origem animal reestruturadas por diversos processos. No fabrico destas tripas é utilizada como matéria-prima principal o colagénio, uma proteína de origem animal, extraída principalmente da parte interna da pele dos bovinos (Morgado, 1983)

As tripas sintéticas têm origem em substâncias orgânicas (celulose e derivados do petróleo) e dividem-se em dois tipos: tripas celulósicas e tripas plásticas.

As tripas celulósicas, de origem vegetal, apresentam poros de diâmetro muito reduzido.

As tripas plásticas são fabricadas por um processo de coextrusão, sendo combinadas várias camadas de diferentes polímeros num só filme. Estas tripas não podem ser ingeridas e são

destinadas a produtos que tenham de sofrer um processo de cozedura, como a mortadela (Morgado, 1983).

Comparativamente com as tripas naturais, as tripas artificiais e as sintéticas têm uma melhor qualidade higiénica, com menor probabilidade de contaminação microbiana dos produtos que as utilizam, não necessitam de um processo de conservação, não necessitam de refrigeração e podem ser armazenadas por um período mais longo (Kutas, 1987; Savic & Savic, 2002). Estes dois tipos de tripas apresentam um preço de mercado favorável, sem estar associado às variações sazonais como acontece com o das tripas naturais.

2.3 - Definição e comparação das aptidões tecnológicas dos diferentes tipos de invólucros

Na escolha do invólucro temos de considerar determinadas aptidões tecnológicas, de forma a obtermos um produto final com as propriedades funcionais e os atributos de qualidade que desejamos (Santos *et al.*, 2008). De entre essas aptidões tecnológicas, destacam-se a permeabilidade a gases e vapor, a resistência mecânica, a resistência térmica, a retratibilidade e a dimensão (Morgado, 1983).

A permeabilidade a gases e vapor de água da tripa é a capacidade que esta tem para se deixar atravessar por estes dois elementos, sendo esta capacidade fundamental nos produtos de salsicharia na fase de desidratação e fumagem (penetração de fumo).

Segundo Park e Chinnam (1995), a permeabilidade ao vapor de água pode variar com a espessura do material, devido a mudanças estruturais causadas pelo inchaço da matriz hidrófila, o que irá afetar a estrutura e provocar tensões internas que influenciam esta permeabilidade. É de notar que a espessura da tripa natural varia muito, até na mesma tripa, encontrando-se diferentes valores de espessura de acordo com a região do segmento considerada. A permeabilidade ao vapor de água influencia o período de vida útil dos enchidos cárneos que utilizam o invólucro, porque delimita a perda de água e o controlo de humidade (Santos *et al.*, 2008).

Na permeabilidade aos gases é necessário considerar o importante papel da temperatura, pois esta aumenta a energia cinética das moléculas gasosas, o que, conseqüentemente, aumenta a difusibilidade e solubilidade dos gases na tripa.

As irregularidades ou microfuros na superfície da tripa também influenciam a permeabilidade, conduzindo a uma taxa de permeabilidade maior (Santos, 2006).

As tripas naturais são caracterizadas pela sua elevada permeabilidade ao vapor de água, ao fumo e às gorduras (Savic & Savic, 2002). A tripa artificial é permeável, embora em menor grau, comparativamente com a natural. As tripas sintéticas plásticas são impermeáveis às gorduras, vapor de água e microrganismos (Morgado, 1983).

A resistência mecânica da tripa está associada à sua capacidade de desenvolver deformações reversíveis ou irreversíveis como resposta a forças externas, e é importante

considerá-la porque nos dá informações sobre a menor ou maior facilidade da tripa romper. As tripas devem ser suficientemente fortes para suportarem as pressões exercidas durante o processamento e o enchimento, mas também deverão ter elasticidade para armazenar a carne e serem, ao mesmo tempo, capazes de se expandir e retrair durante o enchimento e posterior tratamento térmico (Bakker, Houben, Koolmees, Binbrich & Sprehe, 1999; Ockerman & Hansen, 2000; Simelane & Ustunol, 2005).

São poucos os estudos sobre as propriedades biomecânicas da tripa e em apenas alguns deles se documenta a sua medição recorrendo a métodos objetivos (Benli *et al.*, 2008). Normalmente, para determinar a resistência física das tripas realizam-se testes de resistência à tensão e à pressão de rebentamento. Em medicina humana, a força de rutura e a pressão de rebentamento dos intestinos têm sido estudadas para monitorizar a cicatrização após cirurgias (Hendriks & Mastboom, 1990). É claro que os métodos desenvolvidos nesta área, se bem adaptados, podem contribuir para uma melhor compreensão das propriedades mecânicas do invólucro (Houben *et al.*, 2005).

Bakker *et al.* (1999) no seu estudo fizeram medições da resistência à pressão das paredes das tripas, enchendo-as com água, aumentando a pressão, até estas rebentarem. Os mesmos autores mediram a força máxima necessária para a rutura radial das tripas, com o objetivo de analisar a elasticidade durante o processo de enchimento.

As propriedades mecânicas em filmes plásticos são medidas por deformação de uma amostra e monitorização da força e deformação até que se dê a sua rutura (Okamoto, 1978). Para realizar esta medição utiliza-se um texturómetro e são vários os parâmetros que podem ser determinados, como a resistência à tensão, o alongamento, a força resultante e o módulo de elasticidade. A resistência à tensão é medida pela força máxima que o filme pode suportar até se dar a sua rutura. O alongamento (ϵ) é dado pela expressão $\epsilon = (L-L_0)/L_0$, onde L é o comprimento no momento da rutura e L_0 é o comprimento antes de sofrer a tensão, ou seja, esta medida representa o aumento do comprimento do filme com a tensão em relação ao seu comprimento inicial. A força resultante é a força de tensão na qual ocorre o primeiro sinal de deformação não elástica. Outro dos parâmetros que mede a resistência da tripa é o módulo de elasticidade, também chamado módulo de Young, que representa a constante de proporcionalidade entre a tensão e a deformação.

A medição da resistência física da tripa pode ser influenciada pelas diferentes direções da força aplicada, alguns estudos têm sugerido que é mais fácil a tripa romper na direção das fibras de colagénio do que transversalmente a estas fibras (Savic & Savic, 2002; Harper, Barbut, Lim & Marcone, 2012). Também foi descrito que as fibras de colagénio, quando a força é aplicada, podem reorganizar-se perpendicularmente à direção da força (Purslow, 1987). Se esta reorganização da tripa ocorrer da mesma forma em torno de um corte a propagação da rutura tornar-se-á mais difícil, independentemente da direção em que se deu o corte (Harper *et al.*, 2012).

É indesejável que os invólucros apresentem defeitos nas suas propriedades mecânicas porque estes, normalmente, estão associados à rutura durante o enchimento, ao deslizamento anormal sobre o canal da enchedora e, ao nível do consumidor, à insatisfação quanto à sua dureza (Houben *et al.*, 2005).

Na compra de invólucros, a indústria de salsicharia não tem acesso a qualquer especificação sobre as suas propriedades mecânicas (valores de força de tensão, pressão ao rebentamento, resistência ao corte, elasticidade, entre outros) e esta informação poderia ser bastante útil para a escolha do invólucro mais adequado, de acordo com o que pretendessem para o produto final (Harper *et al.*, 2012).

A resistência à tensão da tripa natural está relacionada com a quantidade de colagénio da submucosa (Savic & Savic, 2002). A tripa natural possui uma retractilidade impressionante, que não é comparável com nenhum outro tipo de tripa, porque por mais que o enchido desidrate a tripa retrai-se e faz corpo com a massa cárnea, não ficando a massa a “flutuar” dentro da tripa (Morgado, 1983).

As aptidões tecnológicas da tripa natural são influenciadas por vários fatores, como espécie, raça, idade do animal, dieta e outros fatores relacionados com os próprios animais ou com as condições onde eles cresceram (Benli *et al.*, 2008).

As tripas de porco e de ovino apresentam uma maior homogeneidade estrutural, sendo constituídas apenas pela submucosa e, portanto por fibras de colagénio puras. Nas de bovino, pelo contrário, encontram-se, além da submucosa, a muscular e uma camada residual da serosa. Isto demonstra que realmente existem diferenças inter-espécies da espessura da parede intestinal e do grau de união e de entrelaçamento das fibras de colagénio (Naghski, 1917; Fraqueza, 1992).

De um modo geral, as raças rústicas apresentam tripas mais resistentes e quanto mais velho for animal, mais resistente é a tripa e maior o seu calibre (Fraqueza, 1992).

No que diz respeito ao modo de alimentação dos animais, sabe-se que o fornecimento de alimentos no estado nativo aumenta a resistência da tripa. O sistema de produção intensivo associado ao desenvolvimento dos animais faz com que as tripas sejam mais frágeis e porosas. Também os animais doentes tendem a apresentar uma parede intestinal fragilizada (Fraqueza, 1992).

A tripa artificial é constituída por colagénio o que lhe confere uma grande resistência física, não deixando de ter a elasticidade pretendida. Esta grande resistência das tripas artificiais é adquirida através de soluções de endurecimento, nas quais estas tripas são mergulhadas durante o processo de fabrico e, por vezes, através da incorporação de fibras celulósicas (Fraqueza, 1992; Schulze & Reusse, 1976 citado por Harper *et al.*, 2012). Embora esta tripa seja muito utilizada pela indústria de salsicharia, não existem muitos estudos sobre as suas propriedades mecânicas (Harper *et al.*, 2012).

Para além de todas as características tecnológicas descritas anteriormente, é necessário garantir que as tripas estejam íntegras, não apresentem dilacerações, rasgões e buracos, nem defeitos e alterações visíveis. Ao contrário das tripas artificiais que têm uniformidade de calibre e que originam produtos homogêneos em termos de dimensões, as tripas naturais apresentam uma grande variabilidade de calibre e da capacidade de alongamento. Por estas razões, as tripas naturais devem ser previamente selecionadas e calibradas para termos garantia que o produto que a indústria de salsicharia receciona se apresenta nas condições desejadas. Tradicionalmente, para selecionar e calibrar as tripas é utilizado o teste de enchimento com água para as tripas de ovino e suíno ou com ar para as tripas de bovino. Deste modo, as tripas são enchidas com ar ou água e periodicamente expandidas sobre pressão para verificar o seu tamanho e qualidade, sendo cortadas e a sua qualidade confirmada (Wu & Chi, 2007).

As tripas artificiais têm substituído as naturais em algumas indústrias, enquanto outras continuam a defender o uso das naturais pois, apesar de todas as vantagens apresentadas pela tripa artificial, sabe-se, e já foi referido, que a tripa natural devido à sua própria estrutura, apresenta características técnicas, de elasticidade, retractilidade, resistência à tensão e pressão e, ainda, permeabilidade ao vapor e aos gases, muito difíceis de reproduzir em tripas artificiais (Rufino, 2003).

2.4 - Qualidade microbiológica da tripa natural

As tripas naturais frescas, salgadas e secas, devido ao seu teor microbiano elevado, podem aumentar o risco de contaminação dos enchidos cárneos que as usam como invólucros, com microrganismos patogénicos (Trigo & Fraqueza, 1998). Quando os produtos cárneos estão contaminados com microrganismos patogénicos nem sempre existem modificações nas suas características organolépticas, sendo consumidos sem qualquer tipo de suspeita dessa contaminação (Chalwa *et al.*, 2006). É importante ter consciência dos eventuais níveis de contaminação das tripas naturais e perceber até que ponto estes poderão afetar a saúde pública. Microrganismos patogénicos, como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.*, presentes nas tripas podem sobreviver em produtos cárneos fermentados e estes, maioritariamente, são consumidos crus (Houben, 2005). Assim sendo, é fundamental garantir a qualidade microbiológica das tripas naturais para que estas possam ser utilizadas como matérias-primas auxiliares na produção de enchidos, sem contaminarem o produto final. Para além disto, é necessário considerar que grandes contaminações microbiológicas condicionam a qualidade tecnológica da tripa, afetando sobretudo a resistência mecânica, porque a possível putrefação e todos os fenómenos proteolíticos associadas à atividade microbiana vão levar à fragilização da sua estrutura.

Os cuidados e as práticas empregues na manutenção da segurança das tripas têm de ser enquadrados no contexto do sistema de HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Points*),

onde têm de ser considerados os potenciais perigos físicos (presença de objetos estranhos como ossos, vidro, metal, entre outros), químicos (divididos em resíduos químicos provenientes do produto, como dioxinas, metais pesados, antibióticos, hormonas, entre outros, e em resíduos químicos introduzidos durante o processamento da tripa como corantes ou agentes de desinfecção e limpeza) e biológicos (bactérias, vírus, parasitas) (European Natural Sausage Casings Association [ENSCA], 2013). Devem-se identificar os principais pontos críticos que são pontos, fases operacionais ou procedimentos que devem ser controlados, de modo a eliminar um perigo ou a diminuir a probabilidade do seu aparecimento e, só assim, conseguiremos garantir o sucesso dos objetivos da implementação do plano HACCP (Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares [FIPA], 2000).

Relativamente aos perigos biológicos, para ser feita a correta identificação dos pontos críticos do processamento tecnológico da tripa convém ter-se conhecimento do perfil microbiológico das tripas naturais.

A contaminação das tripas naturais por microrganismos entéricos e exógenos é inevitável (Chawla *et al.*, 2006). Trigo e Fraqueza (1998) no seu estudo concluíram que a microbiota inicial das tripas naturais frescas de suíno e das de bovino secas era dominada por microrganismos aeróbios (7,6 e 6,6 log ufc/g), *Enterobacteriaceae* (7,5 e 3,6 log ufc/g), *Streptococci* fecais (4,6 e 2,76 log ufc/g) e esporos de *Clostridium* sulfito-redutores (1,7 e 3,3 log ufc/g). Bakker *et al.* (1999) obtiveram nas tripas de suíno e de ovino, respetivamente, contagens da ordem dos 6,3 e 5,9 log ufc/g para aeróbios totais. Byun, Lee, Jo & Yook (2001), também para as tripas de suíno e ovino, encontraram elevadas contagens de aeróbios (6,8 e 6,6 log ufc/g), *Enterococcus* (5,6 e 3,1 log ufc/g) e coliformes totais (5,5 e 3,9 log ufc/g). Todos estes estudos só demonstram que a qualidade microbiológica das tripas naturais usadas pela indústria de salsicharia é má (Chawla *et al.*, 2006).

Não existe nenhuma legislação específica que descreva os critérios microbiológicos quantitativos para as tripas naturais, no entanto, a ENSCA aprovou, em 1996, certas recomendações microbiológicas para tripas naturais salgadas, que estão apresentadas na Tabela 1, e estas foram incorporadas no plano HACCP do processamento das tripas (Fischer & Krol, 1997).

Tabela 1 - Recomendações microbiológicas para tripas frescas salgadas (ENSCA, 2013)

Espécie	Limite aceitável (log ufc/g)	Limite máximo (log ufc/g)
Aeróbios totais	<5	6,7
<i>Enterobacteriaceae</i>	<2	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	<2	3
Esporos de <i>Clostridium</i> sulfito-redutores	<2	3

É claro que a qualidade microbiológica depende da higiene dos procedimentos no matadouro e, posteriormente, da manipulação na triparia e, por isso, através da aplicação de regras de higiene adequadas consegue-se uma redução da população microbiana existente na tripa (Fraqueza 1992). Devemos considerar que a preparação deve ser feita em locais limpos, bem ventilados, desumidificados e refrigerados e garantir que é feita a eliminação completa da mucosa por raspagem.

Porém, apesar de todos estes cuidados e depois de vistos os resultados dos estudos realizados, verifica-se que a preparação tecnológica das tripas naturais não assegura a fiabilidade da sua qualidade microbiológica, sendo insuficiente para a total eliminação dos contaminantes microbiológicos. Esta qualidade microbiológica fica ainda mais comprometida sobretudo quando ocorrem acidentes ou descuidos durante o processamento, como as ruturas de intestinos com conseqüente conspurcação, procedimentos sem boas condições de higiene, má lavagem das tripas e quebras na refrigeração (Trigo & Fraqueza, 1998).

O fenómeno de adesão dos microrganismos à parede intestinal e a inclusão de microrganismos no muco da superfície da mucosa são alguns dos fatores que contribuem para a ineficácia das operações de processamento da tripa na eliminação dos microrganismos (Fraqueza, 1992).

Surge então a necessidade de adaptação de um processo físico ou químico que assegure a redução da carga microbiana inicial, com destruição de agentes patogénicos (Fraqueza & Trigo, 1998). É muito importante esta redução da carga microbiana inicial da tripa porque só assim conseguimos evitar alterações nas suas características ou possíveis contaminações dos enchidos cárneos (Morgado, 1983).

2.5 - Métodos inovadores no processamento da tripa natural

Tem sido estudada a eficácia da utilização de conservantes químicos, como os ácidos láctico, tartárico e cítrico, o peróxido de hidrogénio e o etanol, isolados ou combinados, para melhorar a qualidade microbiológica da tripa natural (Chawla *et al.*, 2006). Labie (1987) mostrou que a utilização de conservantes químicos origina efeitos adversos nas aptidões tecnológicas da tripa e surgem problemas de resíduos tóxicos. Normalmente, o efeito nas aptidões tecnológicas está associado à redução de pH, que resulta num aumento da permeabilidade ao vapor de água (Santos *et al.*, 2008).

Já Gabis & Silliker, em 1974, usavam salmoura com pH ajustado com ácido acético ou hidróxido de sódio para testar a eficácia na eliminação de *Salmonella* spp. das tripas naturais. Wijnker, Weerts, Breukink, Houben & Lipman (2011) mostraram no seu estudo que a nisina quando usada como conservante nas tripas é eficaz, verificando-se que tem poder sobre a germinação de esporos e no desenvolvimento das bactérias.

O fosfato também foi indicado como um aditivo adequado para adicionar no processamento da tripa natural, pois observou-se nas tripas tratadas com fosfato uma redução microbiana

acentuada, sem alteração das propriedades mecânicas (Bakker *et al.*, 1999; Wijnker, Bokhoven & Veldhuizen, 2009).

Benli *et al.* (2008) estudaram a eficácia da aplicação de ozono na preservação de tripas de suíno, tendo em conta o seu efeito sobre as características biomecânicas e microbiológicas. Os resultados indicaram que é necessária uma exposição ao tratamento com ozono muito prolongada para se dar a redução desejada dos microrganismos residentes, o que leva a uma diminuição da resistência mecânica da tripa e, por esta razão, a técnica foi rejeitada. Desta forma, concluímos que é necessário um método que garanta a qualidade microbiológica mas não afete negativamente a qualidade tecnológica da tripa natural.

O processamento das tripas por radiação também já foi considerado, sendo esta aplicação justificada pela melhoria da qualidade microbiológica e segurança em vários produtos alimentares que a utilizaram, pois consegue eliminar microrganismos como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* e *Listeria monocytogenes* (Farkas, 1998). A melhoria da qualidade microbiológica das tripas naturais frescas pela utilização de radiação foi comprovada (Trigo & Fraqueza, 1998; Byun *et al.*, 2001).

2.6 - Tratamentos atérmicos no processamento e conservação de alimentos

Ao longo dos tempos têm vindo a ser desenvolvidas uma série de tecnologias para garantir a segurança dos produtos alimentares. Os métodos convencionais, que normalmente sujeitam os alimentos a temperaturas elevadas, são responsáveis por alterar as suas características naturais e modificar as qualidades sensoriais (Omer *et al.*, 2010). Como exemplos destes métodos temos a pasteurização, a esterilização, a fumagem e a desidratação. Este tipo de tratamentos apresenta inconvenientes como a alteração da textura, a destruição de compostos diferenciadores de aroma, gosto e cor (perda de compostos termossensíveis, como as vitaminas) e a alteração do valor nutricional dos alimentos. Adicionalmente, têm ainda associados elevados consumos energéticos e elevado volume de efluentes.

Atualmente, a preocupação dos consumidores passa por adquirir produtos alimentares que sejam seguros, nutritivos, convenientes, atrativos (em aparência, textura, odor e sabor) e que tenham todas estas características naturalmente, sem considerar a incorporação de aditivos químicos (Mor-Mur & Yuste, 2003). Assim, surgiu a necessidade de desenvolver novas tecnologias, processos não térmicos que, em comparação com os térmicos, utilizam temperaturas de processamento baixas, consomem menos energia, induzem menos alterações sensoriais ao produto e asseguram inativação microbiana e enzimática (Veja-Mercado *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2008). Estes métodos têm vindo a ser usados eficientemente como substitutos ou complementos de tratamentos térmicos. A alta pressão hidrostática, o ultrassom, a irradiação, os campos elétricos de alta intensidade, os campos magnéticos oscilantes e a luz branca de alta intensidade são exemplos de tratamentos não

térmicos que estão a ser investigados para mostrar a sua potencial aplicação em produtos alimentares (Herrero & Avila, 2006). A aplicação destes métodos tem ganho destaque principalmente em alimentos com atributos e propriedades que sejam alterados pelo calor.

2.7 - Tecnologia de alta pressão hidrostática

A tecnologia de alta pressão isostática, ou hidrostática como é mais comumente conhecida, é o processo de conservação atérmico com maior desenvolvimento e aplicação industrial nos últimos vinte anos, sobretudo, devido ao grande potencial como alternativa à pasteurização térmica, pois os alimentos são “pasteurizados a frio” (Szerman *et al.*, 2011). O sucesso desta tecnologia está evidentemente relacionado com as vantagens da sua aplicação em alimentos. As vantagens da tecnologia de alta pressão hidrostática relatadas são as seguintes:

- obtenção de alimentos de grande qualidade, uma vez que não se verificam alterações nutricionais, sensoriais ou funcionais (Rastogi, Raghavaro, Balasubramanian, Niranjana & Knorr, 2007);
- garantia de alimentos seguros devido à destruição de microrganismos patogénicos, como *Salmonella* spp. e *Listeria* (Garriga, Grébol, Aymerich, Monfort & Hugas, 2004);
- extensão do período de vida útil e neste período a qualidade é mantida pois houve redução da microbiota deteriorativa (Garriga *et al.*, 2004);
- evita ou reduz a necessidade de utilização de conservantes químicos, conseguindo ir ao encontro da preferência dos consumidores por alimentos isentos de aditivos, alimentos naturais (Téllez-Luis, Ramírez, Pérez-Lamela, Vázquez & Simal-Gándarra, 2001);
- alimentos que não podiam ser tratados termicamente podem-no ser com esta tecnologia, o que evidencia a sua vantagem competitiva e a possibilidade de inovar na apresentação de outras formas alimentares (Clariana *et al.*, 2011);
- ao contrário dos tratamentos térmicos, o processo não depende do volume e da forma dos alimentos, o que permite processar grandes quantidades num curto espaço de tempo (Cheftel, 1995; Téllez-Luis *et al.*, 2001);
- reduzido impacto ambiental, pois são poucos ou nenhum os resíduos produzidos e apenas utiliza água (que pode ser reciclada) e eletricidade (Patterson, Ledward & Rogers, 2006).

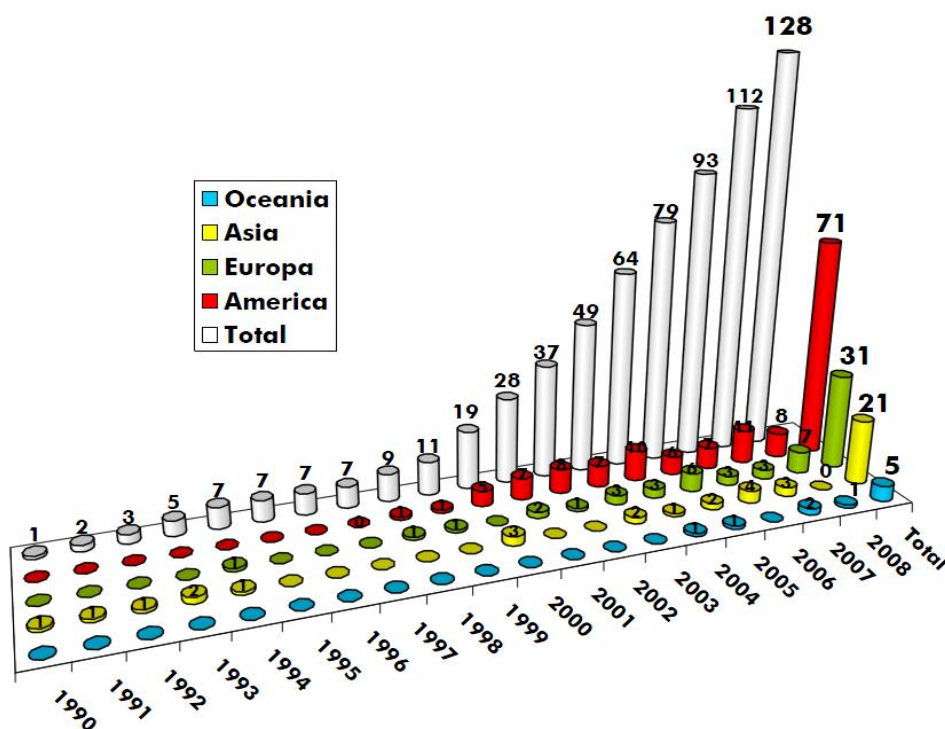
Para além de tudo isto, é preciso notar que esta tecnologia leva à inativação enzimática, fazendo com que não haja perda de vitaminas e açúcares (Hugas, Garriga & Monfort, 2002; Smelt, 1998). Assim sendo, a tecnologia de alta pressão é considerada promissora porque, comparativamente com os tratamentos térmicos, é melhor na conservação de micronutrientes, aparência e sabor dos alimentos, não se registando alterações das características organolépticas (Aymerich, Picouet & Monfort, 2008).

2.7.1 - Um pouco de história sobre a tecnologia de alta pressão hidrostática

As primeiras referências ao uso da tecnologia de alta pressão nos alimentos remontam a 1899 e foi Hite o primeiro a estudar o efeito deste processo. Este investigador demonstrou que o processamento dos alimentos com recurso a esta tecnologia poderia prolongar o seu período de vida útil, devido à inativação dos microrganismos (Farr, 1990).

Apesar de todas as vantagens que esta nova tecnologia parecia evidenciar, ela ficou adormecida até ao final da década de 80 do século XX, onde surge novo interesse pela sua aplicação no Japão e, assim, começou a ser usada na indústria alimentar (Suzuki, Kim, Tanji, Nishiumi & Ikeuchi, 2006). Neste país surgiu, em 1989, a primeira sociedade de desenvolvimento e descoberta da tecnologia de alta pressão. Depois também na Europa começaram a surgir instituições interessadas na tecnologia. São muitas as pesquisas realizadas até agora sobre a eficácia da sua aplicação a alimentos e estas têm levado ao aperfeiçoamento das técnicas utilizadas. Assim, estima-se que o principal problema da tecnologia de alta pressão hidrostática, o elevado custo dos equipamentos, possa ser ultrapassado com o aparecimento de equipamentos mais baratos e com a constatação de que se poupa energia devido ao seu baixo consumo energético. Na Figura 1 podemos observar a evolução do número de equipamentos adquiridos nos vários continentes, onde se verifica um claro investimento.

Figura 1 - Evolução da instalação de equipamentos de alta pressão hidrostática nos vários continentes no período de 1990 a 2008 (adaptado de http://www.doublefresh.eu/Workshop2apr09_Presentations/7Tonello.pdf)



No início dos anos noventa, surgiram no mercado japonês os primeiros alimentos processados com alta pressão, sumos e compotas de fruta (Téllez-Luis *et al.*, 2001). A França foi o primeiro país da UE a ter estes produtos disponíveis no mercado (Patterson *et al.*, 2006).

A tecnologia de alta pressão hidrostática tem sido aplicada a uma série de produtos alimentares numa escala comercial, a sumos, compotas, gelatinas, iogurtes, ostras, lagosta, camarão, entre outros (Lau & Turek, 2007). Só recentemente tem ganho popularidade nos produtos cárneos, graças à sua capacidade para reduzir os microrganismos patogénicos alimentares (Hayman, Baxter, O'Riordan & Stewart, 2004). Fatiados de presunto, fiambre de peru e de frango, assim como peças de presunto inteiras, são alguns exemplos de produtos cárneos processados por alta pressão que já estão à venda no mercado internacional.

Tem-se notado que a tecnologia de alta pressão hidrostática tem vindo a ser direccionada para alimentos prontos-a-comer, embalados e, alguns deles, fatiados, pois estes produtos são manuseados depois do processamento, podendo ser introduzida alguma contaminação pós-processamento devido a condições inadequadas de higiene do processo, equipamento e funcionários. Também alimentos com níveis muito reduzidos de conservantes, alimentos minimamente processados ou alimentos destinados a serem consumidos crus veem nesta tecnologia uma forma de garantir a segurança do consumidor e alargar o seu período de vida útil (Rendueles *et al.*, 2011).

