

Avaliação Microbiológica de Enchidos de Ovino e Caprino

Cátia Sofia Araújo Silva

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientada por

Professor