2.7.2 - Equipamento utilizado na aplicação de alta pressão

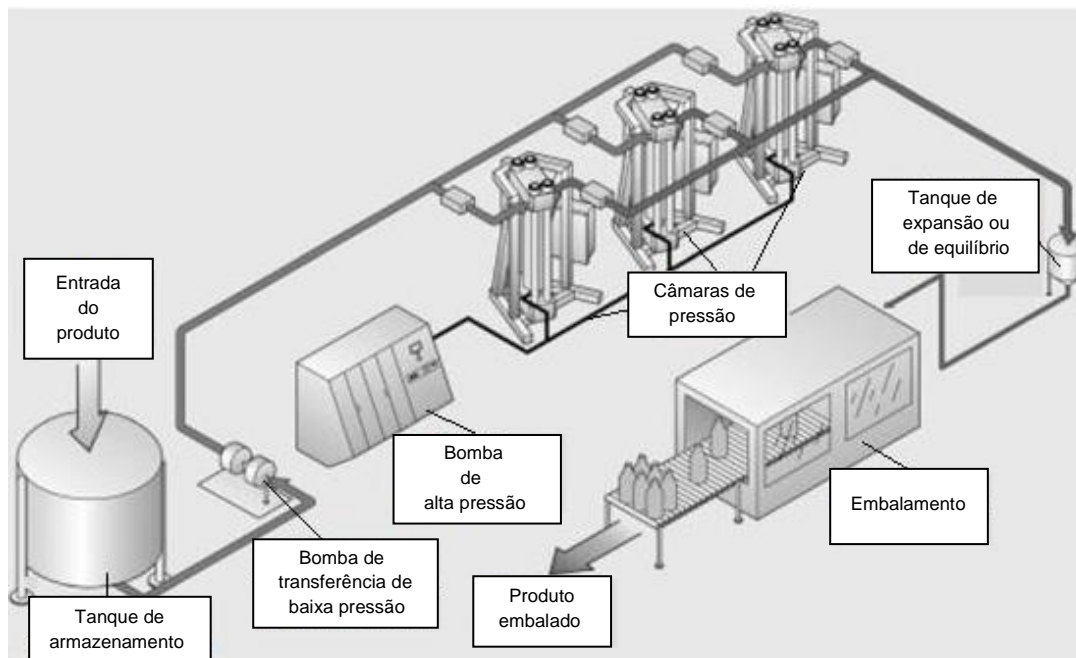
A maioria dos equipamentos de alta pressão adequados para a indústria alimentar foi desenvolvida no Japão, utilizando a experiência ganha noutras indústrias (Farr, 1990). Apareceram, assim, neste país indústrias responsáveis pela produção de equipamentos de alta pressão como, Mitsubishi Heavy Industries Ltd., Kobe Steel Ltd. e Nippon Steel Ltd. São também conhecidos outros produtores deste tipo de equipamentos, com destaque para os seguintes: Flow International Corporation (E.U.A), Engineered Pressure Systems International (Bélgica), ACB Pressure System-Alstom Hyperbar (França), UNIPRESS (Polónia), NC Hyperbaric (Espanha).

O equipamento de alta pressão usado na indústria alimentar funciona de forma descontínua ou semicontínua.

O equipamento semicontínuo combina três ou mais câmaras de pressão em paralelo, operando sequencialmente (Patterson *et al.*, 2006). Este equipamento processa alimentos líquidos não embalados, possibilitando que o processamento a alta pressão faça parte integrante do processo de produção, como pode ser observado na Figura 2. A pressão é exercida diretamente no produto (Herrero & Avila, 2006). São processadas grandes quantidades e o equipamento pode trabalhar por longos períodos sem que existam

paragens no processamento, no entanto, tem um custo de operação muito elevado (Patterson *et al.*, 2006).

Figura 2 - Representação esquemática do equipamento de alta pressão hidrostática semicontínuo (adaptado de Patterson *et al.*, 2006)



O processamento descontínuo é utilizado em alimentos sólidos ou líquidos, pré-embalados. Pelo facto de os alimentos se encontrarem embalados, não existe perigo destes serem contaminados por partículas provenientes do equipamento ou pelo fluido de pressurização (podendo, inclusivamente, o fluido ser reutilizado entre processos) e não existe necessidade de limpeza do equipamento quando se recomeça um novo ciclo de processamento (Télez-Luis *et al.*, 2001).

O equipamento descontínuo inclui uma câmara de pressão, um fluido de pressurização, responsável pela transmissão da pressão, e uma bomba para gerar pressão (Patterson *et al.*, 2006).

A água é o fluido mais utilizado porque possui baixa compressibilidade e maior compatibilidade com o alimento, havendo menor risco de contaminação. Outros fluidos podem ser utilizados, de acordo com a indicação de cada fabricante do equipamento, como óleos, agentes anticorrosivos ou antimicrobianos (Farkas & Hoover, 2000). Os primeiros equipamentos fabricados para laboratórios não eram de aço inoxidável e exigiam a utilização de óleos como meio de pressurização, porém esses fluidos apresentavam alto aquecimento durante a compressão e a qualidade final do alimento era afetada (Ting, Balasubramanian & Raghubeer, 2002).

Os alimentos devem ser embalados num material que impeça a entrada do fluido de pressurização e que consiga resistir à pressão aplicada. Embalagens com filmes laminados

de polietileno são as mais utilizadas, no entanto, pode ser utilizado outro tipo de embalagem desde que seja flexível, tenha capacidade de redução e expansão sem perder a integridade, pois o alimento tem o seu volume reduzido durante a pressurização e expansão equivalente durante a despressurização (Farkas & Hoover, 2000). Ao embalarmos o alimento temos de ter o cuidado de evitar a entrada de ar na embalagem ou, então, considerar o embalamento a vácuo, porque a compressão do ar no interior da embalagem pode reduzir a eficácia da pressurização (Herrero & Avila, 2006).

Na aplicação de alta pressão nos alimentos é geralmente usada uma temperatura entre os 10 e os 20 °C, porque abaixo de 10 °C o processo é considerado demasiado caro e acima de 20 °C é de evitar devido a possíveis efeitos térmicos provocados nos produtos, para além de que a maioria dos equipamentos industriais de alta pressão não tem opção de termostatização e funciona geralmente em salas refrigeradas (Serra *et al.*, 2007; Fulladosa, Serra, Gou & Arnau, 2009; Vercammen *et al.*, 2011).

O nível de pressão e o tempo de pressurização são controlados por um programa de computador (Han *et al.*, 2011).

Os equipamentos de alta pressão têm um custo muito elevado e a sua utilização, por isso, torna-se limitada a alimentos de valor acrescentado que compensem este processamento. Assim sendo, para que a tecnologia de alta pressão hidrostática possa ser empregue recorrentemente na indústria alimentar o custo dos equipamentos tem de ser mais baixo, o que deverá ser uma consequência do desenvolvimento tecnológico. Para além disto, há que considerar o desenvolvimento de equipamentos de maior capacidade, mais resistentes, mais automatizados, com melhor controlo da temperatura do processo e com uma higienização mais facilitada (Coelho, 2002).

2.7.2.1 - Princípios gerais do processo de alta pressão

O método da alta pressão hidrostática assenta em dois princípios gerais, o princípio de Le Chatelier e o princípio isostático ou Lei de Pascal.

Segundo o princípio de Le Chatelier, qualquer fenómeno (mudança de fase, mudança de conformação molecular ou reação química) que é acompanhado por uma redução de volume é favorecido pelo aumento da pressão, enquanto as reações de aumento de volume tendem a ser inibidas pela pressão. No caso de estarmos a considerar um sistema em equilíbrio, a pressão vai alterar esse equilíbrio na direção da redução de volume (Campos, 2003). Desta forma, uma das principais vantagens da utilização da tecnologia de alta pressão para processar alimentos é o não rompimento das ligações químicas covalentes, de baixa energia, as quais apresentam pequena compressibilidade devido à mínima distância entre os átomos envolvidos na ligação, ou seja, a redução de volume é mínima logo o rompimento destas ligações é inibido pela pressão (Cheftel, 1995).

O princípio isostático defende que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea a todo o produto, independentemente da sua forma e volume (Campos, 2003). Este princípio identifica também o processo de alta pressão como adiabático, existindo um aumento da temperatura uniforme e moderado durante a pressurização. A temperatura da água, o fluido de pressurização, aumenta, aproximadamente, 3 °C por cada 100 MPa, verificando-se igualmente este aumento de temperatura nos alimentos cuja constituição é maioritariamente água. Nos alimentos ricos em gordura verifica-se um aumento maior, de cerca de 8-9 °C por cada 100 MPa (Balasubramaniam, Farkas & Turkey, 2008). Ao contrário das outras formas de tratamento dependentes da convecção ou condução, como é o caso do processamento térmico, a alta pressão hidrostática consegue um efeito imediato e uniforme por todo o produto sem gradiente de temperatura e atingindo a pressão desejada no interior do produto em pouco tempo (Raso, Góngora-Nieto, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1998; Norton & Sun 2008; Bolumar, Skibsted & Orlie, 2012).

2.7.2.2 - Descrição do processo de produção de alta pressão

Numa primeira etapa do processo a câmara de pressão é carregada com o produto que vai ser pressurizado e depois é fechada. A câmara é preenchida pelo fluido de pressurização e o ar é removido por meio de uma bomba de baixa pressão que enche e drena, em combinação com um sistema automático de desarejamento, sendo depois gerada pressão (Ferreira, 2011).

A alta pressão pode ser gerada por três métodos distintos: pressurização direta, pressurização indireta e aquecimento do meio de pressurização.

No método de pressurização direta a pressão é produzida por pressurização de um meio com a parte terminal de um pistão de diâmetro pequeno. Este método permite uma pressurização muito rápida, no entanto, existe a limitação da câmara de pressão, daí não ser utilizado industrialmente, sendo o seu uso restrito a laboratórios (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

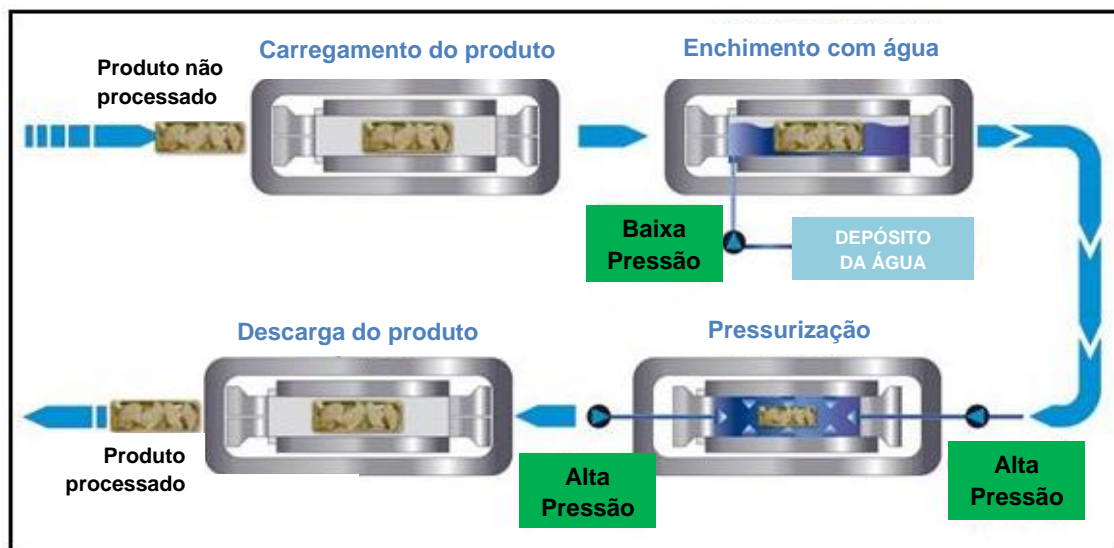
O método de pressurização indireta utiliza um intensificador de alta pressão para bombear o fluido de pressurização até à câmara de pressão. Este é o método utilizado pela maioria dos sistemas industriais de pressão (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

O método de aquecimento do meio de pressurização utiliza o aumento da temperatura para expandir o fluido de pressurização e, conseqüentemente, aumentar a pressão. Este método é, por isso, usado quando se combinam altas pressões e altas temperaturas. Porém, ele requer um controlo muito rigoroso da temperatura dentro da câmara de pressão (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

No final do processamento, a câmara é despressurizada com abertura de válvula que vai permitir que o fluido se expanda e volte à pressão atmosférica.

Na Figura 3 está esquematizado o processo da tecnologia de alta pressão hidrostática, onde podem ser observadas as etapas descritas anteriormente.

Figura 3 - Esquema ilustrativo do funcionamento de uma unidade de alta pressão (adaptado de <http://www.hiperbaric.com/es/alta-presion>)



2.7.2.3 - Sistemas de pressurização

Existem três sistemas de pressurização: sistema de pressão isostática a frio, a temperatura média e a quente.

O sistema de pressão isostática a frio (PIF) é uma técnica antiga, inicialmente empregue nas indústrias de metais, cerâmica e plásticos. Os níveis de pressão oscilam entre 50 e 600 MPa, os tempos de tratamento vão de 1 a 30 minutos e é realizado à temperatura ambiente. Na área de aplicação da indústria alimentar a técnica requer água potável, como fluido de pressurização, e o processamento requer tempos de tratamentos de 5 a 20 minutos, com níveis de pressão não inferiores a 400 MPa e não superiores a 900 MPa (Télliez-Luis *et al.*, 2001).

O sistema de pressão isostática a temperatura média é um processo que combina altas pressões com temperaturas que podem ir de 20 °C a 200 °C e é utilizado em situações em que a reação química tem lugar durante a pressurização (Barbosa-Cánovas, Pothakamury, Palou & Swanson, 1998).

O sistema de pressão isostática a quente (PIQ) é um processo que inicialmente foi empregue em indústrias de metais e cerâmica e que se caracteriza por o produto ser uniformemente aquecido e pressurizado. Utiliza níveis de pressão de 100 a 400 MPa em combinação com temperaturas muito altas, de 2000 °C ou mais, e o tempo do processo varia entre 6 e 12 horas. O meio de pressurização utilizado é um gás (argón, hélio e nitrogénio) ou ar (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998).

2.8. - Efeito da alta pressão sobre os microrganismos

Quando pensamos na inativação dos microrganismos pela alta pressão temos de considerar que a membrana da célula é o principal alvo da alta pressão (Ritz, Tholozan, Federighi & Pilet, 2002). Durante a pressurização, a dupla camada fosfolipídica da membrana celular é fortemente comprimida e na fase de despressurização a estrutura é perdida devido à formação de poros, havendo perda de material citoplasmático (Hoover, Metrick, Papineau, Farkas & Knorr, 1989; Shimada *et al.*, 1993). Assim, no processamento a alta pressão hidrostática, a permeabilização das membranas celulares provoca a morte microbiana, considerando que até níveis de pressão de 400 MPa grandes quantidades de material intracelular são perdidas e que acima desta pressão a perda é quase completa (Farr, 1990). Os mecanismos genéticos são também afetados pela alta pressão porque, devido à desnaturação proteica, existe inativação de enzimas fundamentais para o desenvolvimento e reprodução da célula, sendo inibidos os mecanismos de replicação, transcrição do ADN e tradução de proteínas, assim como são inibidas as reações produtoras de energia (Cheftel, 1995; Yuste, Capellas, Pla, Fung & Mor-Mur., 2001; Manãs & Pagán, 2005).

Então, podemos depreender que a alta pressão afeta vários locais da célula e várias funções e que a morte celular por pressão resulta da acumulação de múltiplos danos no interior da célula (Simpson & Gilmour, 1997).

Em algumas ocasiões, após o tratamento, as células com danos subletais podem ser reativadas caso existam condições apropriadas para a sua recuperação, como substratos ricos em nutrientes e temperaturas adequadas (Bozoglu, Alpas & Kaletunc, 2004; Bull, Hayman, Stewart, Szabo & Knabel, 2005). Por este motivo, as análises microbiológicas a alimentos processados por alta pressão devem considerar a presença de microrganismos lesados subletalmente, devendo ser utilizados meios de cultura não seletivos e ricos em nutrientes e temperaturas e tempos de incubação não limitantes para permitir a sua recuperação e posterior análise (Patterson *et al.*; 1995; Ulmer *et al.*, 2000 citados por Rendueles *et al.*, 2011; Ritz, Pilet, Jugiau, Rama & Federighi, 2006).

A maioria dos microrganismos consegue crescer a valores de pressões de 20 a 30 MPa. Os microrganismos que conseguem crescer a pressões entre 40 e 50 MPa chamam-se barófilos, os que não se desenvolvem entre 30 e 40 MPa chamam-se barófobos e os que crescem numa ampla gama de pressões (1-50 MPa) designam-se por euribáricos. Existem ainda os microrganismos barodúricos que conseguem sobreviver a pressões elevadas (50-100MPa), mas não conseguem crescer (Téllez-Luis *et al.*, 2001). Os microrganismos podem então variar a sua resposta à pressão, existindo não só diferenças entre espécies, mas também entre estirpes da mesma espécie (Galazka & Ledward, 1995 citado por Téllez-Luis *et al.*, 2001).

As bactérias Gram-negativas são as mais sensíveis ao processamento com alta pressão hidrostática, seguidas das leveduras, bolores e bactérias Gram-positivas. Os esporos e os vírus são muito resistentes a este processamento (Smelt, 1998).

Para *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* e bactérias ácido lácticas (BAL) verificou-se a sua redução com tratamentos de alta pressão. Destes apenas as BAL foram consistentemente encontradas para retomar o crescimento até números elevados durante o subsequente armazenamento no frio, isto, até mesmo considerando tratamentos com pressões de 600 MPa e armazenamentos a 2 °C. Os demais microrganismos referidos são eliminados nos tratamentos com pressões superiores a 400 MPa (López-Caballero, Carballo & Jiménez-Colmenero, 1999; Garriga *et al.*, 2004; Jofré, Aymerich, Grébol & Garriga, 2009). A principal conclusão dos estudos feitos até agora é que o tratamento com alta pressão a 600 MPa até 10 minutos em condições de refrigeração ou à temperatura ambiente pode reduzir consideravelmente a microbiota nos produtos alimentares e, assim, estender o seu período de vida útil, mas falha a eliminar bactérias a níveis residuais, que podem deteriorar o produto se forem capazes de crescer (Vercammen *et al.*, 2011).

Da degradação microbiana de alimentos ricos em proteínas e lípidos pode resultar proteólise, lipólise e putrefação. Assim, para que a tecnologia de alta pressão hidrostática seja bem-sucedida na indústria alimentar tem de ser capaz de eliminar os microrganismos responsáveis pela deterioração, de forma a prolongar o período de vida útil dos alimentos. Para além da eliminação dos microrganismos de deterioração, esta tecnologia tem de considerar a presença de alguns microrganismos patogénicos nos alimentos, sendo capaz de os inativar para garantir a segurança destes produtos.

Os microrganismos patogénicos que surgem frequentemente em produtos cárneos são *Salmonella enterica*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*, e são responsáveis por um grande número de doenças de origem alimentar na Europa (Ferreira, 2005).

Vários estudos indicam que nos produtos cárneos fermentados é necessário um tratamento a 600 MPa (5-10 min, 15-30 °C) para reduzir suficientemente o nível de microrganismos patogénicos e para impedir o seu crescimento durante o posterior armazenamento refrigerado (Aymerich, Jofré, Garriga & Hugas, 2005; Marcos, Jofré, Aymerich, Monfort & Garriga, 2008; Jofré *et al.*, 2009).

A *Listeria monocytogenes*, bacilo Gram-positivo, tem a capacidade única de entre os microrganismos patogénicos de crescer a temperaturas de refrigeração, tornando-se um microrganismo de grande preocupação nos alimentos prontos-a-comer (Farber & Peterskin, 1991; Kathariou, 2002). Bozoglu *et al.* (2004) e Ritz *et al.* (2006) observaram que as células de *Listeria monocytogenes* expostas à alta pressão (a níveis de pressão entre 400 e 600 MPa) eram capazes de recuperar e crescer ao longo do tempo, mas um número reduzido

deste microrganismo foi observado quando se aplicaram níveis de pressão elevados (superiores a 600 MPa) e a temperaturas de armazenamento baixas (4 °C). Bowman, Bittencourt & Ross (2008) sugeriram que o anel septal da membrana celular da *Listeria monocytogenes* é importante para a replicação celular e pode ser destruído pela alta pressão, no entanto, se este for regenerado pode resultar no crescimento renovado do agente patogénico.

A *Salmonella* spp., um microrganismo Gram-negativo, que se encontra no trato intestinal de uma grande variedade de animais, é inativada em produtos cárneos fermentados pela aplicação de alta pressão hidrostática a 400 MPa (Garriga *et al.*, 2005).

Um dos microrganismos patogénicos mais resistentes ao tratamento com alta pressão é o *Staphylococcus aureus* e a sua inativação por este processamento está altamente dependente da matriz alimentar (Hugas *et al.*, 2002; Jofré, Garriga & Aymerich, 2008; Jofré *et al.*, 2009).

Leveduras e bolores podem ser inativados a níveis de pressão entre 200 e 700 MPa (Garriga *et al.*, 2004). Normalmente, as leveduras não estão associadas a doenças transmitidas por alimentos, no entanto, são responsáveis pela deterioração devido à sua capacidade para crescer a níveis de a_w baixos e por tolerar concentrações relativamente elevadas de conservantes. As leveduras são relativamente sensíveis à alta pressão, pois a 100 MPa a sua membrana celular é afetada (Smelt, 1998; Patterson *et al.*, 2006). Certos bolores, ao contrário das leveduras, são toxinogénicos podendo representar um problema de segurança em produtos alimentares. As formas vegetativas de bolores são inativadas em poucos minutos usando 300 MPa a 25 °C. Há relativamente pouca informação sobre a sensibilidade à pressão das micotoxinas (Patterson *et al.*, 2006).

Os esporos bacterianos são muito resistentes ao calor e sobrevivem a muitos dos processamentos aplicados na indústria alimentar, mostrando também uma grande resistência à inativação por alta pressão (Rendueles *et al.*, 2011; Wijnker *et al.*, 2011). Cheftel (1995) indica que níveis de pressão superiores a 600 MPa combinados com altas temperaturas são necessários, pois alguns esporos são resistentes até 1000 MPa quando a temperatura não é mais alta do que 45-75 °C. *Bacillus amyloliquefaciens* forma esporos extremamente resistentes à alta pressão e tem sido sugerida a sua adoção como o organismo indicador no desenvolvimento de padrões para a eliminação de esporos pelos tratamentos de alta pressão hidrostática (Margosch *et al.*, 2004; Rajan *et al.*, 2006 citados por Rendueles *et al.*, 2011). Os mecanismos exatos de inativação de esporos não são conhecidos, mas existe a hipótese de que os esporos são primeiro ativados pela pressão, e os esporos germinados são, posteriormente, destruídos num novo ciclo de pressão. Esta destruição ocorre porque as células vegetativas resultantes da germinação de esporos são muito mais sensíveis à pressão e/ou calor (Télliez-Luis *et al.*, 2001). A inativação dos

esporos pela alta pressão é mais efetiva quando o valor de pH está perto da neutralidade do que a valores de pH extremos (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

A resistência dos vírus aos tratamentos de alta pressão varia até dentro da mesma estirpe e essas diferenças podem ser atribuídas às diferentes sequência de proteínas e à diversidade estrutural (Smelt, 1998). Os vírus encapsulados são geralmente mais sensíveis à pressão do que os vírus não encapsulados. O poliovírus parece ser o vírus mais resistente (Rendueles *et al.*, 2011).

2.8.1 - Fatores que influenciam o efeito da alta pressão sobre os microrganismos

A eficácia da aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática sobre a inativação microbiana é influenciada por vários fatores que estão relacionados com os próprios microrganismos, com o processo tecnológico ou com as características dos alimentos. Normalmente, diz-se que a eficácia do processo depende de fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento. Por fatores intrínsecos entendem-se as características físico-químicas do próprio alimento e incluem pH, a_w , potencial de oxidação-redução, estrutura física, nutrientes disponíveis e presença de agentes antimicrobianos. Os fatores extrínsecos dizem respeito às condições ambientais em que são mantidos os alimentos antes e durante o processo, o que engloba o nível de pressão, a temperatura e o tempo de tratamento, assim como o tipo e a quantidade de microrganismos presentes no alimento e os métodos de conservação utilizados.

Quando pensamos na aplicação de alta pressão é importante considerar todas as variáveis que podem interferir na eficácia do tratamento, assim, a seguir fica a enumeração de vários aspectos que temos de analisar dependendo das condições com que trabalhamos:

- A alta pressão hidrostática tem um efeito destruidor nos organismos com grande complexidade organizacional e estrutural (Rendueles *et al.*, 2011). Assim, as formas vegetativas de eucariotas (leveduras e bolores) são mais sensíveis à pressão do que os microrganismos procariotas (Hoover *et al.*, 1989; Smelt, 1998; Garriga *et al.*, 2004).
- De acordo com a morfologia celular das bactérias, a forma de cocos apresenta maior resistência mecânica do que a forma de bacilos, evidenciando maior resistência sob alta pressão (Yuste *et al.*, 2001).
- Os microrganismos psicrófilos, adaptados a crescer a baixas temperaturas, são mais resistentes às altas pressões devido aos elevados níveis de ácidos gordos polinsaturados na sua membrana, o que confirma, que as membranas ricas em ácidos gordos insaturados são responsáveis pela resistência ao tratamento com alta pressão (Smelt, 1998; Casadei, Manas, Niven, Needs & Mackey, 2002).
- A alta pressão é muito efetiva na redução ou eliminação de bactérias Gram-negativas (*Enterobacteriaceae*, *E.coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*), enquanto as Gram-positivas (*BAL*, *Staphylococcus*, *Enterococci*, *Listeria monocytogenes*) são mais resistentes à pressão

(Smelt, 1998; Hugas *et al.*, 2002). Esta diferença deve-se à estrutura da parede celular. A parede celular das Gram-negativas é complexa, com membrana externa e interna e uma camada fina de peptidoglicano entre estas duas membranas. A parede das bactérias Gram-positivas é composta por uma única camada de peptidoglicano, mas é mais espessa e rígida do que a das Gram-negativas (Patterson *et al.*, 2006). As células com membranas mais rígidas são mais resistentes à alta pressão (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

- O estado fisiológico da população microbiana influencia a resistência à alta pressão (Rendueles *et al.*, 2011). Os microrganismos na fase de crescimento estacionário são mais resistentes do que na fase exponencial (Smelt, 1998; Hugas *et al.*, 2002). Na fase estacionária as bactérias sintetizam novas proteínas que protegem as células contra condições adversas (Patterson *et al.*, 2006).
- O grau de inativação microbiológica é menor a temperaturas ótimas de crescimento em comparação com as altas ou baixas temperaturas (Hugas *et al.*, 2002).
- Segundo Smelt (1998), os microrganismos resistentes ao calor são, em geral, também mais resistentes à pressão.
- A microbiota endógena do alimento é mais resistente à pressão do que os microrganismos previamente selecionados e inoculados no alimento (*starters*) (Cheftel, 1995; Cheftel & Culioli, 1997; López-Caballero, Carballo, Solas & Jiménez-Colmenero, 2002).
- As células sujeitas a condições adversas, que não seja a pressão (elevadas concentrações de sal, condições muito ácidas, *stress* oxidativo, entre outras), podem tornar-se mais resistentes à pressão, isto porque ocorre síntese de proteínas que protegem contra essas adversidades, aumentando a sua resistência (Hugas *et al.*, 2002; Considine, Kelly, Fitzgerald, Hill & Sleator, 2008).
- A exposição a baixas temperaturas antes do processamento aumenta nas membranas celulares a percentagem de ácidos gordos polinsaturados e, conseqüentemente, aumenta a resistência à alta pressão. Pelo contrário, as células que já suportaram uma lesão subletal (por exemplo, devido a tratamentos térmicos, processos de congelação ou irradiação) tornam-se mais suscetíveis à pressão (Rendueles *et al.*, 2011).
- As temperaturas de processamento baixas diminuem a resistência à pressão por causa das alterações na estrutura e fluidez da membrana, resultantes do enfraquecimento de interações hidrofóbicas e da cristalização de fosfolípidos (Cheftel, 1995). O aquecimento moderado (40-60 °C) pode também melhorar a inativação microbiana pela pressão, podendo-se neste caso reduzir o nível de pressão aplicada (Carlez, Rosec, Richard & Cheftel, 1993).
- A presença de microrganismos em ambientes ricos em nutrientes aumenta a resistência à pressão, daí a composição química do alimento influenciar a eficácia da tecnologia de alta pressão. Hidratos de carbono, proteínas, vitaminas e minerais oferecem maior proteção aos

microrganismos e podem permitir uma recuperação mais facilitada das células danificadas (Simpson & Gilmour, 1997; Patterson *et al.*, 2006)

- A acidez do alimento intensifica o efeito da alta pressão. A sobrevivência de células danificadas pela pressão é muito reduzida em ambientes ácidos (Patterson *et al.*, 2006). De assinalar também que a aplicação de alta pressão provoca uma redução do pH devido ao favorecimento da ionização (Hoover *et al.*, 1989).
- A redução da a_w aumenta a resistência dos microrganismos à alta pressão hidrostática (Cheftel & Culioli, 1997). Assim, valores inferiores a 0,90 conferem um efeito baroprotector independentemente dos solutos (sacarose, glucose ou NaCl) que são utilizados na desidratação dos alimentos (Rendueles *et al.*, 2011). Por outro lado, microrganismos danificados por pressão são geralmente mais sensíveis à baixa a_w e a sua recuperação pode ser inibida por esta (Smelt, 1998; Norton & Sun, 2008).
- Os alimentos que possuem acidificantes, antioxidantes ou bacteriocinas fazem com que os microrganismos fiquem mais suscetíveis ao tratamento de alta pressão (Yuste *et al.*, 2001). Adicionalmente, tem sido reportado que certos ingredientes, tal como o lactato, podem proteger os microrganismos patogénicos contra a alta pressão, em presunto e em fiambre, o que deve ser tomado em conta nos produtos cárneos reformulados, onde o lactato de potássio é usado como substituto do NaCl (Jofré *et al.*, 2008; Stollewerk, Jofré, Comaposada, Arnau & Garriga, 2012).
- Tratamentos com níveis de pressão e tempos elevados aumentam o número de microrganismos inativados por alta pressão. Normalmente, esta inativação segue uma cinética de primeira ordem, embora às vezes se verifiquem alguns desvios de reações, transformando-se numa de segunda ordem (Sangronis *et al.*, 1997).
- O tempo dos ciclos de pressurização e despressurização influenciam a inativação cinética dos microrganismos. Smelt (1998) reconheceu que a pressurização rápida poderia contribuir para a inativação de células vegetativas, ao passo que a pressurização lenta poderia induzir uma resposta de *stress* e, conseqüentemente, tornar a inativação menos efetiva. Propôs ainda que existem microrganismos, como as leveduras, que são sensíveis à despressurização rápida porque o vacúolo da célula pode nas condições desta despressurização colapsar. Vários autores identificaram a rápida despressurização como mais efetiva na eliminação de bactérias vegetativas do que a despressurização lenta (Hayakawa *et al.*, 1998; Noma *et al.*, 2002 citados por Syed *et al.*, 2012).

2.9 - Efeitos da alta pressão nas características químicas do alimento

Já foi visto que a utilização de alta pressão hidrostática no processamento de alimentos conduz à parcial inativação dos microrganismos, assim como de enzimas. Este processamento leva igualmente a alterações na estrutura das principais substâncias que

constituem o alimento (água, proteínas, lípidos, vitaminas, hidratos de carbono, entre outros).

Pelo facto de existir uma grande diversidade de efeitos sobre as mais variadas composições alimentares, torna-se necessário enfatizar a importância de se realizar os trabalhos de investigação com matrizes alimentares reais porque, só assim, os resultados obtidos podem ser extrapolados e aplicados a situações reais, contribuindo para a evolução do conhecimento na área da tecnologia de alta pressão hidrostática aplicada ao processamento dos alimentos (Garriga *et al.*, 2004).

2.9.1 - Efeito da alta pressão sobre as proteínas

O processamento de alimentos com alta pressão hidrostática provoca alterações na sua componente proteica. Estas alterações são resultado da despolimerização, solubilização, desnaturação, agregação e gelatinização das proteínas. A extensão dessas alterações depende da proteína, do nível de pressão, da temperatura a que a pressão é aplicada e do tempo de processo (Cheftel, 1995; Cheftel & Culioli, 1997; Hugas *et al.*, 2002).

A alta pressão hidrostática causa desnaturação das proteínas, desorganizando a estrutura secundária, terciária e quaternária, porque estas estruturas são mantidas através de ligações não covalentes, suscetíveis aos efeitos da alta pressão, nomeadamente por ligações de hidrogénio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (Mozhaev, Heremans, Frank, Masson & Balny, 1996; Hendrickx, Ludikhuyze, Van den Broeck & Weemaes, 1998). As ligações covalentes permanecem intactas e, conseqüentemente, a estrutura primária das proteínas não é afetada, o que é considerada uma característica única e vantajosa deste tratamento em comparação com os tratamentos térmicos, pois, deste modo, os efeitos das reações de *Maillard* e o aroma a cozido não aparecem nos alimentos, o que é de extrema importância para a manutenção do seu sabor natural (Considine *et al.*, 2008).

As estruturas oligoméricas, que são as mais complexas, começam a dissociar-se a 200 MPa, estando a desnaturação proteica associada a níveis de pressão compreendidos entre os 400 e 600 MPa (Han, 2007).

Devido à desnaturação proteica descrita, os tratamentos de alta pressão veem a sua aplicação questionada em alimentos ricos em proteínas como ovos, carne ou peixe. Focando-nos na carne, podemos afirmar que a alta pressão perturba as funcionalidades das proteínas pois provoca desnaturação das proteínas miofibrilares (principalmente das cadeias pesadas de miosina) a níveis de pressão entre 300 e 400 MPa, das proteínas sarcoplasmáticas (com alteração na quantidade de mioglobina) a níveis superiores a 400 MPa, no entanto, as proteínas do tecido conjuntivo, como o colagénio, a reticulina e a elastina, não são alteradas (Carlez, Veciana-Nogues & Cheftel, 1995; Jung, Ghoul & Lambllerie-Anton, 2003; Neto, Rosenthal & Gaspar, 2011).

A desnaturação proteica pode ser considerada benéfica em algumas situações porque aumenta a digestibilidade de alguns alimentos submetidos à alta pressão.

As mudanças conformacionais da estrutura proteica pela aplicação de alta pressão hidrostática foram sugeridas como responsáveis por um aumento de pH do meio por expor os aminoácidos mais básicos à superfície da estrutura (Ramirez & Morrissey, 2006; Fulladosa *et al.*, 2009).

As enzimas, que são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas, são afetadas pela desnaturação proteica causada pela alta pressão, pois esta desnaturação provoca mudanças conformacionais que alteram a funcionalidade da enzima (por exemplo, aumento ou perda da atividade biológica, mudanças na especificidade do substrato) (Campos, 2003).

A níveis de alta pressão moderados (100 a 200 MPa) existe ativação de algumas enzimas monoméricas, mas a níveis mais elevados ocorre a inativação (Hendrickx *et al.*, 1998). Em relação às enzimas envolvidas na tenderização da carne temos as calpaínas, que degradam as proteínas miofibrilares, as catepsinas, que degradam proteínas miofibrilares e do tecido conjuntivo e as calpastatinas, que inibem as calpaínas. O processamento a alta pressão da carne, a níveis de pressão entre 200 e 300 MPa, aumenta a liberação de catepsinas, aumenta a atividade de calpaínas (pelo aumento da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático) e inibe as calpastatinas, o que resulta na tenderização da carne (Neto *et al.*, 2011). Acima de 400 MPa, Ma & Ledward (2004) reportaram uma diminuição desta tenderização, o que parece sugerir uma inativação induzida pela pressão das enzimas em questão.

Vários estudos têm mostrado que a inativação de enzimas indesejáveis é relevante para evitar o escurecimento, a exsudação e a perda de nutrientes, principalmente em alimentos vegetais (Préstamo & Arroyo, 1998). Também são vários os estudos que têm demonstrado que a inativação enzimática é o ponto fraco da tecnologia de alta pressão, pois o estabelecimento do nível de pressão adequado para se dar esta inativação ainda não está otimizado (Hoover *et al.*, 1989). As enzimas com importância na deterioração de alimentos são relativamente resistentes à pressão e a sua inativação completa é difícil de conseguir. Por exemplo, as enzimas responsáveis pelo escurecimento de frutas e vegetais (polifenoloxidasas), necessitam de pressões de 800 MPa ou mais para a sua inativação completa (Patterson *et al.*, 2006). A acrescentar a este ponto crítico há ainda a existência de substâncias que servem de proteção para a enzima, dificultando a sua inativação pela alta pressão, como é o caso de elevadas concentrações de açúcar (Seyderhelm, Boguslawski, Michaelis & Knorr, 1996).

2.9.2 - Efeito da alta pressão sobre os lípidos

Os lípidos também são afetados pela pressão, pois esta altera o seu estado físico, com aumento do ponto de fusão e formação de cristais densos e estáveis. Graças à cristalização há alteração da estrutura dos lípidos, o que afeta a permeabilidade da membrana celular das células (Cheftel & Culioli, 1997).

Quando a oxidação lipídica ocorre nos alimentos, sobretudo naqueles ricos em gorduras polinsaturadas como a carne, há decomposição dos lípidos e produção de compostos voláteis, ocorrendo alterações sensoriais e diminuição do valor nutricional.

São vários os mecanismos que têm sido propostos para explicar a oxidação lipídica induzida pela pressão, mas muitos deles ainda permanecem pouco claros. A libertação de ferro pelas hemoproteínas e a rutura da membrana são os principais mecanismos propostos.

Recentemente, foi descoberta a formação de radicais livres na carne durante os tratamentos de alta pressão (Bolumar *et al.*, 2011; Mariutti *et al.*, 2008 citados por Bolumar *et al.*, 2012). Estas moléculas de vida curta e altamente reativas são promotoras da oxidação lipídica. Os radicais são gerados numa fase precoce da oxidação lipídica e se houver oxigénio disponível na embalagem a fase de propagação pode prosseguir e, deste modo, ocorre um aumento do nível de oxidação. São necessárias investigações voltadas para a quantificação dos radicais gerados na carne processada por alta pressão para determinar os parâmetros que conduzem à formação destes radicais e otimizar ainda mais as condições de processamento, de forma a empregar corretamente as medidas preventivas.

Bolumar *et al.* (2012) encontraram um limiar de pressão de cerca de 400 MPa para a formação de radicais na carne. Este facto indica, como seria de esperar, uma ligação coerente entre a formação de radicais entre 400 e 800 MPa e a oxidação lipídica induzida pela alta pressão.

Estudos que comparam a oxidação lipídica do processamento térmico com a do processamento a alta pressão hidrostática mostram que no primeiro a peroxidação lipídica pode ser explicada por mecanismos semelhantes aos propostos para a alta pressão: rutura da membrana, inativação das enzimas antioxidantes e libertação do ferro da mioglobina (Min & Ahun, 2005 citado por Bolumar *et al.*, 2012). Os processos industriais de aplicação de alta pressão têm um tempo de duração (5-10 min) mais curto do que o tratamento térmico (> 15 min), logo a quantidade de radicais no primeiro processo (660-700 MPa) é menor do que a esperada no segundo (65-75 °C), assumindo que ambos têm taxas de reação da mesma ordem. No entanto, não podemos esquecer que os produtos pressurizados têm uma grande quantidade de radicais. Quanto maior for a pressão, a temperatura e a duração do tratamento, maior a formação de radicais, especialmente acima de 600 MPa, e, assim, a otimização destes três parâmetros é importante para impedir a oxidação de lípidos pela alta pressão (Bolumar *et al.*, 2012).

A oxidação lipídica induzida pela pressão tem limitado a aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática à carne e a produtos cárneos, sendo apontada como solução a utilização de antioxidantes ou de embalagens que evitem este efeito. Também a remoção de oxigênio e a adição de dióxido de carbono têm sido apontados como úteis para impedir essa oxidação (Suzuki *et al.*, 2006).

2.9.3 - Efeito da alta pressão sobre os hidratos de carbono

Não existem muitos estudos sobre a avaliação do efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática nos hidratos de carbono.

Os monossacáridos, como a glucose, que são hidratos de carbono simples, não são alterados a níveis de pressão entre 100 e 1000 MPa (Ogawa, Fukuhisa & Fukumoto, 1992). Os monossacáridos podem ligar-se uns aos outros e formarem oligossacáridos ou polissacáridos. Já vimos, anteriormente, que as ligações covalentes não são afetadas pela alta pressão. A sacarose e a lactose são exemplos de dissacáridos, os oligossacáridos mais simples. A partir de dez unidades monoméricas os hidratos de carbono designam-se polissacáridos e como exemplos temos o amido, a celulose e o glicogénio. Os polissacáridos têm um importante papel na textura dos alimentos. Hugas *et al.* (2002) afirmam no seu trabalho que os açúcares na carne e nos produtos cárneos não são modificados pela alta pressão, no entanto, os polissacáridos podem ser. A gelatinização do amido é promovida pela alta pressão, mas a formação do gel é inibida porque, ao contrário dos processos térmicos, a pressurização leva ao aumento do tamanho dos grânulos de amido sem os romper, o que mantém a sua estrutura. Assim, para além desta vantagem, verifica-se que os amidos pressurizados são melhores digeridos pelas enzimas amilolíticas, como a amilase.

2.9.4 - Efeito da alta pressão sobre a água do alimento

A água é um dos principais constituintes do alimento, por isso importa perceber qual o efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática sobre esta.

Como já foi visto anteriormente, a pressão provoca alterações na matriz proteica, existindo modificações na interação entre as proteínas e as moléculas de água, o que conduz a uma redistribuição da água em todo o alimento (Møller *et al.*, 2011). No caso da carne, as proteínas miofibrilares, principalmente miosina e actina, são os principais componentes de ligação de água no tecido muscular (Offer & Knight, 1988 citado por Vaudagna *et al.*, 2012). Kim, Lee, Lee, Kim & Yamamoto (2007) reportaram uma redução da capacidade de retenção de água na carne de bovino a níveis de pressão entre 200 e 500 MPa, mas a níveis inferiores a 100 MPa não observaram diferenças nessa capacidade entre as amostras tratadas e as de controlo. Adicionalmente, Marcos, Kerry & Mullen (2010) sugerem que a desnaturação induzida pela pressão das proteínas sarcoplasmáticas pode influenciar em

certa medida a perda da capacidade de retenção de água em carnes pressurizadas. Quando a alta pressão hidrostática é aplicada a amostras congeladas há uma redução da perda de água comparativamente com as amostras pressurizadas que não foram congeladas, provavelmente, devido à mobilidade reduzida da água congelada e à minimização da desnaturação das proteínas miofibrilares induzida pela pressão (Fernandéz *et al.*, 2007).

Tem sido sugerida a aplicação da tecnologia de alta pressão para atenuar os inconvenientes da congelação de alimentos. A pressão diminui o ponto de congelação da água, sendo este de -20 °C a 200 MPa (Hogan, Kelly & Sun, 2005). Assim, surgem alimentos conservados a temperaturas sub-zero, sem congelação da água. Como vantagens desta aplicação temos: minimização da desnaturação proteica; redução da entalpia de cristalização e conseqüente diminuição da transição de fase; ausência de formação de cristais de gelo ou formação de cristais de tamanho reduzido o que causa danos mínimos sobre a estrutura da célula, contrariamente ao que acontece com o processo de congelação isolado, onde os cristais de gelo podem perfurar as paredes celulares. Deste modo, a alteração de parâmetros de qualidade como a textura, a cor, bem como as perdas por exsudação pela congelação são reduzidas (Hogan *et al.*, 2005; Yaldagard, Mortazavi & Tabatabaie, 2008).

2.9.5 - Efeito da alta pressão sobre os micronutrientes do alimento

O processamento a alta pressão dos alimentos, porque não afeta as ligações covalentes, mostra um efeito mínimo sobre as moléculas de baixo peso molecular, como as vitaminas, pigmentos, antioxidantes e muitos dos compostos responsáveis pelo sabor e aroma (Pandurangi & Balasubramaniam, 2005), isto em comparação com os convencionais tratamentos térmicos. Assim sendo, a tecnologia de alta pressão hidrostática é sugerida pela sua capacidade de manter o sabor e aroma natural dos alimentos, o que é uma das exigências dos consumidores.

2.10 - Efeito da alta pressão nas características físicas do alimento

A tecnologia de alta pressão hidrostática tem efeitos diferenciais sobre os constituintes químicos do alimento. As alterações nesses constituintes conduzem, por sua vez, a mudanças nas propriedades físicas dos alimentos (textura, viscosidade, consistência, entre outros), estando até reportado por alguns autores que o principal efeito da alta pressão nos alimentos está relacionado com a textura. A textura é um dos fatores principais na definição de qualidade do alimento e pode ser determinante na aceitabilidade do consumidor. É de difícil definição, mas entende-se como o conjunto de propriedades físicas, percebidas sensorialmente, e resulta da estrutura interna do material, que por sua vez é determinada pelas interações moleculares dos seus constituintes. Destacando o efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática sobre a textura da carne, concluímos que o principal fator

responsável pela alteração da textura induzida pela pressão não está relacionado com a componente conjuntiva, mas sim com a integridade das miofibrilas, devido às modificações estruturais das proteínas miofibrilares contrácteis (Jung, Lamballerie-Anton, Taylor & Ghok, 2000).

O processamento a alta pressão têm vindo a demonstrar o seu contributo na tenderização da carne pois pode reduzir o tempo para alcançar as características desejadas de textura com redução no custo de energia, espaço e mão-de-obra comparativamente com os processos convencionais (Neto *et al.*, 2011). No músculo em *pré-rigor* leva ao aumento da contração e da libertação de cálcio, acelerando a glicólise, o que permite uma redução imediata do pH (Macfarlane, McKenzie, Turner & Jones, 1982). No músculo *post-mortem*, na fase de maturação, a pressões de cerca de 200 MPa ocorre a rutura dos lisossomas, com libertação de enzimas lisossomais (catepsinas), o que promove o aumento da atividade autolítica e, conseqüentemente, a tenderização da carne é acelerada (Lamballerie-Anton, Taylor & Culioli, 2002).

2.10.1 - Efeito da alta pressão sobre a cor do alimento

A cor é um dos principais atributos do alimento que influencia a escolha e aceitação pelos consumidores e, como tal, torna-se necessário estudar o efeito de uma nova tecnologia sobre este ponto crucial. Por este motivo, focam-se, em seguida, algumas conclusões de estudos realizados sobre o efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática na cor da carne. Para fazer a determinação da cor normalmente utiliza-se um espectrofotómetro e são avaliados os parâmetros L* (índice de refletância ou luminosidade), a* (medida da intensidade de vermelho ou verde) e b* (medida da intensidade de amarelo ou azul).

Antes de nos focarmos no efeito da alta pressão sobre estes parâmetros, é necessário recordar que as alterações diferem consoante estivermos a considerar a aplicação de alta pressão em produtos cárneos frescos ou fermentados. Assim, os produtos cárneos fermentados, que têm na sua constituição nitrato e nitrito de sódio, apresentam estabilidade na cor porque nestes há a transformação de mioglobina em nitrosilmioglobina e, posteriormente, pelo tratamento térmico, a última transforma-se em nitrosohemocromo (composto altamente estável devido à formação de ligações covalentes). Estes dois pigmentos, ao contrário da mioglobina, não são afetados pela pressão (Carlez *et al.*, 1995; Cheftel & Culioli, 1997). Na carne fresca o processamento a alta pressão leva a alterações drásticas na cor vermelha do músculo pois este processamento vai afetar a mioglobina, o que faz com que o produto pressurizado tenha uma aparência parecida com o produto cozido e não possa ser vendido como carne fresca (Hogan *et al.*, 2005).

Na maioria dos tratamentos com alta pressão verifica-se um aumento do valor de L*, que é explicado pela degradação das proteínas miofibrilares e desorganização das miofibrilas, levando a um aumento da reflexão da luz, ou seja, existe uma influência importante das

alterações que ocorrem na matriz do produto pressurizado sobre a refletância deste (Campus, Flores, Martinez & Toldrá, 2008, Grossi, Søltoft-Jensen, Knudsen, Christensen & Orlien, 2012). As perdas por exsudação da carne e os danos no anel de porfirina provocados pela alta pressão também têm influência na refletância da carne (Goutefongea *et al.*, 1995; Mussa, 1999 citado por Jung *et al.*, 2003). O branqueamento da carne fresca pressurizada deve-se à desnaturação da globina na mioglobina, à liberação ou deslocação do radical heme e/ou à oxidação parcial da mioglobina ferrosa em metamioglobina férrica, pois a desnaturação da globina facilita a ação de agentes oxidantes presentes no meio, onde se verifica a oxidação do ião ferroso (Fe^{2+}) a ião férrico (Fe^{3+}) (Mor-Mur & Yuste, 2003; Andrés, Møller, Adamsen & Skibsted, 2004; Campus *et al.*, 2008). Por este motivo, é relatada uma diminuição nos valores de a^* , confirmando-se o decréscimo da mioglobina total e um aumento da metamioglobina, com diminuição da cor vermelha da carne e surgimento da cor acastanhada, o que contribuí para um aspeto parecido com o da carne cozida.

As discrepâncias entre o efeito da alta pressão na cor da carne podem ser explicadas pelo nível de pressão do tratamento, onde os efeitos da pressão abaixo de 400 MPa podem diferir dos efeitos a níveis mais elevados, pela etapa do processamento na qual a pressão é aplicada e, sobretudo, pela temperatura de processamento (Carlez *et al.*, 1995; Cheftel & Culioli, 1997; Serra *et al.*, 2007).

Importa referir ainda que independentemente do pH da carne, um nível elevado de sal (30 g/kg de carne) leva a mudanças de cor menores após o tratamento com alta pressão do que um nível de sal menor (15 g/kg de carne), provavelmente devido ao efeito da menor a_w sobre a estabilidade da cor (Bak *et al.*, 2012).

Porque é apontada como uma desvantagem do processamento com alta pressão hidrostática, o problema da alteração de cor dos produtos cárneos pressurizados têm sido alvo de vários estudos, tendo alguns deles relatado uma menor alteração da cor nos produtos cárneos que são pressurizados congelados. Fernández *et al.* (2007) observaram que quando a alta pressão hidrostática é aplicada em carne fresca há uma desnaturação irreversível da mioglobina, mas se a carne estiver congelada pode haver uma minimização da desnaturação da mioglobina, com recuperação da sua conformação na sequência da descongelação da carne. Assim, a carne recupera a sua cor original depois de ser descongelada e pode ser comercializada refrigerada, sem induzir a rejeição do consumidor.

2.11 - Combinação da alta pressão com outras estratégias de conservação de alimentos

Para melhorar ainda mais a eficácia da tecnologia de alta pressão hidrostática ou para conseguir uma eficácia semelhante com baixas pressões, alguns autores têm explorado a associação desta tecnologia com outras estratégias utilizadas no processamento e conservação de alimentos. Nesta combinação é considerado o efeito sinérgico ou aditivo que daí resulta e como exemplos temos: a alta pressão hidrostática combinada com um pH reduzido (esta combinação impede o crescimento microbiano e a germinação de esporos que podem sobreviver a tratamentos de alta pressão a pH elevado); a alta pressão hidrostática combinada com agentes antimicrobianos naturais, como bacteriocinas (as células sujeitas ao tratamento com alta pressão tornam-se mais suscetíveis aos antimicrobianos). São vários os estudos que têm sido feitos para demonstrar a importância da última combinação referida, como a combinação das altas pressões com BAL, com lactato-diacetato ou com o sistema lactoperoxidase (García-Graells, Valckx & Michiels, 2000; Garriga, Aymerich, Costa, Monfort & Hugas, 2002; Jofré *et al.*, 2008; Marcos *et al.*, 2008, Jofré *et al.*, 2009).

Vercammen *et al.* (2011) notaram que ao combinarem altas pressões com ácido caprílico ou Purasal® estabilizavam completamente o produto estudado (fiambre) para todo o período de armazenamento de 84 dias, uma vez que não houve um aumento significativo na contagem de mesófilos aeróbios ou BAL (maior valor registado foi de 1,3 log ufc/g). No entanto, também este autor concluiu que mais estudos são necessários para selecionar os antimicrobianos utilizados, assim como, a sua concentração, pois estes têm uma influência fortemente negativa sobre o flavor e o aroma dos alimentos.

A melhoria da eficácia do tratamento de alta pressão hidrostática pela combinação com a tecnologia de barreiras tem sido mostrada e é salientada a maior redução da atividade microbiana, o que é indispensável para a extensão do período de vida útil dos produtos alimentares tratados. Porém, nunca esquecendo a segurança dos alimentos e a qualidade sensorial destes, pois se a combinação melhora a eficácia do tratamento mas altera qualidades organolépticas, então, a sua aplicação deve ser repensada.

3 - Efeito da tecnologia de alta pressão nas características microbiológicas e físicas da tripa natural de suíno

3.1 - Objetivos e Justificação do trabalho

A aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática no processamento da tripa natural de suíno tem como objetivo a melhoria da sua qualidade microbiológica, sem alteração das suas características tecnológicas, e limitando, deste modo, a contaminação dos produtos cárneos onde é utilizada como matéria-prima auxiliar.

O interesse deste estudo residiu na otimização da aplicação de uma tecnologia emergente, como a alta pressão hidrostática, e na compreensão do benefício desta sobre a segurança e conservação da tripa natural. Foram avaliadas as condições de alta pressão, o nível de pressão aplicada e o tempo do tratamento, associadas à redução da microbiota de deterioração e patogénica presente na tripa natural. Importou também avaliar o efeito da tecnologia sobre as características tecnológicas da tripa natural, pois de nada valeria melhorar a segurança deste produto se prejudicasse estas características tão importantes na sua escolha para o fabrico de enchidos cárneos.

Pretenderam-se alcançar os seguintes objetivos com este estudo:

- Avaliar a qualidade microbiológica das tripas utilizadas na produção de enchidos cárneos;
- Estudar o efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática sobre a redução da carga microbiana inicial da tripa, avaliando a resistência de determinados microrganismos;
- Avaliar o efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática sobre as propriedades físicas da tripa, medindo a sua resistência com recurso a testes de tensão e perfuração, detetando possíveis alterações na sua cor pela medição objetiva da mesma através do sistema *Lab*, perceber se ocorreram alterações na sua microestrutura por análise histológica e verificando as mudanças na sua superfície pela medição do ângulo de contacto;
- Compreender os efeitos das variáveis estudadas, pressão e tempo dos tratamentos de alta pressão, quer nas características microbiológicas quer físicas da tripa natural;
- Otimizar o tratamento de alta pressão hidrostática, ou seja, perceber qual o binómio pressão-tempo mais adequado e executável numa futura aplicação industrial desta tecnologia neste tipo de produto.

3.2 - Materiais e Métodos

3.2.1 - Receção das tripas e sua preparação

As tripas naturais de suíno foram transportadas em caixa isotérmica, de um matadouro local para o laboratório de Tecnologia e Segurança Alimentar, do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. As tripas sofreram um tratamento preliminar no matadouro, isto é, passaram pelas fases de esvaziamento do conteúdo intestinal e de destacamento da camada mucosa, sem ter havido raspagem/eliminação da gordura e da camada serosa. Estas encontravam-se a granel e foram divididas em porções de 25 g para as análises microbiológicas e de 50 cm para as análises físicas.

Cada porção de tripa foi colocada num saco PA/PE (PA - poliamida; PE - polietileno) com 90 µm de espessura (Tecnopack, Portugal) e embalada a vácuo num equipamento de vácuo do modelo EVT-7-CD (Tecnotrip S.A., Espanha). Depois de embaladas, as amostras de tripa foram imediatamente congeladas a -20 °C e mantiveram-se conservadas sob esta forma até serem sujeitas aos tratamentos de alta pressão.

3.2.2 - Aplicação de alta pressão às amostras de tripa

A aplicação dos diferentes tratamentos de alta pressão foi realizada num equipamento da NC Hyperbaric (Hyperbaric, Espanha), modelo Wave 6000/135, no Instituto Tecnológico Agrario de Castilla e León, em Valladolid, Espanha. Este equipamento, (Figura 4), tem uma câmara com capacidade para 135 litros e 300 mm de diâmetro, permitindo o processamento de produtos com dimensões consideráveis, como por exemplo, um presunto inteiro. O fluido de pressurização utilizado pelo equipamento foi a água.

Figura 4 - Equipamento de alta pressão utilizado (Fonte: <http://www.hiperbaric.com/en/hiperbaric135>)



As amostras de tripa embaladas foram descongeladas à temperatura ambiente e colocadas num recipiente, que servia de suporte e acompanhou todo o processo, e seguidamente foram levadas por um tapete rolante até à câmara principal do equipamento, onde foram submetidas a altos níveis de pressão hidrostática transmitidos pela água. Quando o processo terminou as amostras regressaram ao tapete rolante no recipiente e as suas embalagens encontravam-se molhadas.

As amostras foram submetidas a tratamentos de alta pressão hidrostática entre os 200 e 600 MPa e com duração a variar de 2,5 a 30 minutos, como foi determinado pelo método de superfície de resposta (RSM-Response Surface Design) de forma a conseguir minimizar o número de experiências necessárias e, ao mesmo tempo, manter a significância estatística dos resultados. As taxas de pressurização e de despressurização foram controladas automaticamente. A temperatura do processo também foi controlada (10 °C).

Depois de terem sido sujeitas aos tratamentos de alta pressão, as amostras foram congeladas a -20 °C até ao momento da realização das análises microbiológicas e físicas, onde sofreram uma descongelação rápida por imersão em água.

3.2.3 - Análises Microbiológicas

3.2.3.1 - Preparação das amostras para análise microbiológica

A preparação das amostras foi efetuada de acordo com a ISO 6887-2:2003 e foram seguidas as normas gerais para análises microbiológicas descritas na ISO 7218:2007.

Foram retiradas, para um saco esterilizado de 400 ml com filtro lateral (BBAG-03, Gosselin SAS, França), 10 g de amostra de tripa que se pretendia analisar, com auxílio de tesoura e pinça, de forma a constituir uma amostra representativa. Em seguida, adicionaram-se 90 ml de Triptona Sal (Scharlau, Espanha) ao saco e a mistura foi homogeneizada durante aproximadamente 1 a 2 minutos no homogeneizador BagMixer® 400 P (Interscience, França). O conteúdo deste saco correspondia à suspensão inicial (diluição 10^{-1}).

3.2.3.2 - Preparação das diluições

Foram preparadas diluições decimais seriadas para reduzir o número de microrganismos por unidade de volume e, assim, tornar possível a contagem dos microrganismos existentes numa quantidade conhecida de produto.

A preparação das diluições decimais foi efetuada segundo a ISO 6887-1:1999.

Prepararam-se tubos de ensaio esterilizados com 9 ml de soluto diluidor (Triptona Sal). Num desses tubos adicionou-se 1 ml da suspensão inicial e de seguida esta mistura foi homogeneizada no vórtex (Janke & Kunkel, Ika Labortechnik, Alemanha), obteve-se, assim, a diluição 10^{-2} . Num segundo tubo foi adicionado 1 ml da diluição 10^{-2} para obtenção da diluição 10^{-3} . O procedimento foi repetido até se obter o número de diluições desejadas.

3.2.3.3 - Contagem de *Enterobacteriaceae*

Tal como descrito na ISO 21528-2:2004, semeou-se 1 ml de inóculo das diluições escolhidas em placas de *Petri* esterilizadas e identificadas e adicionou-se meio de cultura VRBD (Agar violeta de cristal vermelho neutro bilis dextrose, Scharlau, Espanha). A homogeneização do inóculo com o meio de cultura foi feita, realizando com a placa movimentos horizontais circulares. Deixou-se a mistura solidificar e de seguida as placas foram invertidas e colocadas na estufa (Memmert GmbH & Co. KG, Alemanha) a 37 °C durante 24 h. Após a incubação, foram contadas todas as colónias características (coloração rosa a vermelho ou púrpura com ou sem halo de precipitação de sais biliares), expressando-se o resultado final em log ufc/g (logaritmo do número de unidades formadoras de colónias por grama).

3.2.3.4 - Contagem de *Escherichia coli*

Segundo a ISO 16649-2:2001, realizou-se a sementeira por incorporação de 1 ml de inóculo de cada uma das diluições escolhidas em meio de cultura agar TBX (Agar glucurónico de triptona e bilis, Scharlau, Espanha). Após incubação das placas invertidas a 44,5 °C durante 24 h, foi realizada a contagem das colónias características (coloração azul-turquesa, originada pela ação da β -glucuronidase sobre o substrato cromogénio BCIG, ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucurónico) e o resultado final foi expresso em log ufc/g.

3.2.3.5 - Contagem de *Pseudomonas* spp.

Segundo a ISO 13720:2010, retirou-se 1 ml de inóculo de cada uma das diluições escolhidas e semeou-se por incorporação em agar seletivo para *Pseudomonas* - Agar Cetrímide (Scharlau, Espanha) suplementado com suplemento seletivo *Pseudomonas* C-F-C (Oxoid Ltd., Inglaterra). Depois de a mistura homogeneizada solidificar, as placas foram invertidas e colocadas na estufa a 30 °C durante 48 h (Mead & Adams, 1977). Foi feita a contagem de todas as colónias desenvolvidas e o resultado final foi expresso em log ufc/g.

3.2.3.6 - Contagem de *Brochothrix thermosphacta*

De acordo com a ISO 13722:1996, retirou-se 1 ml de inóculo das diluições escolhidas para placas de *Petri* esterilizadas e identificadas e adicionou-se meio de cultura agar base STAA (estreptomicina sulfato/tálio acetato/actidiona, Oxoid Ltd., Inglaterra) com suplemento seletivo STAA (Oxoid Ltd., Inglaterra). Após solidificação da mistura do inóculo com o meio de cultura, as placas foram invertidas e colocadas numa caixa com uma saqueta para geração de condições microaerófilas (CampyGen CN0025A, Oxoid Ltd., Inglaterra). Esta caixa foi fechada hermeticamente e colocada na estufa a 30 °C durante 48 h (Santé, Renner & Lacourt, 1994) e no final contaram-se todas as colónias características

(brilhantes, esbranquiçadas e redondas, com diâmetro de 0,75 mm ou maior), expressando-se o resultado final em log ufc/g.

3.2.3.7 - Contagem de *Enterococcus*

Realizou-se uma sementeira por incorporação de 1 ml de inóculo das diluições escolhidas em meio de cultura agar base Slanetz & Bartley (Scharlau, Espanha) suplementado com 10 ml/L de uma solução estéril de TTC a 1% (Scharlau, Espanha). Quando a mistura do inóculo com o meio solidificou colocaram-se as placas invertidas na estufa. Após incubação a 37 °C durante 48 h, fez-se a contagem de todas as colónias características (coloração vermelha, castanha ou rosada com halo negro) e o resultado final foi apresentado em log ufc/g.

3.2.3.8 - Contagem de *Staphylococcus coagulase negativa*

Retirou-se 0,1 ml de inóculo das diluições escolhidas para placas de *Petri* previamente preparadas com meio de cultura seletivo MSA (Agar de Manitol hipersalino, Scharlau, Espanha) suplementado com gema de ovo sem telúrito (Scharlau, Espanha). O inóculo foi espalhado à superfície do meio com auxílio de um espalhador em L estéril. A incubação foi feita a 30 °C durante 48 h (Lebert *et al.*, 2007). Após este período, contaram-se todas as colónias presentes (de coloração amarela ou avermelhada, a primeira coloração ocorre se houve redução do manitol e a segunda se as colónias não o reduziram) e o resultado final foi expresso em log ufc/g.

3.2.3.9 - Contagem de bactérias ácido lácticas

Tendo em conta a ISO 15214:1998, colocou-se 0,1 ml de inóculo das diluições escolhidas em placas de *Petri* com meio de cultura agar MRS (Man Rogosa Sharpe Agar, Scharlau, Espanha) suplementado com acetato de tálio a 5% (Sigma-Aldrich CO., E.U.A) e uma solução a 1% de cloreto de 2-3-5 trifeniltetrazólio (Sigma-Aldrich CO., E.U.A). Espalhou-se o inóculo sobre a superfície do meio com auxílio de um espalhador até a superfície estar completamente seca. Seguidamente, as placas invertidas foram colocadas numa caixa onde pela junção de uma saqueta (Genbox anaer, Ref. 96124, bioMérieux SA, França) foram conseguidas as condições de anaerobiose necessárias. Após a incubação a 30 °C durante 48 h, foi realizada a contagem das colónias características (coloração vermelha ou rosada), sendo o resultado final expresso em log ufc/g.

3.2.3.10 - Contagem de *Listeria monocytogenes*

A contagem foi realizada de acordo com a ISO 11290-2:1998. Em cada uma das placas de *Petri* com meio seletivo ALOA (Agar *Listeria* Ottaviani & Agosti, bioMérieux SA, França) foi colocado 0,1 ml de inóculo das diluições escolhidas e fez-se o espalhamento à superfície com auxílio de um espalhador. As placas foram invertidas e colocadas na estufa a 30 °C

durante 24 h. Após este período procedeu-se à contagem das colónias características (coloração azul-esverdeada e rodeadas por halo opaco).

Caso se verificasse a presença de colónias suspeitas era sempre necessário recorrer à sua confirmação. Essa confirmação foi baseada na repicagem de colónias características para placas previamente preparadas com meio TSA (Agar triptona e soja, Scharlau, Espanha) com incubação a 30 °C durante 24 h. Cada colónia suspeita que cresceu no meio foi inoculada em galeria API *Listeria* (Ref. 10300, bioMérieux SA, França). As provas bioquímicas, a adição de reagentes na galeria e a leitura de resultados foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante para obter a confirmação de identidade de *Listeria monocytogenes*. O resultado final foi expresso em log ufc/g.

3.2.3.11 - Contagem de *Salmonella* spp.

Retirou-se 0,1 ml de inóculo das diluições escolhidas e semeou-se à superfície em placas com meio cromogénico para o isolamento seletivo e diferenciação do género *Salmonella* (ChromID *Salmonella* agar, bioMérieux SA, França). As placas foram invertidas e colocadas na estufa a 37 °C durante 24 h. Após este período foram contabilizadas as colónias características (coloração rosa e cor de malva).

A confirmação de colónias suspeitas características foi efetuada para cinco colónias que foram repicadas e isoladas. As colónias suspeitas foram repicadas individualmente para tubos com meio TSI (Triple Sugar Iron Agar, Scharlau, Espanha). Assim, cada colónia suspeita foi retirada da placa com fio e picada no meio TSI com estria no bisel. Os tubos foram colocados na estufa a 37 °C durante 24 h. Decorrido este período procedeu-se à leitura dos resultados, tendo sido considerados positivos os tubos com fundo amarelo ou negro, bisel vermelho e com produção ou não de gás. Nos tubos com resultado positivo foram retiradas as colónias do bisel, com auxílio de uma ansa, e semeadas em estria em placas com meio TSA (Agar triptona e soja, Scharlau, Espanha). Estas placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

A partir desta cultura obtida em meio TSA foi feita a extração de ADN utilizando o método do Chelex 100 (adaptado de Lebert *et al.*, 2007). Posteriormente, realizou-se o PCR *Salmonella* (adaptado de Rahn *et al.*, 1992), usando como controlo positivo *Salmonella enteritidis* CECT 4300 e como controlo negativo *E. coli* CCUG 42744. A corrida de eletroforese foi realizada com recurso ao marcador NZYDNA Ladder I (NZYTech Lda., Portugal). Na interpretação dos resultados temos de ter em conta que a identificação de *Salmonella* faz-se quando a amplificação gera produtos PCR com ~284 bp e, por isso, apenas as bandas com este tamanho foram consideradas como resultado positivo. O resultado final da contagem foi expresso em log ufc/g.

3.2.4 - Análises Físicas

3.2.4.1 - Análise da resistência mecânica da tripa

As análises da resistência mecânica das amostras de tripa foram realizadas no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, com apoio da Professora Doutora Isabel de Sousa. Recorreu-se a um texturómetro modelo TA.XTplus (Stable Micro Systems Ltd., Inglaterra) que estava ligado a um computador com o software Texture Expert para Windows, versão 1.20 (R, Stable Micro System), sendo os dados das medições registados automaticamente. O texturómetro é um equipamento experimental onde se avalia a macroestrutura de alimentos sólidos recorrendo a ensaios destrutivos.

Foram efetuados dois testes diferentes, um teste de tensão radial da largura da tripa (teste de rebentamento por tensão) e um teste de perfuração (teste de compressão).

Em ambos os testes, antes de ser iniciada a sua realização e depois de montadas as sondas, era necessário proceder à calibração do equipamento. Nos dois testes realizou-se a calibração do peso e no teste de perfuração, havia ainda a acrescentar, a calibração da altura.

A sala onde se realizaram as análises de resistência mecânica tinha a temperatura controlada e esta era de 20 ± 1 °C.

Apesar da preparação das amostras ser diferente para cada um dos testes, estas eram, depois de preparadas, colocadas em água e gelo até serem analisadas de forma a evitar a sua desidratação. Caso a desidratação se verificasse a estrutura das amostras seria alterada, assim como os resultados obtidos.

3.2.4.1.1 - Teste de tensão radial da largura da tripa

O teste de tensão radial da largura da tripa tinha como princípio distender as amostras até rutura para medição da força máxima de tensão (F_T), dada em N, e do alongamento (ϵ), medido em mm, que representa a distância percorrida pelo teste até ao momento da rutura. Com este teste obtiveram-se gráficos Força (N) x Tempo (s) e a partir destes foram determinados o ponto máximo da curva, que corresponde à F_T , e o correspondente valor da distância nesse ponto, que nos dá o ϵ .

Neste teste foram utilizadas duas sondas de prensão como base de fixação e, no fecho em mandíbula serrada de cada uma delas, foi incorporada uma chave inglesa, para que a amostra pudesse ser colocada na chave de cima e de baixo e a força exercida na largura desta. O esquema de montagem explicado anteriormente pode ser observado na Figura 5 e 6 (B). A distância entre as chaves foi controlada (2,5 cm), assim como o comprimento da sua extremidade até ao fecho da mandíbula (4 cm).

No teste foram necessárias definir as seguintes condições de teste: modo de tensão, velocidade do teste de 1 mm/s, distância a percorrer no teste de 35 mm e velocidade pós-teste de 10 mm/s. A definição destas condições é de extrema importância uma vez que se

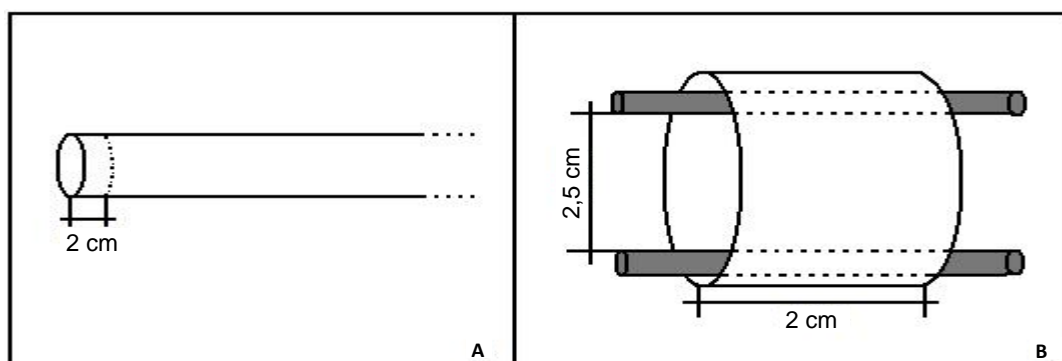
trata de um teste empírico, tendo estas de ser conhecidas para que possamos repetir o teste e para que os resultados façam sentido no contexto da sua determinação. Foi escolhida a velocidade de 1 mm/s porque, para além de ser mais fácil a interpretação dos resultados, uma vez que 1 mm de distância percorrida pelo teste corresponde a 1 s de teste, é necessário utilizar uma velocidade baixa para conseguirmos perceber como a estrutura da tripa reage à tensão aplicada, pois a velocidades elevadas esta é rapidamente destruída sem termos essa percepção.

Figura 5 - Sondas e acessórios adicionados ao texturómetro para realização do teste de tensão radial da largura da tripa, com a amostra a analisar colocada no respetivo local da experiência



Foram realizadas quinze repetições do teste de tensão radial da largura para cada uma das amostras de tripa analisadas. Cada uma das amostras foi preparada realizando-se cortes de segmentos de tripa com 2 cm, de forma a conseguir obter os quinze segmentos. O corte do segmento foi feito em toda a largura da tripa como pode ser observado no esquema da Figura 6 (A). Depois de realizados os cortes assegurou-se que não existiam pontos frágeis nesses segmentos, pois estes poderiam originar valores falseados da força de rutura.

Figura 6 - Representação esquemática do corte para obtenção de um segmento de tripa com 2 cm (A) e da colocação da amostra nas barras metálicas do equipamento (B) (adaptado de Fraqueza, 1992)

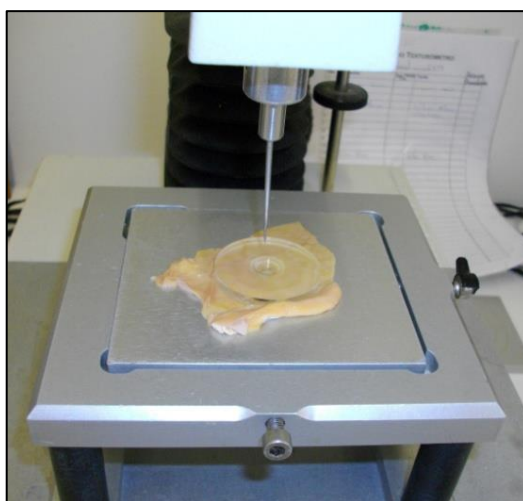


3.2.4.1.2 - Teste de Perfuração

No teste de perfuração foi determinado o valor da força máxima necessária para perfurar a amostra analisada (F_p). Neste teste, tal como no teste de tensão radial, foram obtidos gráficos Força (N) x Tempo (s) e retirou-se o valor da força no pico máximo, o que corresponde à F_p .

Para a realização deste teste foi utilizada uma plataforma inferior com um orifício central e, superiormente, como sonda, uma agulha de aço inoxidável. Foi ainda utilizado um mini disco de plástico para auxiliar a fixação da amostra no decorrer do teste. A Figura 7 mostra a configuração final do equipamento.

Figura 7 - Texturómetro com a sonda montada para a realização do teste de perfuração e com a amostra de tripa colocada no respetivo local da experiência



Foram respeitadas as seguintes condições de teste: modo de compressão, velocidade de teste de 1 mm/s, distância a percorrer no teste de 15 mm e velocidade pós-teste de 10 mm/s.

Foram realizadas sete repetições do teste de perfuração para cada uma das amostras analisadas. Na preparação das amostras para este teste foram realizados cortes de forma a obter uma única camada de tripa com uma dimensão de, aproximadamente, 16 cm².

A espessura das tripas é importante na definição da resistência mecânica das mesmas, por isso, torna-se importante considerá-la num teste com as características do teste de perfuração. Assim, a espessura das amostras foi medida para perceber de que forma poderia influenciar os valores da F_p obtidos no teste. Então, com auxílio de um paquímetro, mediu-se a espessura das amostras e obteve-se uma média de 0,29 mm ($\pm 0,068$ mm). Apesar de todas estas considerações, não foi possível estabelecer qualquer tipo de correlação entre a espessura e a resistência apresentada pela amostra, uma vez que não existiram grandes diferenças na espessura dos diferentes segmentos.

3.2.4.2 - Análises Colorimétricas

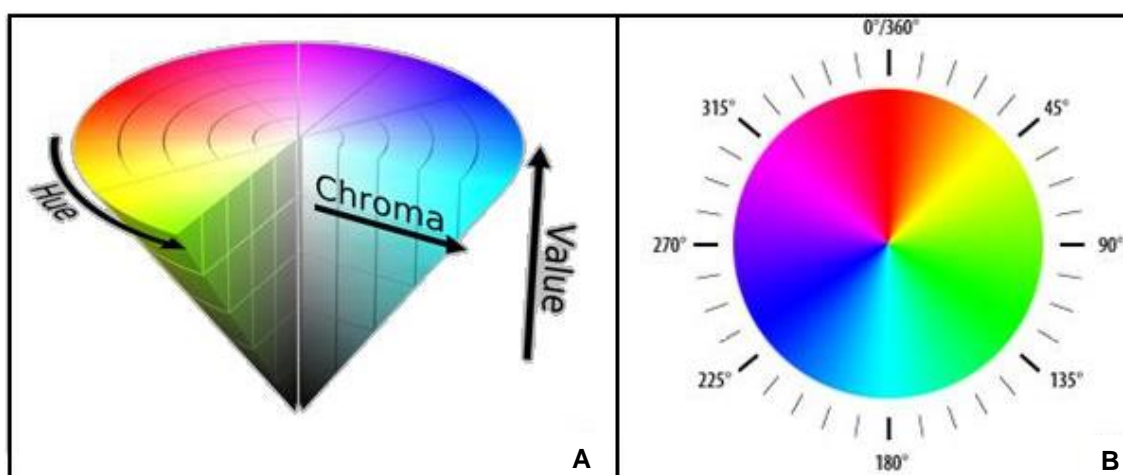
Na determinação da cor das amostras de tripa foi utilizado o colorímetro Minolta CR-300 (Konica Minolta, Japão).

A calibração do equipamento foi realizada colocando a placa padrão de cor branca dentro de um saco PA/PE igual ao utilizado no acondicionamento das tripas, isto porque a determinação da cor foi realizada com a tripa dentro da embalagem. Depois de feita a calibração, posicionou-se o canhão de leitura na superfície da amostra sobre o plástico, tendo o cuidado de o colocar numa zona de tripa sem gordura.

Os resultados foram expressos no sistema de cor *Lab*, que é o sistema mais utilizado para a avaliação da cor em produtos alimentares. As coordenadas usadas na determinação da cor das amostras de tripa foram as seguintes: L^* , mede o índice de luminosidade e varia de 0 (preto, menos luminoso) a 100 (branco, mais luminoso), a^* , mede a intensidade de verde (a^* negativo) ou vermelho (a^* positivo) e b^* , mede a intensidade de azul (b^* negativo) ou amarelo (b^* positivo). Além destes parâmetros, foram ainda determinados o valor do ângulo Hue, que define a tonalidade da cor, e o valor de chroma também designado de valor de saturação, que define a pureza da cor. Na Figura 8 são apresentadas duas ilustrações explicativas dos dois parâmetros, na primeira é perceptível a relação entre eles e a segunda mostra a correspondência entre os ângulos de Hue e as tonalidades da cor.

A determinação da cor foi feita nas amostras de controlo e em cada uma das amostras submetidas aos diferentes tratamentos de alta pressão e o resultado final desta determinação adveio da média aritmética de três medições, realizadas na mesma amostra em pontos distintos.

Figura 8 - Representação esquemática do modelo HSV (hue and chroma value) (A) e da escala de Hue (B) (adaptado de http://dba.med. sc.edu/price/irf/Adobe_tg/models/hsb.html)



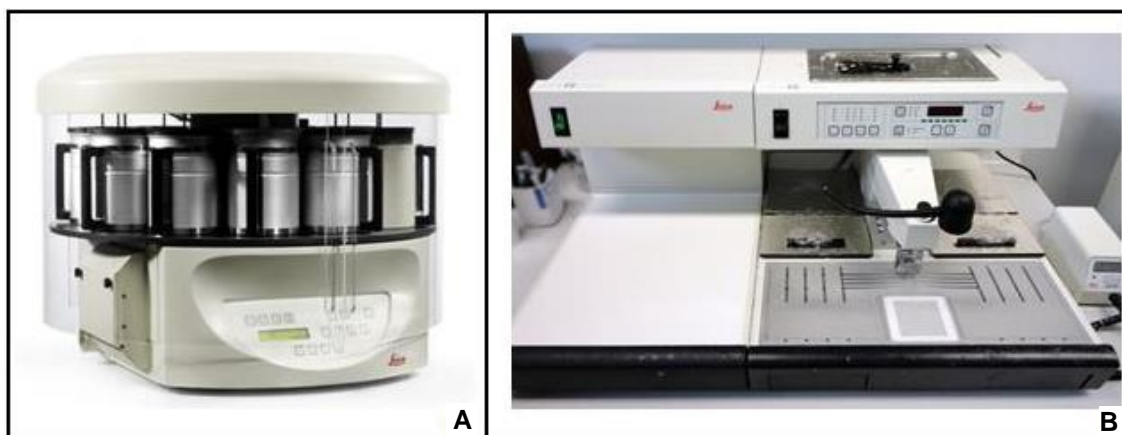
3.2.4.3 - Análises Histológicas

Quando as amostras para as análises físicas eram descongeladas, retirou-se uma pequena porção (aproximadamente 2 cm) de uma das amostras de cada tratamento e de uma das de controlo, que foram colocadas individualmente em copos de plástico com formol a 10%, dez vezes o volume da amostra, até ao momento do processamento histológico. Os cortes da amostra devem ser finos, de espessura não superior a 1 cm, para facilitar a fixação do formol (Reppas & Canfield, 2004).

Com intuito de compreender a alteração na microestrutura da tripa com os tratamentos de alta pressão hidrostática foram realizadas análises histológicas no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, com apoio da Professora Doutora Conceição Peleteiro.

Por cada uma das amostras a analisar foram realizados dois cortes muito finos, com auxílio de um bisturi bem afiado, e estes colocados numa cassete histológica para processamento histológico. As cassetes foram mantidas em formol até serem submetidas ao processador de tecidos Leica modelo TP1020 (Leica Biosystems, Portugal), que pode ser observado na Figura 9 (A).

Figura 9 - Processador de tecidos para análise histológica Leica TP1020 (A) e Bancada de inclusão Leica EG1150C (B) (Fonte: <http://www.img.cas.cz/core-facilities/histology-lab/equipment/>)



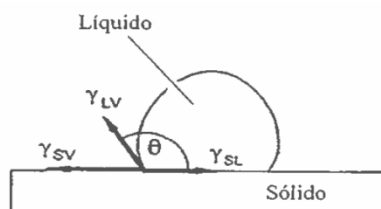
Neste equipamento as amostras foram submergidas em diversos solventes e com tempos de duração diferentes em cada fase do processo (Ver Anexo I). Assim, os segmentos foram submetidos a álcoois com graduação crescente para se dar a sua desidratação e impregnados com xilol para posterior inclusão em parafina. Depois de sofrer este processo, as cassetes foram abertas e os segmentos de tripa colocados horizontalmente (secções transversais), num molde metálico para receber a parafina. Numa bancada de inclusão Leica EG1150C (Figura 9B) este molde foi preenchido com parafina, sendo coberto pela parte inferior da cassete onde estava a identificação da amostra. A parafina permite que a amostra fique com uma consistência firme para que, posteriormente, possa ser seccionada

em fatias muito finas. Por intermédio de um micrótomo de Minot, foram realizados cortes de 4-3 µm de espessura. Estes cortes foram colocados em lâmina de vidro, fixados pelo calor em estufa e corados com hematoxilina e eosina (H&E), de acordo com o procedimento descrito no Anexo II. Deste modo, a montagem final foi feita com Entellan, após desidratação numa sequência de álcoois com graduação crescente e em xilol. As lâminas foram observadas ao microscópio ótico, tendo sido efetuadas fotografias dos cortes histológicos com câmara digital Olympus DP21.

3.2.4.4 - Determinação do ângulo de contacto de superfície da tripa

O ângulo de contato é definido pela tangente à interface líquido/vapor e à superfície sólida (Rodrigues, 2006), como pode ser observado pela Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática do ângulo de contacto formado por uma gota de um líquido na superfície de um sólido e das energias interfase líquido-vapor (γ_{LV}), sólido-líquido (γ_{SL}) e sólido-vapor (γ_{SV}) (adaptado de Buckton, 1995)



Para a determinação do ângulo de contacto, geralmente, recorre-se ao tensiómetro e utiliza-se o método de Wilhelmy, que se baseia na quantificação da intensidade da força medida quando uma placa é imersa ou emersa num líquido contido numa tina.

Antes de a placa entrar em contacto com o líquido o seu peso é igual ao produto da massa pela aceleração da gravidade. Quando o sólido entra ou sai do solvente forma-se um ângulo e a força exercida sobre a balança é registada. O ângulo de contacto é calculado através da seguinte fórmula:

$$\cos \theta = \frac{F}{(2c + 2e) \sigma} \quad \text{Equação [1]}$$

onde, F é a força que atua sobre a balança, c é o comprimento da amostra, e é a espessura da amostra e σ é a tensão interfacial (Rodrigues, 2006).

Quando a plataforma do tensiómetro que contem a tina com o líquido é elevada a amostra é molhada e consegue-se medir o ângulo de contacto de avanço (θ_a). Quando esta plataforma vai para baixo a amostra sai do solvente e é medido o ângulo de contacto de retrocesso (θ_r). Ambos os ângulos de contacto são ângulos dinâmicos e podem ser considerados no cálculo da energia de superfície. No entanto, o θ_r perde importância em relação ao θ_a pois reflete a impureza da superfície, podendo ser a diferença entre estes dois ângulos usada como medida da impureza da amostra. Por este motivo, é o θ_a o utilizado para o cálculo da

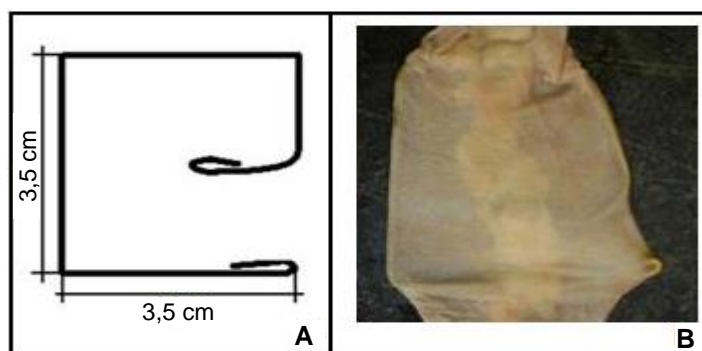
energia de superfície das amostras (Neuman & Spelt, 1996) e é este o referido nas medições deste trabalho, tendo sido desprezado o θ_r .

As determinações do ângulo de contacto das amostras de tripa foram realizadas na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, com o apoio do Professor Doutor João Pinto do Departamento de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica da mesma faculdade.

As medições do ângulo de contacto foram realizadas num tensiómetro modelo K100 da Krüss (A. Krüss Optronik GmbH, Alemanha, distribuído por Dias Sousa S.A., Portugal), utilizando o software Krüss Laboratory Desktop versão 3.2. Este tensiómetro, ao contrário dos modelos mais antigos, tem um ionizador, o que ioniza o ar da câmara onde a medição é realizada e elimina, assim, as cargas eletrostáticas, permitindo resultados mais precisos e exatos. A temperatura a que se realizaram todas as medições foi monitorizada ($25 \pm 0,1$ °C) porque o equipamento se encontrava ligado a um circulador com banho de água a temperatura controlada (Thermo Haake DC 10, distribuído por Dias Sousa S.A., Portugal).

Antes de iniciar as medições foi necessário definir as condições de teste para a amostra e para os líquidos utilizados. Os segmentos de tripa a analisar foram colocados em cliques modificados, de acordo com a Figura 11, uns segmentos normais e outros invertidos para medição do ângulo de contacto na superfície exterior e interior, respetivamente. Definiram-se as seguintes condições para a amostra: geometria retangular, 35 mm de largura, 35 mm de comprimento e 1 mm de espessura. Estas condições são importantes definir no software, para que o equipamento consiga considerar o peso da amostra que está a ser analisada.

Figura 11 - Representação esquemática do clipe onde a amostra foi colocada para medição do ângulo de contacto (A) e fotografia da amostra colocada no clipe (B)

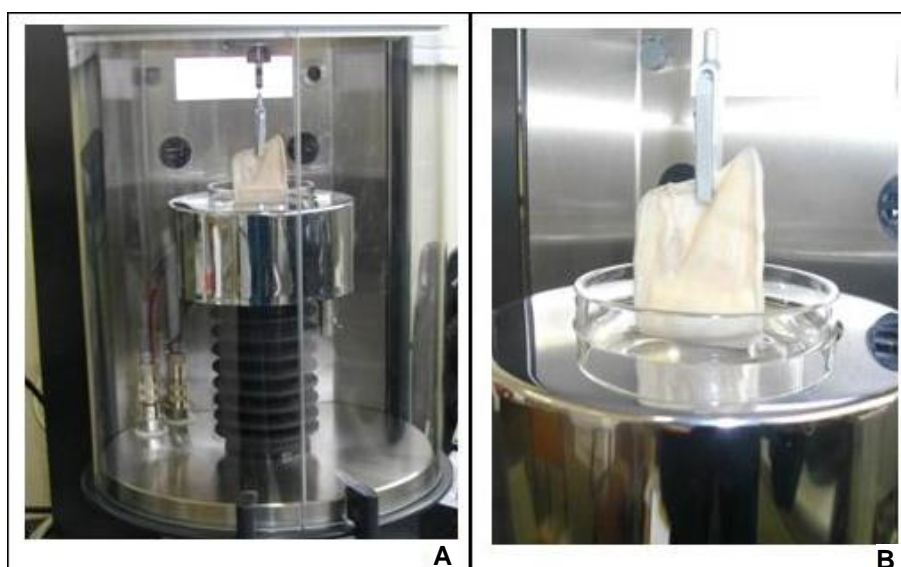


No sentido de determinar a resposta da superfície a dois ambientes solvolíticos diferentes foram utilizados dois líquidos distintos, um polar e um apolar. Como líquido polar foi utilizada água Ström com as seguintes propriedades conhecidas: densidade de 0,998 g/ml, viscosidade de 1.002 mPa.s, energia de superfície total de 72,80 mN/m, energia de superfície da parte dispersa de 21,80 mN/m, energia de superfície da parte polar de 51,00 mN/m. Como líquido apolar utilizou-se o bromonaftaleno (Sigma-Aldrich CO., E.U.A) e as

suas propriedades eram as seguintes: densidade de 1,483 g/ml, viscosidade de 5,107 mPa.s, tensão superficial de 44,60 mN/m, energia de superfície da parte dispersa de 44,60 mN/m e energia de superfície da parte polar nula.

O líquido que foi escolhido para a realização do teste foi colocado numa tina de vidro e esta foi colocada na plataforma elevatória de aço do tensiómetro. A amostra foi suspensa na balança do tensiómetro através de um gancho, de forma a que a parte inferior ficasse paralelamente ao líquido que se encontrava na tina, para não existirem interações nesta entrada, o que pode ser observado na Figura 12. As amostras foram mergulhadas nos líquidos a uma profundidade máxima de imersão de 5 mm e a uma velocidade de 3 mm/min.

Figura 12 - Tensiómetro com a amostra colocada no respetivo local da experiência (A) e pormenor da amostra colocada no gancho da balança (B)



3.2.5 - *Design* experimental e Análise estatística dos resultados

Neste estudo foi aplicada a metodologia das superfícies de resposta porque o objetivo era avaliar o efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática em diferentes características da tripa natural de suíno, em função das variáveis independentes testadas: nível de pressão e tempo dos tratamentos.

A metodologia RSM é uma técnica estatística muito utilizada para a modelação e análise de problemas, nos quais a resposta é influenciada por várias variáveis independentes (Comparini, Passos, Graziadei, Ferreira-Siva & Louzada, 2010). Nestas situações temos como objetivo determinar qual a condição de operação do processo que levará à obtenção de um valor ótimo para a variável resposta. A técnica tem sido muito utilizada e bem-sucedida na modelagem e otimização de processos industriais (Myres & Montgomery, 1995).

O *design* experimental adotado pela metodologia RSM permite testar vários parâmetros, com um número mínimo de ensaios experimentais e de amostras testadas, o que leva a

uma economia de recursos e de tempo. Neste estudo era fundamental reduzir o número de amostras, os tratamentos testados e o tempo de execução destes, por razões óbvias de custos disponibilizados para o projeto e de tempo disponível para a realização do trabalho. Com a escolha do *design* experimental dado pela metodologia RSM foi possível minimizar o número de experiências necessárias para cada binómio pressão-tempo estudado, mantendo a significância estatística dos resultados obtidos.

Assume-se que a relação entre a variável resposta e as variáveis independentes é dada por uma equação polinomial $y = f(x_1, x_2, \dots, x_p) + e$, onde x_i representa cada uma das variáveis independentes estudadas e e representa o erro aleatório, que é a variação observada na variável resposta y que não é explicada pelas variáveis independentes. Assim, a função f define a curva da superfície de resposta, a representação gráfica do conjunto de respostas em função das variáveis do processo.

Normalmente, devido ao facto de não se conhecer a forma como se relacionam as variáveis dependentes e independentes, utiliza-se uma regressão polinomial de baixo grau para modelar a resposta, um polinómio de primeira ou de segunda ordem.

Os coeficientes da equação são estimados a partir dos dados experimentais, utilizando métodos estatísticos. Nas equações de segunda ordem os coeficientes dos termos quadráticos determinam a curvatura da superfície de resposta tridimensional.

Para analisar os resultados foi utilizado o software “StatisticaTM”, versão 6, a partir do software Statsoft, E.U.A.

Para cada variável independente foram calculados os efeitos lineares e quadráticos. As médias ajustadas e os erros padrões das médias são apresentados nas tabelas. A significância dos valores foi avaliada pela análise de variância, que visa apurar se existe uma diferença significativa entre as médias e as variáveis independentes consideradas. Para valores de p inferiores a 0,05 considerou-se o resultado significativo, impedindo a sua rejeição. Foi também avaliada a interação existente entre as variáveis independentes.

Para uma visualização gráfica dos resultados, foram realizadas representações bi e tridimensionais de superfície, ou seja, gráficos de contornos e de superfície de resposta, respetivamente.

Para determinar a qualidade do ajuste dos modelos aos resultados experimentais foi realizada a análise conjunta do coeficiente de correlação quadrático (R^2) e do coeficiente de correlação quadrático ajustado (R^2_{adj}). Ambos os coeficientes medem a variação da variável resposta que é explicada pelas variáveis independentes. A precisão da resposta prevista pelo modelo é maior, quanto maior for o valor de R^2 . Normalmente, admite-se que os valores de R^2 devem ser iguais ou superiores a 0,75. O R^2_{adj} corrige o valor de R^2 , por isso normalmente dá-se maior importância ao primeiro coeficiente. Quanto maior o valor de R^2_{adj} melhor é o ajuste da resposta prevista pelo modelo (este valor é sempre menor ou igual a R^2). Neste trabalho considerou-se o ajuste como aceitável com um R^2_{adj} mínimo de 0,75.

4 - Apresentação e Discussão dos resultados

4.1 - Avaliação da qualidade microbiológica das tripas utilizadas no estudo

Foram feitas análises microbiológicas às amostras de tripa natural de suíno que não foram tratadas com alta pressão para fazer a sua caracterização microbiológica e para se perceber, posteriormente, qual o efeito dos tratamentos de alta pressão aplicados sobre a carga microbiana inicial.

A qualidade microbiológica da tripa natural tem de ser garantida, para que esta possa ser utilizada como matéria-prima auxiliar na produção de enchidos sem os contaminar. Esta qualidade microbiológica está diretamente relacionada com a higiene do processamento da tripa, ao nível do matadouro e da triparia. Pretendeu-se com esta avaliação inicial da qualidade microbiológica demonstrar que o processamento da tripa natural de suíno, por si só, não é suficiente para assegurar esta qualidade, sendo então necessário considerar a introdução de uma etapa neste processamento que seja eficaz na eliminação dos contaminantes microbiológicos.

Para comprovar a qualidade microbiológica das tripas empregues na produção de enchidos cárneos, já foram estudados por alguns autores os níveis de contaminação da tripa natural fresca (Glénat, 1969; Trigo & Fraqueza, 1998; Bakker *et al.*, 1999; Byun *et al.*, 2001; Mendonça, 2012).

Na Tabela 2 encontram-se os valores das contagens microbiológicas obtidos neste trabalho para as amostras de tripa natural de suíno, provenientes do matadouro e que não sofreram tratamentos de alta pressão (controlo).

Tabela 2 - Média e desvio-padrão das contagens das análises microbiológicas das amostras de tripa de controlo (n=3)

Contagem microbiológica	(log ufc/g \pm σ)
<i>Enterobacteriaceae</i>	5,73 \pm 0,37
<i>E.coli</i>	4,25 \pm 0,16
<i>Pseudomonas spp.</i>	2,37 \pm 0,38
<i>Listeria monocytogenes</i>	<1
<i>Salmonella spp.</i>	<1
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1,52 \pm 0,07
<i>Enterococcus</i>	3,26 \pm 0,27
SCN	3,38 \pm 0,03
BAL	4,48 \pm 0,16

Os valores da contagem de *Enterobacteriaceae* nas amostras de tripa analisadas foram inferiores aos 7,5 log ufc/g registados por Trigo e Fraqueza (1998), mas superiores aos encontrados por Glénat (1969) e Mendonça (2012) de 4,8 e 3,4 log ufc/g, respetivamente. O valor de *Enterobacteriaceae* registado foi superior ao limite máximo aceitável das recomendações microbiológicas para a tripa fresca salgada, que é de 4 log ufc/g.

Para as tripas analisadas foi registado o valor de 4,25 log ufc/g para *E. coli*, 2,37 log ufc/g para *Pseudomonas* spp., 1,52 log ufc/g para *Brochothrix thermosphacta* e 3,26 log ufc/g para *Enterococcus*. Não foi encontrado nenhum estudo que fizesse referência a contagens microbiológicas em tripas para estes microrganismos.

A contagem de BAL esteve de acordo com os valores obtidos no trabalho realizado por Mendonça (2012), que encontrou na tripa fresca de suíno um valor de contaminação de BAL de 5,1 log ufc/g. Na contagem de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), este autor encontrou um valor superior ao determinado neste estudo em, aproximadamente, 2 log.

A contagem de *Salmonella* spp. foi inferior ao limite de deteção (<1 log ufc/g). A presença deste microrganismo é frequente nos intestinos de vários animais, por este motivo a sua ausência na tripa natural foi um resultado satisfatório pois poderá indicar que foram cumpridas as boas práticas de higiene nas operações de preparação da tripa. O microrganismo em causa dissemina-se por meio de fezes para o solo, água e alimentos, e destes para outros animais, incluindo o Homem (Ferreira, 2005). É um microrganismo termosensível, destrói-se facilmente à temperatura de pasteurização, não sendo por isso um microrganismo preocupante na maioria dos alimentos processados pelo calor.

A contagem de *Listeria monocytogenes* revelou a ausência deste microrganismo patogénico nas amostras de tripa, pois foi inferior a 1 log ufc/g, o que vai ao encontro do estabelecido pelas normas microbiológicas de segurança sanitária e alimentar. Existe uma enorme preocupação relacionada com este microrganismo devido ao elevado índice de listeriose humana proveniente de infeções de origem alimentar, que se devem à presença mascarada do agente em alimentos e à sua capacidade de superar diferentes barreiras usadas no processamento dos mesmos (Swaminathan, Cabanas, Zhang & Cossart, 2007).

De um modo geral, com a contagem microbiológica das amostras de tripa de controlo utilizadas neste trabalho, confirmou-se que as tripas naturais apresentam um elevado teor microbiano inicial, o que é corroborado por diferentes autores (Trigo & Fraqueza, 1998; Bakker *et al.*, 1999; Byun *et al.*, 2001), que apontam o processamento das tripas naturais como insuficiente para a garantia da sua qualidade microbiológica, mesmo havendo o cumprimento de regras de higiene adequadas.

4.2 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre a microbiota da tripa natural de suíno

Foram feitas análises microbiológicas às amostras de tripa submetidas a tratamentos com diferentes níveis de pressão e tempo. De acordo com o *design* experimental dado pelo método RSM (Ver 3.2.5), realizaram-se três réplicas de análises em cada um dos tratamentos estudados, ou seja, foram realizadas análises microbiológicas a três amostras diferentes de tripa que foram submetidas ao mesmo tipo de tratamento. No ponto central (P x t), correspondente ao tratamento com o binómio pressão-tempo 400 MPa e 960 s, realizaram-se nove réplicas.

Foi importante estudar o efeito da alta pressão hidrostática sobre a microbiota da tripa natural de suíno, para se tentar perceber se esta tecnologia emergente poderá ser apontada como uma possível etapa a implementar no processamento desta tripa para garantia da sua qualidade microbiológica, resolvendo o problema apontado no tópico anterior.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das contagens de *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterococcus*, SCN e BAL. Para além das contagens apresentadas nesta tabela, realizaram-se contagens de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* e estas foram inferiores ao limite de deteção (<1 log ufc/g) em todas as amostras analisadas. Também foram realizadas contagens de *Pseudomonas* spp., mas estas foram inferiores a 1 log ufc/g mesmo no tratamento com o nível de pressão mais baixo, a 202 MPa, daí não se apresentarem os resultados destas contagens na Tabela 3.

Tabela 3 - Média e desvio-padrão das contagens das análises microbiológicas das amostras de tripa submetidas a tratamentos com diferentes binómios pressão-tempo (n= 3, exceção feita ao tratamento 400 MPa e 960 s com n = 9)

Pressão (MPa)	Tempo (s)	Contagem microbiológica (log ufc/g ± σ)					
		<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Enterococcus</i>	SCN	BAL
202	960	2,47 ± 1,06	1,16 ± 0,28	1,75 ± 0,83	3,21 ± 0,24	3,84 ± 0,43	5,14 ± 0,41
260	390	<1	<1	<1	2,97 ± 0,12	3,12 ± 0,25	5,11 ± 0,40
260	1530	<1	<1	<1	3,03 ± 0,91	2,60 ± 0,53	4,04 ± 0,21
400	154	<1	<1	<1	3,28 ± 0,63	2,42 ± 0,41	4,27 ± 0,12
400	960	<1	<1	<1	1,24 ± 0,42	<1	2,71 ± 0,48
400	1800	<1	<1	<1	<1	<1	<1
540	390	<1	<1	<1	<1	<1	<1
540	1530	<1	<1	<1	<1	<1	<1
600	960	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Comparando os valores do teor microbiano das amostras de controlo (Tabela 2) com os valores apresentados na Tabela 3, podemos verificar que ocorreu uma diminuição notável no tratamento com nível de pressão mais baixo em relação à contagem de *Enterobacteriaceae* e *E.coli* (aproximadamente, uma redução de 2 e 3 log, respetivamente) e relativamente aos outros microrganismos esta redução não foi relevante porque não superou 1 log ufc/g.

Normalmente, uma elevada contagem de *Enterobacteriaceae* em produtos frescos de origem animal pode indiciar uma manipulação sem cuidados de higiene e/ ou um armazenamento inadequado. No caso dos produtos cárneos fermentados, é sinónimo de um processamento inadequado ou uma recontaminação pós-processamento. Dentro do grupo das *Enterobacteriaceae*, a *E. coli* é considerada o indicador de higiene e contaminação fecal, estando frequentemente a sua presença em alimentos associada a más condições de higiene. Neste estudo o microrganismo considerado mostrou uma redução de cerca de 3 log com o tratamento com o menor nível de pressão, sendo reduzido a níveis inferiores a 1 log ufc/g nos tratamentos com pressões superiores a 202 MPa.

De acordo com a sensibilidade do método utilizado, *E.coli* foi reduzida a níveis residuais com os tratamentos de alta pressão, com níveis de pressão a partir de 260 MPa, o que sugere que se as amostras estivessem muito contaminadas com *Salmonella* spp. este microrganismo também seria reduzido.

Os tratamentos com níveis de pressão mais baixos exerceram um efeito significativo na redução de bactérias Gram-negativas, como *Enterobacteriaceae*, *E.coli* e *Pseudomonas* spp. Estes resultados eram previsíveis uma vez que foram vários os autores que demonstraram que as bactérias Gram-negativas são menos resistentes às altas pressões do que as Gram-positivas, sendo que estas últimas necessitam de tratamentos com pressões mais elevadas para se conseguir a sua redução (Hoover *et al.*, 1989; Cheftel & Culioli, 1997; Smelt, 1998; Hugas *et al.*, 2002; Garriga *et al.*, 2004; Rendueles *et al.*, 2011).

A microbiota de deterioração, representada pelos indicadores *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae*, vira a sua redução ocorrer com os menores níveis de alta pressão aplicados. As *Pseudomonas* foram reduzidas a níveis inferiores a 1 log ufc/g com pressões de 202 MPa, como já foi referido anteriormente, e as *Enterobacteriaceae* com pressões de 260 MPa.

Brochothrix thermosphacta também faz parte dos indicadores de deterioração, no entanto, é uma bactéria Gram-positiva. Este microrganismo de natureza psicotrófica, sobrevive mesmo a baixas temperaturas. Neste trabalho os tratamentos com níveis de pressão de 260 MPa foram eficazes na redução deste microrganismo.

Enterococcus, como microrganismo Gram-positivo, persistiu aos tratamentos iniciais, verificando-se a sua redução até ao limite de deteção apenas no tratamento a 400 MPa durante 1800 s.

BAL e SCN fazem parte da microbiota tecnológica, porque estão envolvidos no desenvolvimento da qualidade sensorial e estabilidade de produtos cárneos fermentados. As bactérias ácido lácticas promovem a acidificação e sintetizam compostos do aroma e os SCN estão envolvidos no desenvolvimento de cor e flavor dos produtos cárneos fermentados, principalmente, pela degradação de aminoácidos livres e inibição da oxidação de ácidos gordos insaturados (Talon, Leroy & Lebert, 2007). A microbiota tecnológica persistiu até 400 MPa, sendo que a tratamentos com este nível de pressão mas com tempos superiores já se observou a sua redução a níveis inferiores a 1 log ufc/g. Este facto está de acordo com Mendonça (2012) que no seu trabalho concluiu que a microbiota tecnológica dos enchidos pressurizados diminuiu pouco com o aumento da pressão, contudo o aumento do tempo de tratamento teve uma maior influência na sua redução.

Em geral, verificou-se que para a redução dos microrganismos estudados neste trabalho foram necessários níveis de pressão de 400 MPa e tempos de tratamento de 1800 s.

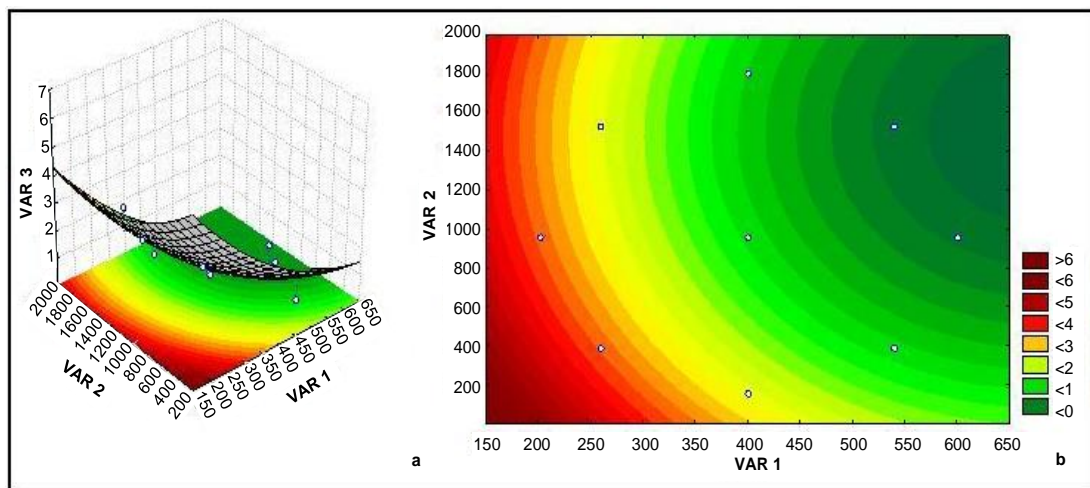
Os dados obtidos para cada um dos tratamentos foram analisados de acordo com a metodologia estatística RSM e na Tabela 4 apresentam-se os efeitos (coeficientes de regressão - termos lineares e quadráticos) e os respetivos níveis de significância (p) da pressão, do tempo e da interação pressão x tempo, relativamente à contagem microbiológica da tripa. Apenas se realizou a análise dos níveis de significância e dos coeficientes dos resultados das contagens de *Enterococcus* e BAL porque foram os microrganismos que não foram reduzidos a baixos níveis de pressão, e persistiram ao longo dos tratamentos.

Tabela 4 - Efeitos da pressão e do tempo dos tratamentos sobre a microbiota da tripa, pela análise dos níveis de significância (p) e do valor dos coeficientes considerados (R^2 e R^2_{adj})

Variável independente	Contagem microbiológica			
	<i>Enterococcus</i>		BAL	
		(p)		(p)
Pressão (termo linear)	-2,6309	0,0054	-4,0940	0,0010
Pressão (termo quadrático)	0,6307	0,3873	-0,1802	0,8097
Tempo (termo linear)	-1,1646	0,0909	-1,7501	0,0320
Tempo (termo quadrático)	0,6205	0,3828	-0,6190	0,4116
Pressão x Tempo	-0,0305	0,9709	0,5345	0,5560
R^2	0,8462		0,9195	
R^2_{adj}	0,6924		0,8390	

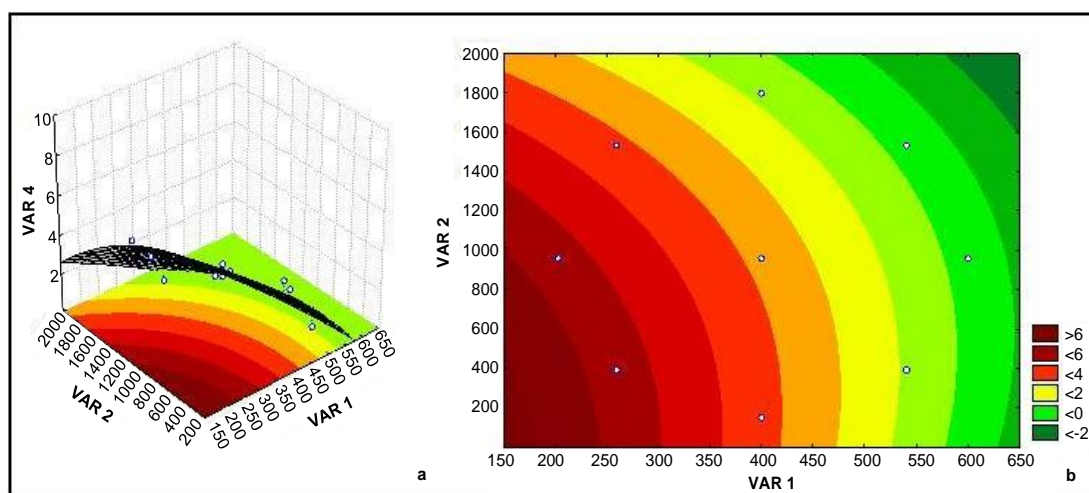
Os valores de R^2 para *Enterococcus*, observados na Tabela 4, indicam que o ajuste aos resultados experimentais não foi assim tão bom, uma vez que o valor de R^2_{adj} é inferior a 0,75, que é o limite mínimo em termos de qualidade do ajuste. O termo linear da pressão apresentou um nível de significância baixo na contagem de *Enterococcus*, o que significa que a redução deste microrganismo foi significativamente influenciada pelo nível de pressão do tratamento. O termo quadrático da pressão, o termo linear e o quadrático do tempo da contagem deste microrganismo não foram significativos. Pela Figura 13, onde se encontra a representação tridimensional e bidimensional da relação entre a contagem de *Enterococcus* e as variáveis independentes estudadas, confirmou-se que a pressão teve um papel mais proeminente na redução deste microrganismo do que o tempo de tratamento.

Figura 13 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre a população de *Enterococcus* (VAR3) das amostras de tripa



Pela observação dos valores de R^2 para BAL, na Tabela 4, reconheceu-se como bom o ajuste dos modelos aos resultados experimentais. O valor de R^2_{adj} para BAL igual a 0,839 indica que 83,9% das variações podem ser explicadas pelo modelo ajustado. O termo linear da pressão e do tempo na contagem de BAL foram significativos ($p < 0,05$), o que comprovou que a redução de BAL foi influenciada pelo nível de pressão e pelo tempo do tratamento. Os termos quadráticos da pressão e do tempo não foram significativos. Confirmando o que se verificou pela análise da Tabela 4, na Figura 14 podemos observar, principalmente na representação bidimensional, pelas zonas semi-circulares largas e bem definidas, que a redução de BAL foi influenciada pelo nível de pressão e pelo tempo do tratamento.

Figura 14 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre a população de BAL (VAR4) das amostras de tripa



De uma forma geral, a pressão influenciou significativamente os resultados das contagens microbiológicas analisadas, nomeadamente na redução de BAL e de *Enterococcus*, e o tempo do tratamento demonstrou apenas interferir na contagem de BAL, mas não de *Enterococcus*. Por outro lado, a interação pressão x tempo não teve influência na redução do teor dos dois microrganismos considerados.

A tecnologia de alta pressão hidrostática pode, então, ser considerada como benéfica para a melhoria da qualidade microbiológica da tripa, uma vez que a níveis de pressão não muito elevados (400 MPa) e tempos de tratamento de 1800 s o seu teor microbiano foi diminuído.

Patterson *et al.* (2006) referiram que o efeito letal do processo de alta pressão sobre os microrganismos tende a aumentar com o aumento do nível de pressão, mas não necessariamente com o aumento do tempo. Para além do mais sabe-se que a aplicação de alta pressão recorrendo a um longo tempo de pressurização não é nem económica nem comercialmente aceitável (Hoover *et al.*, 1989), pois o tempo de tratamento pode aumentar o custo do processo sem melhorar a eficiência de inativação. Assim, para aumentar a inativação microbiana é recomendado um aumento considerável da pressão num curto espaço de tempo. Atenda-se, no entanto, que níveis demasiado elevados de pressão são responsáveis pela desnaturação proteica e por outras mudanças prejudiciais na qualidade dos alimentos pressurizados (Norton & Sun, 2008). Todas estas considerações têm de ser levadas a cabo na escolha do melhor binómio pressão-tempo para a aplicação industrial de alta pressão hidrostática na tripa natural de suíno.

4.3 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre as propriedades mecânicas da tripa natural de suíno

A resistência mecânica da tripa natural de suíno foi um parâmetro avaliado neste trabalho para se perceber o efeito dos tratamentos de alta pressão sobre a estrutura física do material. A estrutura da tripa natural é a principal responsável pela sua flexibilidade e elasticidade, características muito importantes na definição da sua aptidão tecnológica.

A tripa natural, como matéria-prima de enchidos cárneos, necessita de ter uma boa resistência à tensão e pressão para conseguir suportar, principalmente, a etapa do processo de enchimento.

Os valores de resistência à tensão e de alongamento de um material são dependentes da sua estrutura química e física (Santos *et al.*, 2008).

Na Tabela 5 encontram-se apresentados os resultados das análises à resistência mecânica para as amostras de tripa de controlo e para as tratadas com alta pressão.

Tabela 5 - Média e desvio-padrão dos resultados das medições da força máxima de tensão (F_T), do alongamento (ϵ) e da força máxima de perfuração (F_P) das amostras de tripas de controlo e das tratadas com alta pressão (n= 3, exceção feita ao tratamento 400 MPa e 960 s com n = 9)

Pressão (MPa)	Tempo (s)	F_T (N \pm σ)	ϵ (mm \pm σ)	F_P (N \pm σ)
0,1	0	14,863 \pm 2,777	21,238 \pm 2,330	2,544 \pm 0,559
202	960	12,088 \pm 2,045	20,760 \pm 1,817	2,533 \pm 0,488
260	390	12,574 \pm 1,941	20,735 \pm 2,197	2,973 \pm 0,507
260	1530	12,600 \pm 1,511	19,835 \pm 2,508	2,667 \pm 0,537
400	154	13,205 \pm 4,503	17,840 \pm 2,235	2,622 \pm 0,632
400	960	14,402 \pm 2,071	18,928 \pm 2,696	2,743 \pm 0,711
400	1800	14,196 \pm 1,848	22,581 \pm 2,237	2,482 \pm 0,510
540	390	12,960 \pm 2,068	19,497 \pm 1,836	2,462 \pm 0,569
540	1530	13,850 \pm 2,482	23,492 \pm 4,328	2,378 \pm 0,502
600	960	13,940 \pm 1,092	24,079 \pm 1,859	2,870 \pm 0,613

Da observação geral dos valores notou-se que não se verificaram grandes alterações nos parâmetros medidos com os tratamentos de alta pressão. Ao nível da F_T , nos tratamentos com níveis de pressão mais baixo verificou-se uma ligeira diminuição, por comparação com as amostras de controlo, mas a partir de 400 MPa a F_T voltou a aumentar, aproximando-se bastante do valor registado nas amostras de controlo. No caso do ϵ ocorreu um aumento acentuado nos tratamentos com níveis de pressão mais elevados. Dos três parâmetros medidos, a F_P foi o parâmetro que sofreu menos variação com os diferentes tratamentos.

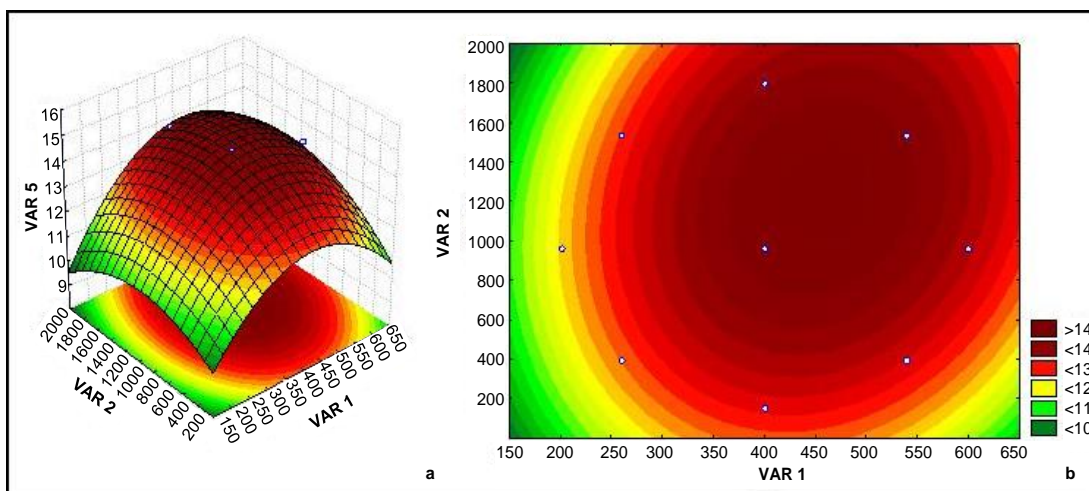
Na Tabela 6 estão apresentados os efeitos (coeficientes de regressão - termos lineares e quadráticos) e os respectivos níveis de significância (p) da pressão, do tempo e da interação pressão x tempo, relativamente aos parâmetros da resistência mecânica da tripa, após ter sido realizada a análise dos dados obtidos para os diferentes tratamentos de acordo com a metodologia estatística RSM.

Tabela 6 - Efeitos da pressão e do tempo dos tratamentos sobre a F_T , o ε e a F_P , pela análise dos níveis de significância (p) e do valor dos coeficientes considerados (R^2 e R^2_{adj})

Variável independente	Parâmetros da resistência mecânica da tripa					
	F_T		ε		F_P	
		(p)		(p)		(p)
Pressão (termo linear)	1,0778	0,0180	1,8133	0,0280	-0,0699	0,7821
Pressão (termo quadrático)	-1,5582	0,0048	3,2521	0,0057	-0,0366	0,9026
Tempo (termo linear)	0,6439	0,0632	2,3901	0,0097	-0,1319	0,6032
Tempo (termo quadrático)	-0,8546	0,0422	1,0363	0,1906	-0,1930	0,5172
Pressão x Tempo	0,3747	0,3767	2,4062	0,0351	0,1947	0,5914
R^2	0,9025		0,9183		0,2001	
R^2_{adj}	0,8050		0,8366		0,0000	

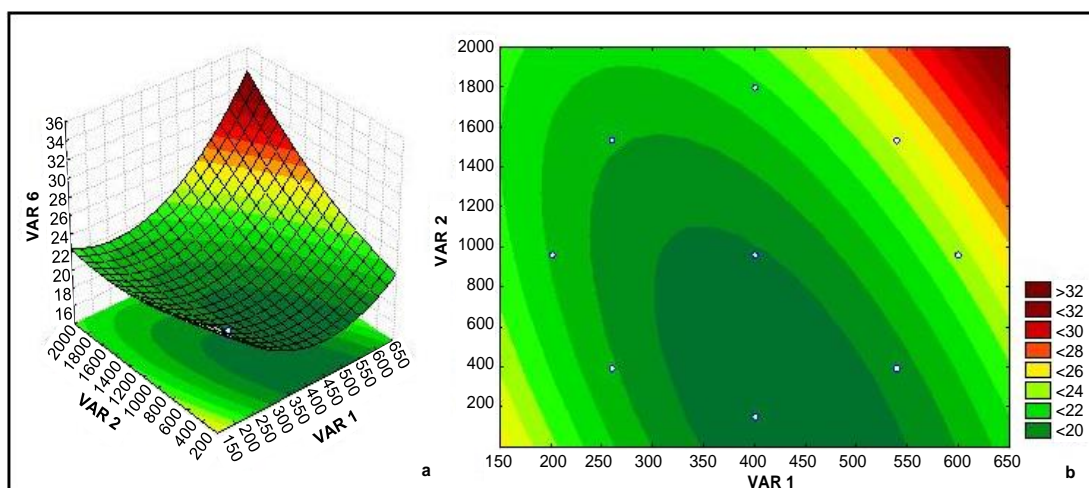
Verificou-se que o valor de R^2_{adj} para a F_T foi superior a 0,75, por isso considerou-se o ajuste como adequado. O termo linear da pressão foi significativo para a F_T ($p < 0,05$), no entanto, o termo linear do tempo não foi significativo. Para o mesmo parâmetro da resistência mecânica da tripa, os níveis de significância dos termos quadráticos da pressão e do tempo foram inferiores a 0,05, o que significa que quer a pressão quer o tempo do tratamento induziram variações significativas nos valores de F_T . Comparando os termos quadráticos considerados, observou-se que o nível de significância do tempo foi muito superior ao da pressão, deste modo o nível de pressão influenciou mais este parâmetro do que o tempo de tratamento, como pode ser observado na Figura 15 pela representação bidimensional. Ainda nesta figura podemos observar, na representação tridimensional, que a níveis de pressão baixos ou muito elevados a F_T diminuiu, verificando-se o seu máximo a níveis de pressão entre os 400 e 500 MPa. Este resultado foi positivo porque com níveis de pressão consideráveis no processamento de alimentos (400 MPa) este parâmetro da resistência mecânica da tripa foi afetado positivamente. Há a referir ainda que a interação entre as variáveis independentes não foi significativa na F_T .

Figura 15 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre a força máxima de tensão (VAR5) das amostras de tripa



Pelos valores de R^2 para o ϵ , apresentados na Tabela 6, podemos concluir que existiu um bom ajuste do modelo aos resultados experimentais, sendo o valor de R^2_{adj} igual a 0,8366, ou seja, aproximadamente, 83,7% das variações podem ser explicadas pelo modelo ajustado. Verificou-se que o termo linear da pressão e do tempo foram significativos para o ϵ ($p < 0,05$), como pode ser confirmado pela representação bidimensional da Figura 16, pois é visível que o ϵ foi influenciado pela pressão e pelo tempo do tratamento. O termo quadrático da pressão deste parâmetro também foi significativo, o mesmo não se pode afirmar para o termo quadrático do tempo. No que diz respeito à interação entre a pressão e o tempo, esta revelou-se significativa demonstrando que influenciou os valores do ϵ , o que pode ser observado pela forma das curvas apresentadas na representação bidimensional da Figura 16.

Figura 16 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o alongamento (VAR6) das amostras de tripa



Na representação tridimensional da Figura 16 podemos visualizar que o ϵ foi máximo com níveis de pressão e tempos de tratamento elevados, o que foi considerado positivo uma vez que os tratamentos de alta pressão hidrostática não afetaram negativamente este parâmetro da resistência mecânica da tripa.

Ao nível da F_p o valor de R^2_{adj} foi nulo, o que significa que não foi possível ajustar o modelo aos resultados experimentais.

Os resultados obtidos no teste de tensão radial de largura e no teste de perfuração das amostras de tripa demonstraram que os diferentes tratamentos de pressão-tempo estudados não afetaram de forma negativa a estrutura das tripas. Este aspeto é positivo, uma vez que se pode considerar a aplicação de tratamentos de alta pressão sem degradar a resistência mecânica destas. Bakker *et al.* (1999) estudaram o efeito de vários fatores (temperatura e tempo de armazenamento, diferentes métodos de cura, adição ou não de aditivos) sobre a resistência mecânica da tripa natural de suíno e ovino e não reportaram variações significativas no valor máximo de rutura das amostras tratadas comparativamente com as amostras de controlo.

É necessário notar que existe uma variação natural inerente a cada segmento de tripa, que faz com que até no segmento do mesmo animal existam diferenças de resistência. Todas as conclusões retiradas em relação à resistência mecânica não têm em conta a diferença de colagénio entre diferentes segmentos de tripa, o que parece evidenciar que seria necessário ter acoplado aos testes realizados um teste quantitativo de colagénio e estabelecer, posteriormente, uma relação para conseguirmos comparar a resistência entre segmentos. Como alternativa mais rudimentar, que foi em parte a solução encontrada e feita, aparece a medição da espessura de cada segmento. Apesar da espessura dos segmentos ter sido medida, esta não foi diretamente relacionada com as medições dos parâmetros de resistência porque não existiram diferenças notáveis entre a espessura dos diferentes segmentos.

Existem alguns estudos sobre o efeito da alta pressão hidrostática nas propriedades mecânicas de estruturas poliméricas, uma vez que a aplicação de alta pressão é feita maioritariamente em alimentos pré-embalados e importa garantir que a pressão não afeta a integridade e as propriedades mecânicas e de barreira da embalagem.

Ao nível dos polímeros, vários trabalhos têm demonstrado que as propriedades mecânicas dos compostos da matriz polimérica são fortemente afetadas pela alta pressão hidrostática (Shin & Pae, 1992; Sigley, Wronski & Parry, 1992). Tem sido sugerido que a alta pressão aumenta as tensões normais e de corte, aumentando a aderência entre as fibras e a matriz, e reduz a ocorrência de falhas, como microfissuras, pois fecha-as e aumenta a quantidade de trabalho necessária para se dar o crescimento das mesmas (Hoppel, Bogetti & John, 1995).

Masuda, Saito, Iwanami & Hirai (1992) mediu a resistência à tensão em filmes poliméricos PP/EVOH/PP (PP- polipropileno; EVOH – copolímero de etileno e álcool vinílico) após serem submetidos a tratamentos de alta pressão (400 a 600 MPa, 10 minutos, a 20 e 40 °C), tendo concluído que este parâmetro não foi afetado.

Mertens (1993) avaliou o efeito do tratamento de alta pressão (400 MPa, 30 minutos, a 60 °C) sobre as propriedades mecânicas de várias estruturas poliméricas e não observou alterações na sua resistência à tensão, alongamento e integridade.

Lambert *et al.* (2000) estudaram o efeito da alta pressão (200, 350 e 500 MPa, 30 minutos, à temperatura ambiente) em filmes poliméricos PA/PE e reportaram um aumento inferior a 25% na resistência à tensão da estrutura, o que a torna mais rígida e menos flexível. Pode-se dizer que, na tripa pressurizada neste trabalho, se observou também um aumento na resistência à tensão, a níveis de pressão da ordem dos 400 MPa.

A resistência à tensão dos polímeros tem tendência a aumentar com o aumento da pressão hidrostática, atribuindo-se este facto aos efeitos da pressão sobre a mobilidade molecular (Sauer, 1977). A pressões elevadas as cadeias moleculares são forçadas a juntarem-se, reduzindo a sua mobilidade.

4.4 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre a cor da tripa natural de suíno

Um dos inconvenientes apontados à aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática na indústria alimentar é a alteração de cor dos alimentos e, por isso, neste trabalho foi averiguado o efeito dos diferentes tratamentos de alta pressão sobre a cor da tripa natural de suíno.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados das medições dos parâmetros da cor das amostras de controlo e das amostras tratadas com alta pressão. Geralmente, as tripas naturais apresentam um valor de a^* e de b^* positivos, o que se observou também neste trabalho, tendo sido medidos o índice de vermelho e de amarelo, respetivamente. Normalmente, nas tripas o valor de b^* é superior ao valor de a^* com predominância da cor amarela sobre a vermelha, o que também se verificou nas amostras estudadas, embora nas amostras de controlo essa diferença não se tenha verificado, apresentando ambos os parâmetros valores da mesma grandeza.

Tabela 7 - Média e desvio-padrão dos resultados das medições dos parâmetros de cor avaliados nas amostras de tripa de controlo e nas tratadas com alta pressão (n= 3, exceção feita ao tratamento 400 MPa e 960 s com n = 9)

Pressão (MPa)	Tempo (s)	L*	a*	b*	Chroma	Hue
0,1	0	56,58 ± 2,210	10,84 ± 2,204	10,65 ± 2,513	15,71 ± 0,625	44,68 ± 11,926
202	960	64,31 ± 0,905	6,54 ± 0,382	10,64 ± 1,096	12,35 ± 1,202	58,75 ± 1,061
260	390	66,59 ± 2,178	6,10 ± 0,735	11,14 ± 0,106	12,69 ± 0,191	60,95 ± 1,768
260	1530	64,48 ± 0,629	6,63 ± 1,400	10,70 ± 0,134	12,59 ± 0,453	59,50 ± 7,354
400	154	64,42 ± 3,041	6,89 ± 1,909	10,43 ± 0,269	12,67 ± 1,393	56,65 ± 6,435
400	960	58,68 ± 3,388	7,60 ± 1,396	20,69 ± 3,425	22,11 ± 3,477	69,60 ± 2,938
400	1800	61,23 ± 1,726	6,55 ± 0,684	23,38 ± 0,707	24,61 ± 0,236	74,53 ± 1,620
540	390	61,87 ± 0,255	7,71 ± 0,311	17,26 ± 0,728	18,74 ± 0,728	66,25 ± 0,071
540	1530	66,05 ± 0,467	4,39 ± 0,028	11,69 ± 0,375	12,59 ± 0,354	69,10 ± 0,990
600	960	63,89 ± 1,103	7,27 ± 0,240	11,42 ± 0,106	13,67 ± 0,219	57,25 ± 0,495

Pela observação da Tabela 7, constatou-se que os valores de L* das amostras tratadas foram superiores ao das amostras de controlo, o que nos dá uma indicação geral do aumento de L* com a pressão. Assim, as tripas com a pressão refletem mais a luz incidente, o que pode ser consequência de uma maior quantidade de água à superfície, com aumento da reflexão da luz, ou de uma alteração na cor da tripa induzida por oxidação de pigmentos. Pelos valores obtidos na medição de a*, comparando amostras de controlo com amostras tratadas, determinou-se que este parâmetro diminuiu com a alta pressão, dando informação de que houve perda da cor vermelha das tripas talvez por oxidação da mioglobina existente nas mesmas.

Na observação dos resultados obtidos nas medições de b* e do valor de chroma concluímos que, em relação às amostras de controlo, as amostras tratadas não apresentaram grandes diferenças, com exceção a três tratamentos (400 MPa e 960 s; 400 MPa e 1880 s; 540 MPa e 390 s), onde os valores de ambos os parâmetros se revelaram mais elevados. O aumento do valor de b* nas três condições de alta pressão referidas assinalou um aumento da cor amarela da tripa, que poderia ser reflexo da perda da cor vermelha que, como já vimos, se verificou com a alta pressão. O aumento do valor de chroma com a pressão indicou que se verificou um aumento no grau de saturação da cor.

O valor do ângulo de Hue aumentou em todos os tratamentos de alta pressão, comparativamente com as amostras de controlo, o que confirmou a ocorrência da passagem da cor vermelha a amarela com a alta pressão.

Após ter sido realizada a análise dos dados obtidos para os diferentes tratamentos de acordo com a metodologia estatística RSM, na Tabela 8 são apresentados os efeitos

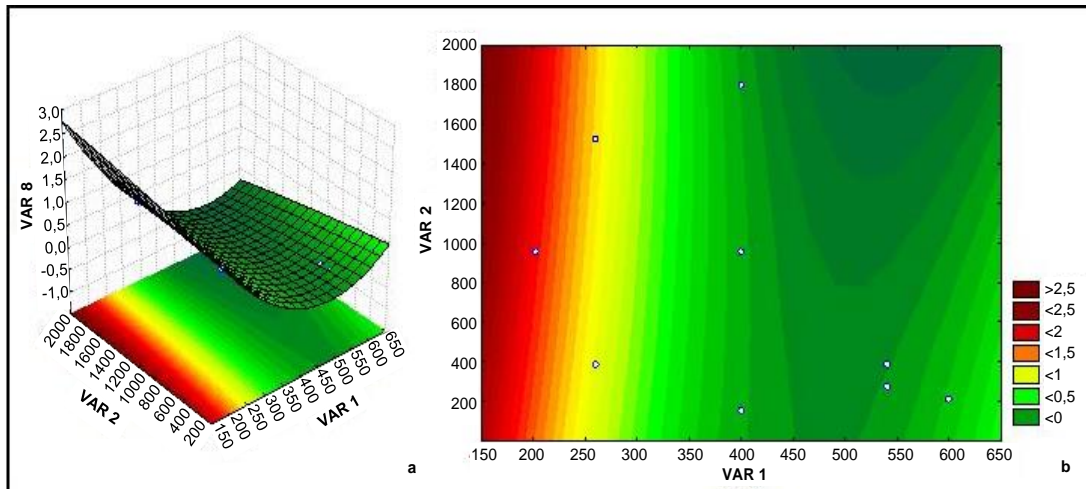
(coeficientes de regressão - termos lineares e quadráticos) e os respectivos níveis de significância (p) da pressão, do tempo e da interação pressão x tempo, relativamente aos parâmetros de cor da tripa.

Tabela 8 - Efeitos da pressão e do tempo dos tratamentos sobre os parâmetros de cor da tripa avaliados, L*, a*, b*, valor de chroma e ângulo de Hue, pela análise dos níveis de significância (p) e do valor dos coeficientes considerados (R^2 e R^2_{adj})

Variável independente	Parâmetros de cor avaliados na tripa									
	L*		a*		b*		Chroma		Hue	
		(p)		(p)		(p)		(p)		(p)
Pressão (termo linear)	-1,3062	0,0002	-4,3325	0,0005	-4,4059	0,0032	-6,0901	0,0022	15,9892	0,0465
Pressão (termo quadrático)	0,8082	0,0009	-1,0452	0,0681	0,0754	0,9175	-1,6907	0,1128	-0,3456	0,9483
Tempo (termo linear)	-0,0357	0,7803	-2,6766	0,0024	-2,2885	0,0218	-3,9543	0,0079	13,1758	0,0562
Tempo (termo quadrático)	-0,0493	0,7586	0,3930	0,5366	1,5153	0,1566	-1,4684	0,2604	-9,1847	0,2266
Pressão x Tempo	-0,3101	0,2046	-1,8196	0,0800	-1,3097	0,3512	-1,8593	0,3035	14,6191	0,1782
R²	0,9903		0,9656		0,8611		0,9512		0,7825	
R²_{adj}	0,9806		0,9313		0,7401		0,9023		0,5649	

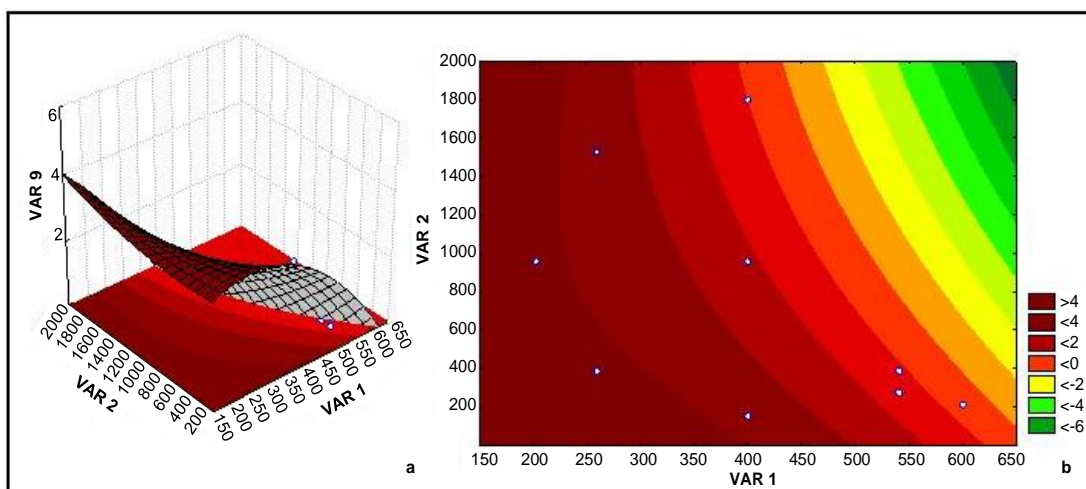
De acordo com os resultados estatísticos obtidos, verificou-se que os valores de R^2 para L* foram bastante elevados o que demonstrou a existência de uma elevada correlação entre os resultados experimentais e os resultados previstos pelos modelos. O termo linear e quadrático da pressão foram significativos na medição de L*, enquanto o termo linear e quadrático do tempo não foram significativos, ou seja, o tempo do tratamento não influenciou significativamente os resultados de L*, mas o nível de pressão influenciou bastante estes resultados. A influência referida anteriormente pode ser observada na Figura 17, principalmente na representação bidimensional pelas zonas definidas na vertical, onde se verificou que pontos no mesmo nível de pressão mas em tempos de tratamento diferentes apresentaram o mesmo valor de L*. A interação entre as variáveis independentes estudadas para L* não foi significativa.

Figura 17 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o índice de luminosidade (VAR8) das amostras de tripa



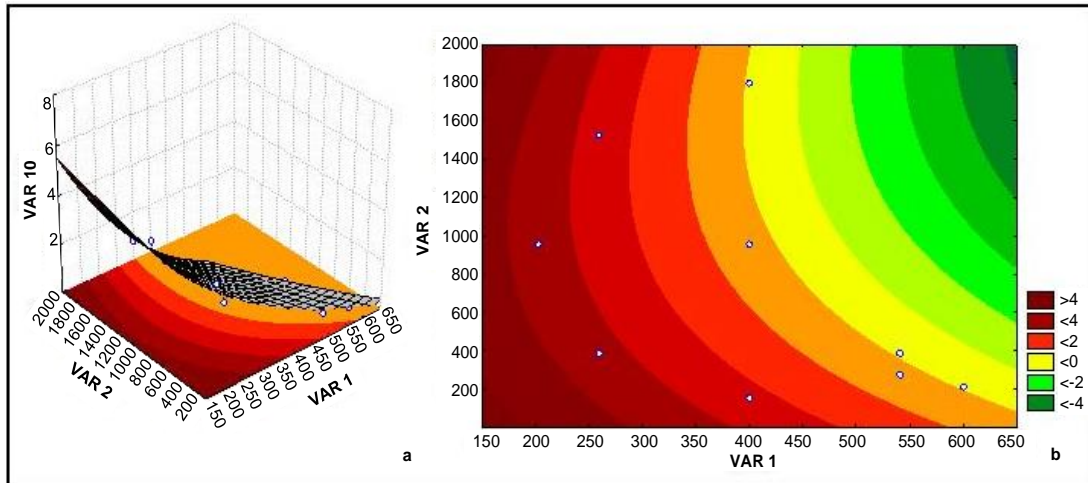
Os valores de R^2 para a^* , apresentados na Tabela 8, demonstraram um bom ajuste do modelo aos resultados experimentais. O termo linear da pressão e do tempo para a^* foram significativos, por outro lado os termos quadráticos não o foram. Na Figura 18, pela representação bidimensional, podemos observar que o nível de pressão influenciou os valores de a^* . Visível também é a influência do tempo de tratamento nos valores de a^* , mas só pronunciada com pressões a partir dos 500 MPa. Na representação tridimensional é claramente visível a diminuição do parâmetro considerado com a pressão, o que confirma a perda da cor vermelha das amostras de tripa com a pressão já anteriormente referida pela observação geral dos valores de a^* . A interação pressão x tempo não se revelou significativa para a^* .

Figura 18 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o índice de vermelho (VAR9) das amostras de tripa



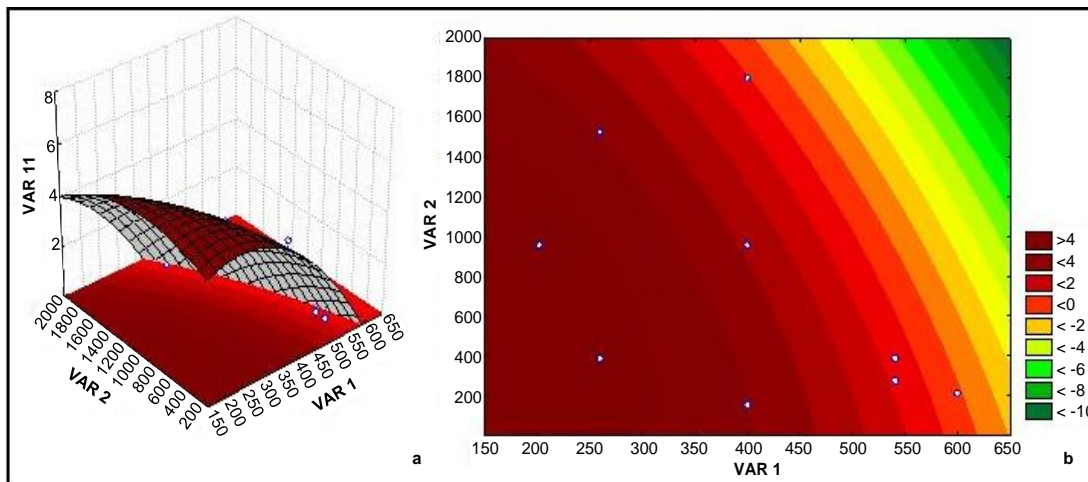
Pela Tabela 8 observamos que o valor de R^2_{adj} para b^* foi próximo de 0,75, assim, o ajuste do modelo aos resultados experimentais não foi o melhor mas este foi considerado. O termo linear da pressão e do tempo foram significativos nos resultados de b^* . Os termos quadráticos para este parâmetro não foram significativos. Na Figura 19 podemos confirmar que os valores de b^* foram influenciados pela pressão e pelo tempo de tratamento. A interação entre as variáveis independentes não foi significativa para b^* .

Figura 19 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o índice de amarelo (VAR10) das amostras de tripa



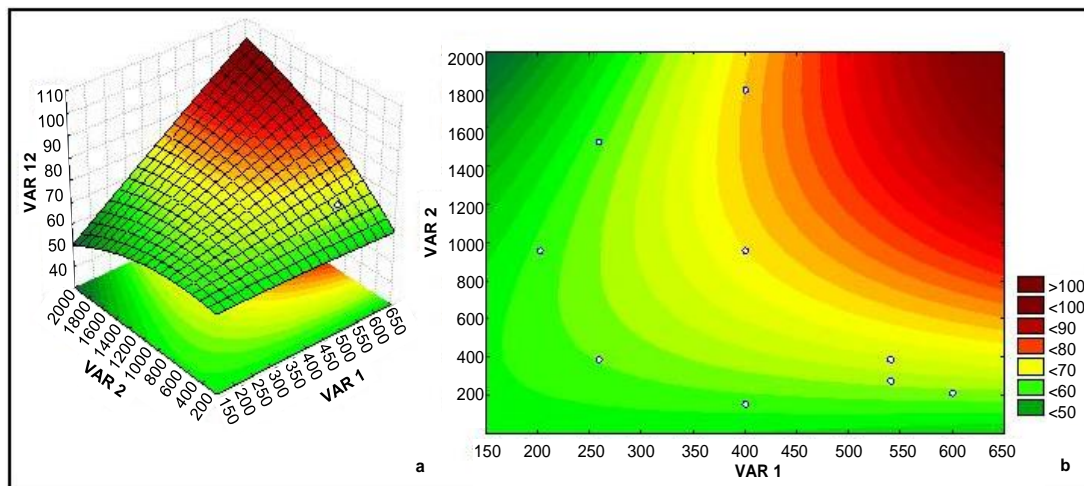
Os valores de R^2 para chroma, observados na Tabela 8, fizeram-nos considerar o modelo como bem ajustado aos resultados experimentais. O termo linear da pressão e do tempo foram significativos para os valores de chroma, enquanto os termos quadráticos não foram significativos. O nível de pressão e o tempo de tratamento influenciaram os valores de chroma, o que pode ser observado na representação bidimensional da Figura 20. A interação entre as variáveis independentes estudadas para este parâmetro de cor não foi significativa.

Figura 20 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o valor de chroma (VAR11) das amostras de tripa



Os valores de R^2 para o valor de Hue indicam um mau ajuste dos modelos aos resultados experimentais. Apesar disto a Figura 21, onde está a representação bidimensional e tridimensional da relação entre o ângulo de Hue e as variáveis independentes estudadas, é apresentada seguidamente pois confirma que o ângulo de Hue verificou um aumento com a pressão.

Figura 21 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o valor do ângulo de Hue (VAR12) das amostras de tripa



Como não existem estudos documentados sobre o efeito das altas pressões na variação da cor da tripa, optamos por comparar os nossos resultados com os descritos para carne e produtos cárneos.

São vários os trabalhos, que tal como neste, reportam um aumento de L^* com a alta pressão. Esta alteração está diretamente relacionada com a desnaturação proteica. A alta pressão provoca uma degradação das proteínas miofibrilares, levando a um aumento do índice de luminosidade da carne (Campus *et al.*, 2008, Grossi *et al.*, 2012).

Uma diminuição significativa no a^* foi reportada na carne de bovino picada após tratamentos de 400 a 500 MPa, durante 10 minutos, a 10 °C (Carlez *et al.*, 1995). Estes resultados foram confirmados por Jung *et al.* (2003) em amostras de carne de bovino e estes autores atribuíram esta diminuição à oxidação de mioglobina ferrosa a metamioglobina férrica, resultando numa coloração mais acastanhada. Estes estudos concordam com os resultados obtidos para a cor da tripa, uma vez que se observou uma diminuição significativa do valor de a^* com os tratamentos de alta pressão.

Um aumento de b^* induzido pela alta pressão foi observado por Goutefongea *et al.* (1995) em carne de bovino e suíno fresca picada tratada a 600 MPa, durante 30 minutos a 20 °C e por Fernández *et al.* (2007) em carne de bovino fresca salgada, pressurizada a 650 MPa,

durante 10 minutos a 20 °C. Também nos resultados obtidos neste trabalho se verificou um aumento de b^* com a alta pressão.

A alteração de cor é um dos inconvenientes da tecnologia de alta pressão na aplicação em produtos cárneos, com vários autores a reportarem esse efeito nos produtos pressurizados, comparativamente com as amostras de controlo, uma diminuição de a^* e um aumento de b^* , com ou sem alteração de L^* . Também neste trabalho detetámos alterações significativas na cor da tripa com os tratamentos de alta pressão, uma tripa mais amarelada, por oposição à tripa rosada não pressurizada.

4.5 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre a microestrutura da tripa natural de suíno

Foi importante a realização de análises histológicas neste trabalho para se perceber se a microestrutura da tripa natural de suíno tinha sido alterada sob o efeito dos diferentes tratamentos de alta pressão. Recorreu-se a técnicas histológicas para preparação dos cortes das amostras a fim de preservar ao máximo as características da estrutura viva e possibilitar a sua observação microscópica.

A nível geral, depois de terem sido observados ao microscópio todos os cortes histológicos das amostras que foram sujeitas às diferentes condições estabelecidas, verificou-se que estruturalmente não existiram diferenças entre os vários tratamentos e comparativamente às amostras de controlo.

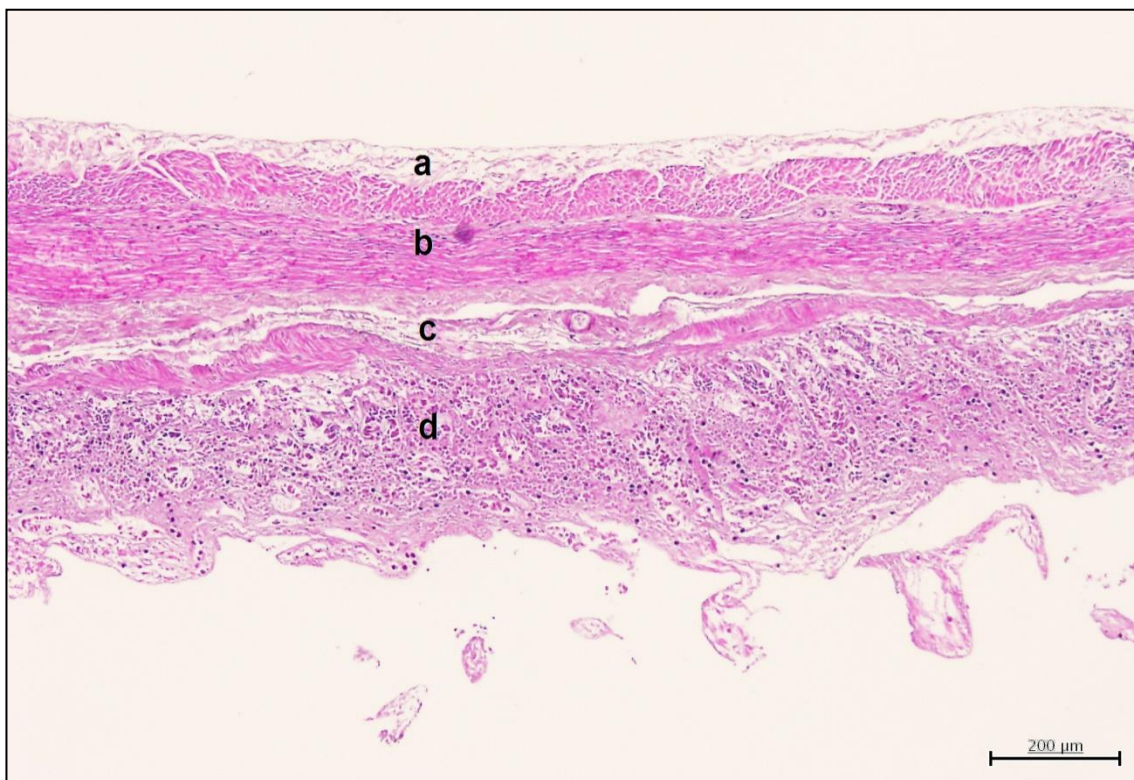
Antes de observarmos as fotografias selecionadas para ilustrar este trabalho é fundamental focar a nossa atenção sobre as estruturas histológicas do intestino, pelo que aqui fica uma pequena síntese. A serosa é a túnica mais externa que cobre o trato intestinal. A muscular é composta por duas túnicas de músculo liso, uma túnica interna com orientação circular e uma túnica externa com orientação longitudinal. A submucosa, que se encontra sobre a muscular, tem a microestrutura caracterizada por rede de fibras de colagénio, elastina, nervos e vasos sanguíneos de diferentes tamanhos. A mucosa é a túnica mais interna do trato intestinal, nela encontram-se as glândulas intestinais e as vilosidades, com o epitélio assente na lâmina própria de tecido conjuntivo provido de vasos sanguíneos e linfáticos (Junqueira & Carneiro, 2005).

Na Figura 22 podemos observar o corte histológico da amostra de tripa proveniente do matadouro e não sujeita a tratamento de alta pressão, dita de controlo, reconhecendo-se as várias túnicas do intestino delgado: serosa, muscular, submucosa e mucosa. Nesta figura é visível a destruição das vilosidades intestinais da mucosa. Esta alteração de estrutura pode ter sido consequência do esmagamento provocado pela passagem nas máquinas de cilindros, na linha de processamento da tripa. Apesar disto, observou-se o perfil de algumas células glandulares na mucosa. A estrutura de colagénio da submucosa apresentou-se muito laxa e dispersa.

Naghski (1971) refere que uma tripa delgada de suíno de boa qualidade é formada pela submucosa, as restantes túnicas devem ser eliminadas durante as operações de limpeza e preparação. Geralmente, a tripa de suíno depois de passar pelas máquinas de processamento industrial fica constituída apenas pela túnica submucosa, no entanto, isso não foi o verificado para as amostras utilizadas neste trabalho, uma vez que a Figura 22 mostra a preservação de todas as túnicas histológicas da tripa. Isto leva-nos a crer que as amostras rececionadas não passaram por todas as etapas do processamento considerado como habitual para a tripa natural de suíno. Admite-se, talvez, que apenas sofreram um tratamento primário, pois a passagem pela primeira máquina de cilindros da linha do processamento é caracterizada pela alteração da túnica mucosa com destruição da estrutura das vilosidades intestinais, que foi o observado nesta amostra. A passagem na segunda máquina está associada à eliminação da gordura e à raspagem da túnica serosa, o que excluí a hipótese das amostras terem sofrido esta segunda etapa pois elas apresentaram tecido adiposo anexo à túnica serosa.

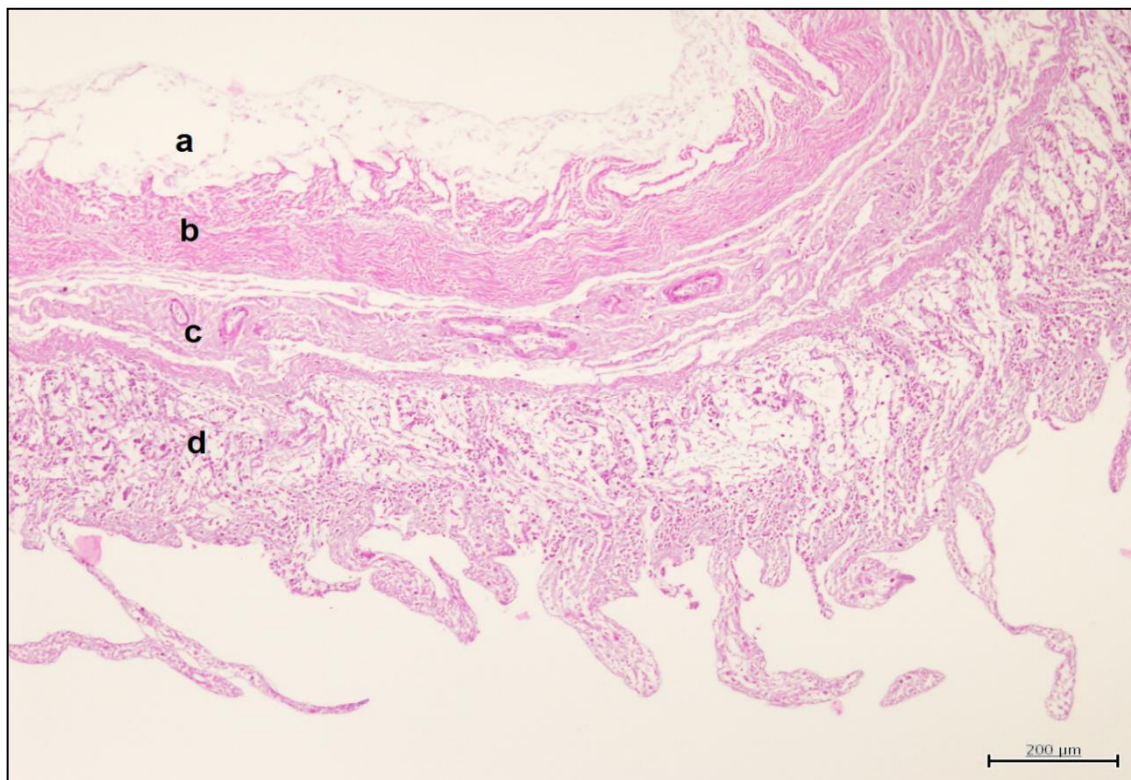
As amostras de tripa usadas no trabalho sofreram o mesmo processamento e, por isso, inicialmente apresentaram igual redução da mucosa e do tecido linfóide. Como pode ser observado pela Figura 22, ocorreu persistência da túnica mucosa e tecido linfóide.

Figura 22 - Microfotografia do corte histológico da amostra de tripa de controlo com observação das seguintes túnicas: serosa (a), muscular (b), submucosa (c), mucosa (d), H&E



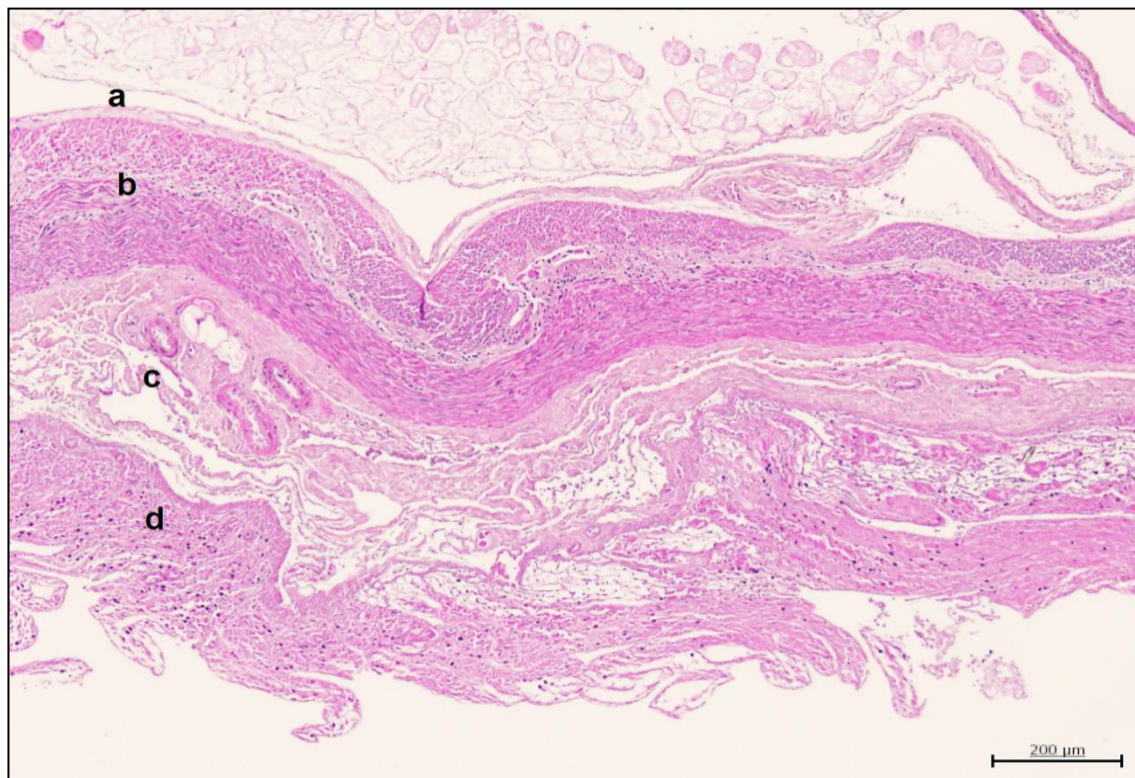
Na Figura 23 podemos observar o corte histológico da amostra de tripa submetida ao tratamento com o menor nível de pressão (tratamento de 202 MPa e 960 s). Nesta figura podemos visualizar as diferentes túnicas e perceber que estruturalmente não existem grandes alterações em relação à amostra de controle, destacando-se igualmente a desintegração da túnica mucosa com destruição das vilosidades intestinais. Na túnica submucosa, rica em fibras de colagénio, é bastante visível a persistência dos vasos sanguíneos. Talvez a diferença mais marcada, em relação à amostra de controle, esteja no maior destacamento da túnica serosa com desagregação das fibras e hialinização das células adiposas anexas a esta túnica.

Figura 23 - Microfotografia do corte histológico da amostra de tripa submetida ao tratamento de 202 MPa e 960 s, onde se destacam serosa (a), muscular (b), submucosa (c) e mucosa (d), H&E



A Figura 24 diz respeito à microfotografia da amostra de tripa submetida ao tratamento com nível de pressão mais elevado, de 600 MPa e 960 s. Pela observação desta figura destacam-se a preservação do tecido adiposo e o elevado grau de dispersão da túnica submucosa. Apesar de tudo, não foram observadas grandes variações em relação às estruturas histológicas da amostra de controle.

Figura 24 - Microfotografia do corte histológico da amostra de tripa submetida ao tratamento de 600 MPa e 960 s com visualização das seguintes túnicas: serosa (a), muscular (b), submucosa (c), mucosa (d), H&E



Em geral, verificou-se em todas as amostras perda celular relevante, mas com preservação do colagénio e das fibras musculares. Observando os cortes histológicos das diferentes amostras constatou-se que não existiram alterações na estrutura histológica com os tratamentos de alta pressão

As tripas de suíno são constituídas basicamente por proteínas do tecido conjuntivo, 90% de colagénio e 5% de elastina (Houben *et al.*, 2005). O facto de não se terem detetado diferenças entre as amostras de controlo e as tratadas já era previsível, uma vez que tem sido relatado, por vários autores nos seus estudos, que as proteínas do tecido conjuntivo, como o colagénio, a elastina e a reticulina, não são alteradas pela alta pressão (Carlez *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 2003; Neto *et al.*, 2011). Admite-se que poderão existir diferenças ultraestruturais que apenas poderiam ser confirmadas pela observação ao microscópio eletrónico.

4.6 - Efeito dos tratamentos de alta pressão hidrostática sobre o ângulo de contacto de superfície da tripa natural de suíno

O ângulo de contacto foi determinado nas amostras de tripa de controlo e nas amostras tratadas para se compreender de que forma a superfície destas era alterada com os tratamentos de alta pressão. A alteração da superfície com a pressão, em termos de estruturas polar e apolares, pode estar diretamente relacionada com a alteração dos fenómenos de adesão e absorção, tendo importância ao nível da proliferação da microbiota endógena e exógena e ao nível do estabelecimento da ligação entre a tripa e a massa do enchido cárneo, que a utiliza como matéria-prima.

Na Tabela 9 encontram-se os valores do ângulo de contacto medidos nas amostras de tripa de controlo e nas amostras tratadas.

Através da observação geral da Tabela 9 podemos apurar que não existiram grandes variações nos valores medidos dos ângulos de contacto quer na superfície exterior, quer na interior, à exceção dos ângulos de contacto medidos no líquido apolar para a superfície interior onde os valores apresentaram uma grande discrepância. O facto de não existir uma variação constante nos valores obtidos para os ângulos de contacto poderá ser reflexo da instabilidade da superfície em termos de estrutura, evidenciando uma grande complexidade de estruturas polares e apolares. Para se chegar a mais conclusões através da medição do ângulo de contacto interessaria fazer a caracterização da superfície, ao nível da quantificação de estruturas polares e apolares. Recorrendo ao exemplo da tripa natural seca, podemos comparar com a fresca na avaliação deste parâmetro e perceber que é uma superfície mais padronizada em termos de estruturas polares e apolares, sendo os resultados obtidos para esta mais concretos e fáceis de interpretar.

Tabela 9 - Média dos ângulos de contacto medidos em água (θ_{H_2O}) e em bromonaftaleno (θ_b), na superfície exterior e interior, das amostras de tripa de controlo e das tratadas com alta pressão (n= 3, exceção feita ao tratamento 400 MPa e 960 s com n = 9)

Pressão (MPa)	Tempo (s)	Superfície exterior		Superfície interior	
		θ_{H_2O}	θ_b	θ_{H_2O}	θ_b
0,1	0	58,54	49,19	59,33	40,12
202	960	52,62	52,51	56,14	41,3
260	390	48,71	62,63	59,50	55,2
260	1530	53,35	49,24	31,38	*
400	154	51,73	61,96	44,91	17,66
400	960	44,32	42,88	66,17	69,79
400	1800	47,92	44,96	59,89	41,77
540	390	44,39	38,14	50,78	40,94
540	1530	45,99	38,37	66,33	76,45
600	960	43,03	35,87	60,97	103,99

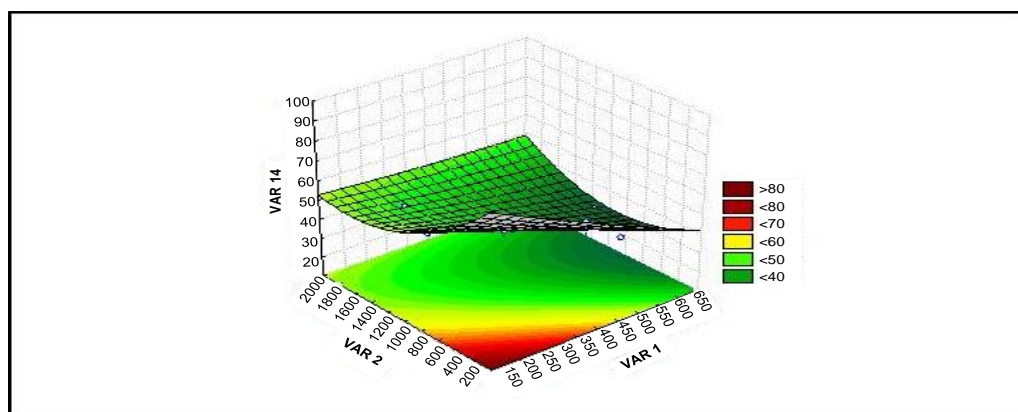
* - Problemas nas amostras impossibilitaram a realização desta medição

Excluindo dois tratamentos (260 MPa e 390 s; 400 MPa e 154 s), na superfície exterior os valores dos ângulos de contacto no líquido polar foram superiores aos medidos no líquido apolar. Também na superfície interior o mesmo se verificou com exceção dos últimos tratamentos, onde os valores medidos no líquido apolar pareceram estar errados por dispersarem muito em relação a todos os outros. O facto dos valores medidos no líquido polar terem sido superiores aos medidos no líquido apolar poderá significar que a superfície da tripa apresenta mais estruturas polares do que apolares. Este resultado foi o esperado uma vez que as tripas utilizadas neste trabalho eram frescas, ou seja, tinham um teor de humidade elevado (89,2% de humidade, valor reportado para tripas de suíno frescas por Fraqueza, 1992) e apresentavam um elevado valor de a_w .

Foi realizada a análise estatística dos resultados dos ângulos de contacto para os diferentes tratamentos, no entanto, à exceção dos ângulos de contacto medidos em bromonaftaleno para a superfície exterior, não se conseguiram ajustar modelos adequados aos resultados experimentais.

Os ângulos de contacto da superfície exterior da tripa medidos no líquido apolar, apresentaram um valor de R^2_{adj} igual a 0,8561, por isso o modelo adotado foi considerado ajustado aos resultados experimentais. O termo linear da pressão foi igual a 0,0019 e, por isso, a pressão foi considerada como significativamente influente na medição deste ângulo. Foi igualmente considerado influente o tempo do tratamento porque o termo linear do tempo foi igual a 0,0118. O termo quadrático da pressão não foi significativo porque apresentou o valor de 0,8540. Por outro lado, o termo quadrático do tempo foi de 0,0214, logo o ângulo de contacto medido em bromonaftaleno, na superfície exterior da tripa, foi influenciado pelo tempo do tratamento. A interação entre as variáveis independentes estudadas não foi significativa ($p=0,1099$). Na Figura 25 está a representação tridimensional da relação entre o ângulo de contacto na superfície exterior das amostras de tripa medido em bromonaftaleno e as variáveis independentes.

Figura 25 - Representação da superfície de resposta da relação do nível de pressão (VAR1) e do tempo do tratamento (VAR2) sobre o ângulo de contacto na superfície exterior das amostras de tripa medido em bromonaftaleno (VAR14)



A utilização de um líquido polar dá-nos a resposta da superfície em contato com outras estruturas polares. Quando existe uma amostra com elevado valor da componente polar é sinónimo de que há um aumento da hidrofília da superfície da amostra considerada. Por exemplo, se as amostras tratadas apresentarem um valor da componente polar menor significa que os tratamentos de alta pressão diminuem a hidrofília das superfícies. Na medição do ângulo de contacto das amostras de tripa tratadas com níveis crescentes de alta pressão, utilizando como líquido polar a água, a diminuição do ângulo de contacto significa que os tratamentos com alta pressão favorecem o contato com estruturas polares, nomeadamente, a retenção de água na superfície é facilitada nas amostras que sofreram o tratamento com um nível de pressão superior. Se o ângulo de contato diminui com o solvente apolar, significa exatamente o oposto.

Focando-nos nos resultados deste trabalho e considerando os valores dos ângulos de contato da superfície exterior medidos no líquido apolar verificou-se que nos tratamentos subsequentes ao tratamento 400 MPa e 154 s houve uma diminuição dos valores com o aumento do nível de pressão e do tempo (Ver Tabela 9). Pela interpretação destes resultados e tendo em conta o referido na explicação anterior supõe-se que a superfície fica então mais hidrófoba. No entanto, verificou-se alguma incongruência, uma vez que o oposto não se verificou para consolidar este resultado, ou seja, observando a coluna anterior da Tabela 9, os valores dos ângulos de contato para a mesma superfície no líquido polar diminuíram com a pressão.

O aumento da hidrofília pode traduzir-se na formação de pontes de hidrogénio pois assume-se que a componente polar reflete, principalmente, este tipo de ligações. Como já vimos as ligações não covalentes, onde se incluem as pontes de hidrogénio, são afetadas pela alta pressão, por isso, as amostras tratadas, comparativamente com as de controlo, deveriam com a pressão apresentar um aumento dos valores dos ângulos de contacto medidos no líquido polar, estando este aumento associado a uma diminuição na componente polar. Neste trabalho este efeito não foi visível, uma vez que se verificou uma diminuição do ângulo de contacto no líquido polar das amostras tratadas em relação às amostras de controlo (visível sobretudo na medição realizada na superfície exterior).

Depois de analisar os resultados obtidos e ficando com uma ideia geral sobre as informações dadas pela determinação do ângulo de contacto podemos inferir que, no caso da tripa, o ideal seria o ângulo de contacto da superfície interior com o líquido polar aumentar com a pressão, de modo a que, assim, se favorece a promoção da secura do alimento. A diminuição do ângulo na superfície exterior com o solvente polar poderá levar à formação de uma camada de água à superfície do enchido favorecendo a proliferação da microbiota. O ângulo de contato da superfície exterior com o solvente apolar deveria aumentar de modo a desfavorecer a adesão direta de microrganismos que possam ocorrer ao longo do processamento.

5 - Conclusões

Para uma valorização da tripa natural pela indústria de salsicharia têm de ser garantidos critérios de qualidade e segurança alimentar. Concluiu-se que a qualidade microbiológica da tripa natural não é garantida pelo seu processamento e existe necessidade de um método que reduza a elevada microbiota remanescente. Conservantes químicos, salmoura com pH ajustado, aplicação de ozono ou de radiação são alguns dos métodos inovadores que têm sido investigados para a melhoria da qualidade microbiológica da tripa.

A tecnologia de alta pressão hidrostática, uma tecnologia atérmica, tem vindo a mostrar o seu valor ao nível da indústria alimentar pela sua capacidade de melhorar a segurança e prolongar o período de vida útil dos alimentos, sem alterar o seu valor nutricional e sensorial. Pelas suas vantagens esta tecnologia vê a oportunidade de ser considerada promissora, numa altura em que os consumidores começam a preferir alimentos seguros, nutritivos e sensorialmente agradáveis, sem incorporação de aditivos químicos. Como tecnologia emergente tem necessidade de provar o seu valor tanto a produtores, como a consumidores. Torna-se, então, importante apresentar dados convincentes e informação clara e objetiva, onde se devem incluir também os aspetos potencialmente negativos, assim como as suas limitações.

O presente trabalho averiguou a potencialidade da aplicação de alta pressão no processamento da tripa natural de suíno, considerando a melhoria da qualidade microbiológica e a afetação de propriedades físicas. As amostras de tripa foram sujeitas a tratamentos de alta pressão com diferentes binómios pressão-tempo.

Através dos resultados obtidos nas análises microbiológicas concluiu-se que a alta pressão contribuiu para a melhoria da qualidade microbiológica da tripa, com grande influência na redução do seu teor microbiano inicial. Com níveis de pressão de 400 MPa e tempos de tratamento de 1800 s verificou-se a maior redução da microbiota contaminante. Apesar de ter sido a este binómio que se verificou a maior redução dos microrganismos, temos de ter em atenção que 1800 s é um tempo muito elevado para este tipo de tratamento industrial, pelo que será necessário otimizar os valores de pressão mínimos (superiores a 400 MPa) para tratamentos com duração da ordem dos 180 a 400 s.

Nos testes de resistência mecânica da tripa, os resultados demonstraram que os tratamentos de alta pressão afetaram significativamente os parâmetros medidos maioritariamente de forma positiva, uma vez que se verificou um aumento quer para a força máxima de tensão, quer para o alongamento.

Ao nível da cor, concluímos que os tratamentos de alta pressão provocaram uma perda estatisticamente significativa na cor vermelha (diminuição de a^* e aumento de b^* e de L^*), o que está de acordo com vários autores que apontam a alteração de cor como um dos

inconvenientes da aplicação da tecnologia de alta pressão em produtos cárneos. Esta alteração da cor, no caso da tripa natural, até poderá ser encarada como uma vantagem, uma vez que os industriais de salsicharia preferem uma tripa com uma cor mais esbranquiçada.

Pela observação dos cortes histológicos da tripa não se detetaram alterações notórias na sua microestrutura.

A medição dos ângulos de contacto não se revelou conclusiva na compreensão da alteração da superfície com a alta pressão, uma vez que os dados obtidos foram pouco discriminativos, sem variação estatisticamente significativa. A tripa fresca tem um grande teor de humidade, este facto pode ser a origem da falta de significância estatística das variações encontradas.

No que diz respeito à escolha do binómio pressão-tempo mais adequado e executável numa futura aplicação da tecnologia de alta pressão a tripas naturais de suíno, aponta-se o tratamento de 540 MPa e 390 s porque a estes níveis de pressão constatámos que os microrganismos foram reduzidos e até possivelmente eliminados, as propriedades de resistência mecânica não foram afetadas negativamente e o tempo de tratamento não foi demasiado elevado, contribuindo para a eficácia do processo.

Este trabalho foi enriquecedor porque explorou uma tecnologia que é recente na indústria alimentar, contribuindo para o seu conhecimento e espera-se que os resultados obtidos nesta dissertação possam auxiliar futuros trabalhos.

Ficam aqui algumas sugestões para futuros estudos relacionados com o assunto: fazer uma avaliação inicial da composição química da tripa natural estudada, principalmente, uma determinação do colagénio que, como vimos neste trabalho, poderá ser importante para relacionar com os resultados dos testes de resistência mecânica; complementar o estudo da medição dos ângulos de contacto com realização da caracterização da superfície, em termos de estruturas polares e apolares, e respetivo cálculo da energia de superfície para ser possível inferir sobre o efeito da alta pressão na adesividade da tripa; avaliar a resistência das tripas pressurizadas na fase de enchimento para averiguar se têm melhor rendimento, comparativamente com as não pressurizadas.

O conhecimento da qualidade da tripa natural rececionada pela indústria de salsicharia tem de ser um aspeto crucial na aceitação desta matéria-prima. A indústria de salsicharia não tem opções de seleção porque não pede informação sobre as características do produto (especificações sobre as propriedades mecânicas e sobre o controlo da qualidade microbiológica). Se fosse feita esta exigência, haveria necessidade de implementar algumas medidas de controlo de qualidade higiénica e tecnológica da tripa expedida, por parte da triparia, como garantia para a indústria de salsicharia.

No futuro para possibilitar a concretização da aplicação da tecnologia de alta pressão no processamento de tripa natural seria necessário o levantamento de informação sobre as

indústrias de salsicharia que estariam dispostas a pagar um valor acrescentado por uma matéria-prima com maior qualidade. Ou seja, é necessário perceber antes de investir nesta tecnologia se existe interesse em melhorar a qualidade da tripa, acarretando como é óbvio o aumento de custos associado.

Se mais estudos sobre o efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática em matérias-primas utilizadas em enchidos cárneos fossem desenvolvidos maior seria o reconhecimento desta tecnologia, provando o seu valor perante os produtores. Uma nova tecnologia para ser bem aceite necessita de estudos científicos que comprovem a sua eficácia. Adicionalmente, tem de ter um baixo custo, legislação regulamentada, facilidade de aplicação, onde se destaca a adaptação ao processo industrial original, sem necessidade de grande investimento.

6 - Bibliografia

Andrés, A.I., Møller, J.K.S., Adamsen, C.E. & Skibsted, L.H. (2004). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham: effect on radical formation, lipid oxidation and colour. *European Food Research and Technology*, 219, 205-210.

Aymerich, M.T., Jofré, A., Garriga, M. & Hugas, M. (2005). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*, 68, 173-177.

Aymerich, T., Picouet, P.A. & Monfort, J.M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, 114-129.

Bak, K.H., Lindahl, G., Karlsson, A.H., Lloret, E., Ferrini, G., Arnau, J. & Orlien, V. (2012). High pressure effect on the color of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. *Meat Science*, 90, 690-696.

Bakker, W.A.M., Houben, J.H., Koolmees, P.A., Bindrich, U. & Sprehe, L. (1999). Effect of initial mild curing, with additives, of hog and sheep sausage casings on their microbial quality and mechanical properties after storage at different temperatures. *Meat Science*, 51, 163-174.

Balasubramaniam, V.M., Farkas, D. & Turkey, E. (2008). High-Pressure Processing. *Food Technology*, 11, 33-38.

Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, R.U., Palou, E. & Swanson, B.G. (Eds.). (1998). High hydrostatic pressure: Food processing. In *NonThermal Preservation of Foods*. (pp. 9-48). Nova Iorque: Marcel Dekker.

Benli, H., Hafley, B.S., Keeton, J.T., Lucia, L.M., Cabrera-Diaz, E. & Acuff, G.R. (2008). Biomechanical and microbiological changes in natural hog casings treated with ozone. *Meat Science*, 79, 155-162.

Bolumar, T., Skibsted, L. & Orlien, V. (2012). Kinetics of the formation of radicals in meat during high pressure processing. *Food Chemistry*, 134, 2114-2120.

Bowman, J.P., Bittencourt, C.R. & Ross, T. (2008). Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 154, 462-475.

Bozoglu, F., Alpas, H. & Kaletunc, G. (2004). Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *Immunology and Medical Microbiology*, 40, 243-247.

Buckton, G. (Ed.). (1995). *Interfacial phenomena in drug delivery and targeting*. Alemanha: Harwood Academic Publishers.

Bull, M. K., Hayman, M. M., Stewart, C. M., Szabo, E. A. & Knabel, S. J. (2005). Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery of *Listeria monocytogenes* following high pressure processing of milk. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 53-61

Byun, M.W., Lee, J.W., Jo, C. & Yook, H.S. (2001). Quality properties of sausage made with gamma irradiated natural pork and lamb casing. *Meat Science*, 59, 223-228.

Campos, F.P. (2003). Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6, 351-357.

Campus, M., Flores, M., Martinez, A. & Toldrá, F. (2008). Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin. *Meat Science*, 80, 1174-1181.

Carlez, A., Rosec, J.P., Richard, N. & Cheftel, J.C. (1993). High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *Food Science and Technology*, 26, 357-363.

Carlez, A., Veciana-Nogues, T. & Cheftel, J.C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *Food Science and Technology*, 28, 528-538.

Casadei, M.A., Manas, P., Niven, G., Needs, E. & Mackey, B.M. (2002). Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (12), 5965-5972.

Chawla, S.P., Chander, R. & Sharma, A. (2006). Safe and shelf-stable natural casing using hurdle technology. *Food Control*, 17, 127-131.

Cheftel, J.C. (1995). Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, 1, 75-90.

Cheftel, J.C. & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46, 211-236.

Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., Díaz, I., Valero, A. & García-Regueiro, J.A. (2011). Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry-cured ham: effects along the storage period. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 456-465.

Coelho, G.L.V. (2002). Efeitos da alta pressão hidrostática em alimentos: aspectos físico-químicos. *Revista Universidade Rural da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 21, 105-110.

Comparini, A., Passos, G., Graziadei, H., Ferreira-Silva, P.H. & Louzada, F. (2010). *Metodologia de superfície de resposta: uma introdução nos softwares R e estatística*. Acedido em Ago.20, 2013. Disponível em http://www2.icmc.sc.usp.br/~biblio/BIBLIOTECA/rel_tec/RT_376.pdf

Considine, K.M., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., Hill, C. & Sleator, R.D. (2008). High-pressure processing: effects on microbial food safety and food quality. *Microbiology Letters*, 281, 1-9.

European Natural Casings Association. (2013). *Community Guide to Good Practice for Hygiene and the application of the HACCP principles in the production of natural sausage casings*. Acedido em Jul.7, 2013. Disponível em <http://www.ensca.eu/index.php?/eng/DOWNLOADS>

Farber, J.M. & Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 476-511.

Farkas, J. (1998). Irradiation as a method for decontaminating food. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 189-204.

Farkas, D. & Hoover, D. (2000). High pressure processing: kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. *Journal of Food Science Supplement*, 65, 47-64.

Farr, D. (1990). High pressure technology in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 1-31.

Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares. (2000). *Guia geral da aplicação do sistema HACCP: análise dos perigos e pontos críticos de controlo*. Lisboa: FIPA

Fernández, P.P., Sanz, P.D., Molina-García, A., Otero, L., Guignon, B. & Vaudagna, S.R. (2007). Conventional freezing plus pressure-low temperature treatments: physical properties, microbial quality and storage stability of beef meat. *Meat Science*, 77, 616-625.

Ferreira, V.S.G. (2005). *Controlo de qualidade de produtos de salsicharia*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa.

Ferreira, J.M.R. (2011). *Efeito do tratamento de alta pressão na sorção de água pelo amido*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia-Ramo Alimentar. Aveiro: Universidade de Aveiro.

Fischer, A. & Krol, B. (1997). HACCP Manual for processing of natural sausage casings. *Risk Assessment Sciences* (Utrecht University).

Fraqueza, M.J.R. (1992). *Utilização e valorização das tripas de animais de abate nas indústrias de carne portuguesas*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa.

Fulladosa, E., Serra, X., Gou, P. & Arnau, J. (2009). Effects of potassium lactate and high pressure on transglutaminase restructured dry-cured hams with reduced salt content. *Meat Science*, 82, 213-218.

Gabis, D.A. & Silliker, J.H. (1974). *Salmonella* in natural animal casings. *Applied Microbiology*, 27, 66-71.

García-Graells, C., Valckx, C. & Michiels, C.W. (2000). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high pressure and the lactoperoxidase system. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4248-4251.

Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. & Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in meat model system during storage. *Food Microbiology*, 19, 509-518.

Garriga, M., Grèbol, N., Aymerich, M.T., Monfort, J.M. & Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 451-457.

Garriga, M., Marcos, B., Martín, B., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S. & Hugas, M. (2005). Starter cultures and high pressure processing to improve the hygiene and safety of slightly fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 68, 2341-2348.

Glénat, P.A.J. (1969). *Technologie et microbiologie du boyau salé*. These Doctarat. França: École National Vétérinaire d'Alfort.

Goutefongea, R., Rampon, V., Nicolas, N. & Dumont, J.P. (1995). Meat colour changes under high pressure treatment. In 41st International Congress of Meat Science and Technology. (vol. II, pp. 384-385). E.U.A: American Meat Science Association.

Grossi, A., Søltoft-Jensen, J., Knudsen, J.C., Christensen, M. & Orlien, V. (2012). Reduction of salt in pork sausages by the addition of carrot fibre or potato starch and high pressure treatment. *Meat Science*, 92, 481-489.

Han, J.H. (Ed.). (2007). *Packaging for nonthermally processed foods*. (pp. 3-16). Reino Unido: Blackwell Publishing.

Han, Y., Jiang, Y., Xu, X., Sun, X., Xu, B. & Zhou, G. (2011). Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Science*, 88, 682-688.

Harper, B.A., Barbut, S., Lim, L.T. & Marcone, M.F. (2012). Microstructural and textural investigation of various manufactured collagen sausage casings. *Food Research International*, 49, 494-500.

Hayman, M.M., Baxter, I., O'Riordan, P.J. & Stewart, C.M. (2004). Effects of high pressure processing on the safety, quality, and shelf-life of ready-to-eat meats. *Journal of Food Protection*, 67, 1709-1718.

Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I. & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 197-203.

Hendriks, T. & Mastboom, W.J.B. (1990). Healing of experimental intestinal anastomoses: parameters for repair. *Diseases Colon Rectum*, 33, 891-901.

Herrero, A.M. & Avila, M.D.R. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina Universidad Navarra*, 50, 71-74.

Hogan, E., Kelly, A. & Sun, D.W. (2005). High pressure processing of foods: an overview. In D.W Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing*. (pp. 3-32). E.U.A.: Elsevier Academic Press.

Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. & Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43, 99-107.

Hoppel, C.R., Bogetti, T.A. & John, W.J. (1995). Effects of hydrostatic pressure on the mechanical behavior of composite materials. *Army Research Laboratory*. Acedido em 2.Ago, 2013. Disponível em www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA293162.

Houben, J.H. (2005). A survey of dry-salted natural casings for the presence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and sulphite-reducing *Clostridium* spores. *Food Microbiology*, 22, 221-225.

Houben, J.H., Kakker, W.A.M. & Keizer, G. (2005). Effect of trisodium phosphate on slip and textural properties of hog and sheep natural sausage casings. *Meat Science*, 69, 209-214.

Hugas, M., Garriga, M. & Monfort, J.M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 359-371.

ISO 13722 (1996). *Meat and meat products - Enumeration of Brochothrix thermosphacta - Colony-count technique*. The International Organization for Standardization. Suíça.

ISO 11290-2 (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes. Part 2-Enumeration method*. The International Organization for Standardization. Suíça.

ISO 15214 (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffsv - Horizontal methods for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 °C*. The International Organization for Standardization. Suíça.

ISO 6887-1 (1999). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1 - General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*. The International Organization for Standardization. Suíça.

ISO 16649-2 (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 2 - Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide*. The International Organization for Standardization. Suíça.

ISO 6887-2 (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 2 - Specific rules for the preparation of meat and meat products*. The International Organization for Standardization. Suíça.

ISO 21528-2 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2 - Colony-count method*. The International Organization for Standardization. Suíça.

ISO 7218 (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*. The International Organization for Standardization. Suíça.

ISO 13720 (2010). *Meat and meat products - Enumeration of presumptive Pseudomonas spp*. The International Organization for Standardization. Suíça.

Jofré, A., Garriga, M. & Aymerich, T. (2008). Inhibition of *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked hamby combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science*, 78, 53-59.

Jofré, A., Aymerich, T., Grèbol, N. & Garriga, M. (2009). Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenience meat products. *Food Science and Technology*, 42, 924-928.

Jung, S., Lamballerie-Anton, E. M., Taylor, E.G. & Ghoul, M. (2000). High pressure effects on lysosome integrity and lysosomal enzyme activity in bovine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2467-2471.

Jung, S., Ghoul, M. & Lamballerie-Anton, M. (2003) Influence of high pressures on the color and microbial quality of beef meat. *Food Science and Technology*, 36 (6), 625-631.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2005). Digestive tract. In *Basic histology - text & atlas*. (11th ed.). (pp. 281-287). Nova lorque: McGraw-Hill.

Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*, 65, 1811-1829.

Kim, I.J., Lee, E.J., Lee, N.H., Kim, Y.H. & Yamamoto, K. (2007). Effects of hydrostatic pressure treatment on the physicochemical, morphological and textural properties de bovine semitendinosus muscle. *Food Science and Biotechnology*, 16, 49-54.

Kutas, R. (1987). *Great sausage recipes and meat curing*. (4th ed). Nova lorque: Macmillan Publishing Co.

Labie, C. (1987). Les contaminants des boyaux naturels. *Viande et produits carnés*, 82, 73-79.

Lamballerie-Anton, M.D., Taylor, R.G. & Culioli, J. (2002). High pressure processing of meat. In J. Kerry, J. Kerry & D. Ledward (Eds.), *Meat Processing: Improving quality*. (pp. 313-324). Inglaterra: Woodhead Publishing Ltd.

Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., Bouvier, J.M., Laborde, S. & Cabannes, M. (2000). Packaging for high-pressure treatments in the food industry. *Packaging Technology and Science*, 13, 63-71.

Lau, M.H. & Turek, E.J. (2007). Determination of quality differences in low-acid foods sterilized by high pressure versus retorting. In C.J. Doona & F.E. Feeherry (Eds.), *High pressure processing of foods*. (1st ed.). (pp. 195-217). Iowa, EUA: IFT Press-Blackwell Publishing Professional.

Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P, Lebert, A., Chacornac, J.P., Bover-Cid, S., Vidal-carou, M.C. & Talon, R. (2007). Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional french processing units. *Meat Science*, 76, 112-122.

López-Caballero, M.E., Carballo J. & Jiménez-Colmenero, F. (1999). Microbiological changes in pressurized, prepackaged sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*, 62 (12), 1411-1415.

López-Caballero, M.E., Carballo, J., Solas, M.T. & Jiménez-Colmenero, F. (2002). Responses of *Pseudomonas fluorescens* to combined high pressures/temperature treatments. *European Food Research and Technology*, 214, 511-515.

Ma, H.J. & Ledward, D.A. (2004). High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. *Meat Science*, 68 (3), 347-355.

Macfarlane, J.J., McKenzie, I.J., Turner, R.H. & Jones, P.N. (1984). Binding of comminuted meat: effect of high pressure. *Meat Science*, 10(4), 307-320.

Mañas, P. & Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1387-1399.

Marcos, B., Jofré, A., Aymerich, T., Monfort, J.M. & Garriga, M. (2008). Combined effect of natural antimicrobials and high pressure processing to prevent *Listeria monocytogenes* growth after a cold chain break during storage of cooked ham. *Food Control*, 19, 76-81.

Marcos, B., Kerry, J.P. & Mullen, A.M. (2010) High pressure induced change on sarcoplasmic protein fraction and quality indicators. *Meat Science*, 85, 115-120.

Masuda, M., Saito, Y., Iwanami, T. & Hirai, Y. (1992). Effects of hydrostatic pressure on packaging materials for food. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P. Massons (Eds.), *High pressure and biotechnology*. (pp. 545-547). Londres: John Libbey Eurotext.

Mead, G.C. & Adams, B.W. (1977). A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. *British Poultry Science*, 28, 661-670.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. & Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625.

Mendonça, J.M.G.T.C. (2012). *Aplicação da tecnologia de alta pressão na conservação de um produto cárneo em Portugal*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

Mertens, B. (1993). Packaging aspects of high-pressure food processing technology. *Packaging Technology and Science*, 6, 31-36.

Møller, S.M., Grossi, A., Christensen, M., Orlie, V., Søltoft-Jensen, J., Straadt, I.K., Thybo, A.K. & Bertram, H.C. (2011). Water properties and structure of pork sausages as affected by high-pressure processing and addition of carrot fibre. *Meat Science*, 87, 387-393.

Morgado, R.J. (1983). Tripas naturais e sintéticas: problemática da sua utilização em salsicharia. 1º Congresso Nacional das Indústrias Agro-Alimentares (Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial).

Mor-Mur, M. & Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: physical properties and sensory analysis. *Meat Science*, 65, 1187-1191

Mozhaev, V.V. , Heremans, K., Frank, J., Masson, P. & Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 24, 81-91.

Myres, R.H. & Montgomery, D.C. (1995) Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. (3rd ed.). (pp. 741). Canada: John Wiley & Sons.

Naghski, J. (1971). Hides, skin, and natural casings. In *The science of meat and meat products*. (2nd ed). São Francisco, E.U.A: W.H. Freeman & Company.

Neto, O.C., Rosenthal, A. & Gaspar, A. (2011). Modificações físico-químicas na carne *in natura* bovina decorrentes da alta pressão hidrostática. *Brazilian Journal of Food Technology*, 4, 91-110.

Neumann, A.W. & Spelt, J.K. (1996). Applied Surface Thermodynamics. (2nd ed.). Nova Iorque: Marcell Dekker Inc.

Norton, T. & Sun, D.W. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 2-34.

Ockerman, H.W. & Hansen, C.L. (2000). Sausage containers. In *Animal by-product processing and utilization*. (pp. 285-323). Boca Raton, EUA: CRC Press.

Ogawa H., Fukuhisa K. & Fukumoto H. (1992). Effect of hydrostatic pressure on sterilization and preservation of juice. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson (Eds.), *High Pressure and Biotechnology*. (pp. 269-272). Paris, França: John Libbey Eurotext Ltd.

Okamoto, S. (1978) Factors affecting protein film formation. *Cereal Foods World*, 23, 256-262.

Omer, M.K., Alvseike, O., Holck, A., Axelsson, L., Prieto, M., Skjerve, E. & Heir, E. (2010). Application of high pressure processing to reduce verotoxigenic *E.coli* in two types of dry-fermented sausage. *Meat Science*, 86, 1005-1009.

Pandurangi, S. & Balasubramaniam, V.M. (2005). High-pressure processing of salads and ready meals. In D. Sun (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing*. (pp. 33-45). E.U.A: Elsevier Academic Press.

Park, H.J. & Chinnam.M.S. (1995). Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *Journal of Food Engineering*, 25, 497-507.

Patarata, L., Esteves, A. & Martins, C. (1998). Contribuição para a aplicação de métodos de garantia de qualidade ao fabrico de linguiça de vinha d'alhos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 93, 162-166.

Patterson, M.F., Ledward, D.A. & Rogers, N. (2006). High Pressure Processing. In J.G. Brennan (Ed.), *Food Processing Handbook*. (pp. 173-196). Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Préstamo, G. & Arroyo, G. (1998). High hidrostática pressure effects on vegetable structure. *Journal of Food Science Engineering/Processing*, 63, 1-4.

Purslow, P.P. (1987). The fracture properties and thermal analysis of collagenous tissues. In A. M. Pearson, T.R. Dutson & A.J. Balley, *Advances in Meat Research*. Nova Iorque: Van Nostrand Reinhold Co.

Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwe, S.A., Galán, J.E., Ginocchio, C., Curtis, R. & Gyles, C.L. (1992). Amplification of invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 271-279.

Ramirez, J.C. & Morrissey, M.T. (2006). Effect of high pressure processing (HPP) on shelf life of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) minced muscle. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 19-27.

Raso, J., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V. & Swanson, B.G. (1998). Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 125-132.

Rastogi, N.K., Raghavaro, K.S.M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjana, K. & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 69-112.

Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alfonso-Calleja, C., Capita, R. & Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *Food Science and Technology*, 44, 1251-1260.

Reppas, G.P. & Canfield, P.J. (2004). Diagnostic cytology of skin lesions. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (7th ed.). (pp. 53-56). St. Louis, E.U.A: Saunders Elsevier.

Ritz, M., Tholozan, J.L., Federighi, M. & Pilet, M.F. (2002). Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 47-53.

Ritz, M., Pilet, M.F., Jugiau, F., Rama, F. & Federighi, M. (2006). Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* using high-pressure treatments: destruction or sublethal stress? *Letters in Applied Microbiology*, 42, 357-362.

Rodrigues, A.F.C.S.B. (2006). *Estudos de estabilidade e biocompatibilidade do cimento acrílico utilizado em cirurgia ortopédica*. Doutoramento em Farmácia. Lisboa: Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa.

Rubio, B., Martínez, B., Garcia-Cachán, M.D., Rovira, J. & Jaime, I. (2007). Effect of high pressure preservation on the quality of dry cured *cecina de Leon*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 102-110.

Rufino, M.P. (2003). *Características químicas de chouriços tradicionais portugueses*. Relatório de Fim de Curso em Engenharia Agro-Industrial. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa.

Rust, R.E. (1988). Production of edible casings. In A.M Pearson & T.R. Dutson, *Edible meat by-products*. (pp. 262–274). Londres: Elsevier Science Publishers.

Sangronis, E., Pothakamury, U., Ramos, A.M., Ibaraz, A., Barbosa-Cánovas, G.V. & Swanson, B.G. (1997). La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos, *Alimentaria*, 33, 33-43.

Santé, V., Renerre, M. & Lacourt, A. (1994). Effect of modified atmosphere packaging on colour stability and on microbiology of turkey breast meat. *Journal of Food Quality*, 17, 177-195.

Santos, E. (2006). *Avaliação das propriedades tecnológicas de tripas naturais submetidas ao tratamento com soluções emulsificantes*. Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos. Florianópolis: Universidade de Santa Catarina. Acedido em Jun.20, 2013. Disponível em <http://www.pgeal.ufsc.br/files/2011/01/Disserta%C3%A7%C3%A3o-final-maio-2006-corre%C3%A7%C3%A3oSandra.pdf>

Santos, E., Müller, C.M.O., Laurindo, J.B., Petrus, J.C.C. & Ferreira, S.R.S. (2008). Technological properties of natural hog casings treated with surfactant solutions. *Journal of Food Engineering*, 98, 17-23.

Sauer, J.A. (1977). Deformation, yield, and fracture of polymers at high pressure. *Polymer Engineering and Science*, 17 (3), 150-164.

Savic, Z. & Savic, I. (2002). *Sausage casings*. (1st ed). Viena, Áustria: Victus International.

Serra, X., Sárraga, C., Grèbol, N., Guàrdia, M.D., Guerrero, L. & Gou, P. (2007). High pressure applied to frozen ham at different process stages.: effect on the final physicochemical parameters and on the antioxidant and proteolytic enzyme activities of dry-cured ham. *Meat Science*, 75, 12-20.

Seyderhelm, I., Boguslawski, S., Michaelis, G. & Knorr, D. (1996). Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal Food Science*, 61, 308-310.

Sharma, M., Shearer, A.E.H., Hoover, D.G., Liu, M.N., Solomon, M.B. & Kniel, K.E. (2008). Comparison of hydrostatic and hydrodynamic pressure to inactivate foodborne viruses. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 418-422.

Shimada, S., Andou, M., Naito, N., Yamada, N., Osumi, M. & Hayashi, R. (1993). Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 123-131

Shin, E.S. & Pae, K.D. (1992). Effects of hydrostatic pressure on in-plane shear properties of graphite/epoxy composites. *Journal of Composite Materials*, 26, 828-868.

Sigley, R.H., Wronski, A.S. & Parry, T.V. (1992). Axial compressive failure of glass-fibre polyester composites under superposed hydrostatic pressure: influence of fibre bundle size. *Composite Science and Technology*, 43, 171-183.

Simelane, S. & Ustunol, Z. (2005). Mechanical properties of heat-cured whey protein-based edible films compared with collagen casings under sausage manufacturing conditions. *Journal of Food Science*, 70, 131-134.

Simpson, R.K. & Gilmour, A. (1997). The effect of high hydrostatic pressure on the activity of intracellular enzymes of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 48-53.

Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 152-158.

Stollewerk, K., Jofré, A., Comaposada, J., Arnau, J. & Garriga, M. (2012). The impact of fast drying (QDS process®) and high pressure on food safety of NaCl-free processed dry fermented sausages. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 89-95.

Suzuki, A., Kim, K., Tanji, H., Nishiumi, T. & Ikeuchi, Y. (2006). Application of high hydrostatic pressure to meat and meat processing. In M. Leo, L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Advanced Technologies for Meat Processing*. (pp. 193-219). Nova Iorque, E.U.A: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Swaminathan, B., Cabanes, D., Zhang, W. & Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes*. In M.P. Doyle & L. R. Beuchat (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. (pp. 457-491). Washington: ASM Press.

Syed, Q., Reineke, K., Saldo, J., Buffa, M., Guanis, B. & Knorr, D. (2012). Effect of compression and decompression rates during high hydrostatic pressure processing on inactivation kinetics of bacterial spores at different temperatures. *Food Control*, 25, 361-367.

Szerman, N., Barrio, Y., Schroeder, B., Martinez, P., Sancho, A.M., Sanow, C. & Vaudagna, S.R. (2011). Effect of high hydrostatic pressure treatments on physicochemical properties, microbial quality and sensory attributes of beef *carpaccio*. *Food Science*, 1, 854-861.

Talon, R., Leroy, S. & Lebert, I. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. *Meat Science*, 77, 55-62.

Talon, R. & Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science*, 89, 303-309.

Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Pérez-Lámela, C., Vázquez, M. & Simal-Gándarra, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 3, 66-80.

Ting, E., Balasubramaniam, V.M. & Raghubeer, E.. (2002). Determining thermal effects in high-pressure processing. *Food Technology Feature*, 56 (2), 31-34.

Trigo, M.J. & Fraqueza, M.J. (1998). Effect of gamma radiation on microbial population of natural casings. *Radiation Physics and Chemistry*, 52, 125-128.

Vaudagna, S.R., Gonzalez, C.B., Guignon, B., Aparicio, C., Otero, L. & Sanz, P.D. (2012). The effects of high hydrostatic pressure at subzero temperature on the quality of ready-to-eat cured beef *carpaccio*. *Meat Science*, 92, 575-581.

Veja-Mercado, H., Martín-Belloso, O., Qin, B.L., Chang, F.J., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Canovas, G.V. & Swanson, B.G. (1997). Non-thermal food preservation: pulsed electric fields. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 151-156.

Vercammen, A., Vanoirbeek, K.G.A., Luurquin, I., Steen, L., Goemaere, O., Szczepaniak, S., Paelink, H., Hendrickx, M.E.G. & Michiels, C.W. (2011). Shelf-life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives. *Innovative Food Science And Emerging Technologies*, 12, 407-415.

Wijnker, J.J., Koop, G. & Lipman, L.J.A. (2006). Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology*, 23, 657-662.

Wijnker, J.J., Bokhoven, J.L.M. & Veldhuizen, E.J.A. (2009). Phosphate analysis of natural sausage casings preserved in brines with phosphate additives as inactivating agent - Method validation. *Meat Science*, 81, 245-248.

Wijnker, J.J., Weerts, E.A.W.S., Breukink, E.J., Houben J.H. & Lipman, L.J.A. (2011). Reduction of *Clostridium sporogenes* spore outgrowth in natural sausage casings using nisin. *Food Microbiology*, 28, 974-979.

Wu, Y.C. & Chi, S.P. (2007). Casings. In F. Toldrá (Ed.), *Handobook of fermented meat and poultry*. (pp. 101-110). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.

Yaldagard, M., Mortazavi, S.A. & Tabatabaie, F. (2008). The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: a review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7, 2734-2767.

Yuste, J., Capellas, M., Pla, R., Fung, D.Y.C. & Mor-Mur, M. (2001). High pressure processing for food safety and preservation: a review. *Journal of Rapid Methods and Automation Microbiology*, 9, 1-10.

7 - Anexos

Anexo I - Protocolo de processamento automático de tecidos (Leica TP1020)

Procedimentos:

1 - Formol a 10% à temperatura ambiente, durante 60 min;

2 - Álcool a 70° à temperatura ambiente durante 60 min;

3 - Álcool a 95° à temperatura ambiente durante 90 min;

4 - Álcool a 95° à temperatura ambiente durante 90 min;

5 - Álcool a 100° à temperatura ambiente durante 60 min;

6 - Álcool a 100° à temperatura ambiente durante 90 min;

7 - Álcool a 100° à temperatura ambiente durante 90 min;

8 - Xilol à temperatura ambiente durante 60 min;

9 - Xilol à temperatura ambiente durante 60 min;

10 - Xilol à temperatura ambiente durante 60 min;

11 - Parafina a 68 °C durante 120 min;

12 - Parafina a 68 °C durante 120 min;

13 - Inclusão do fragmento em bloco de parafina (ponto de fusão a 56-58 °C).

Anexo II – Protocolo de coloração pela Hematoxilina-Eosina

Reagentes:

Hematoxilina de Gill 2 - (sigma-GHS 280)

Eosina-Floxina - (sigma-HT110-3)

Procedimentos:

- 1 - Xilol durante 15 min;
- 2 - Xilol durante 5 min;
- 3 - Álcool a 100° durante 1 min;
- 4 - Álcool a 95° durante 1 min;
- 5 - Álcool a 70° durante 1 min;
- 6 - Hidratação em água destilada durante 5 min;
- 7 - Hematoxilina de Gill 2 durante 30 s;
- 8 - Lavagem em água destilada durante 2 min;
- 9 - Lavagem em água corrente morna para azular;
- 10 - Álcool a 70° durante 1 min;
- 11 - Eosina-Floxina durante 1 min;
- 12 - Álcool a 95° durante 1 min;
- 13 - Álcool a 100% durante 1 min;
- 14 - Álcool a 100% durante 1 min;
- 15 - Xilol durante 1 min;
- 16 - Xilol durante 5 min;
- 17 - Secagem ao ar;
- 18 - Montagem com lamela e meio de montagem adequado.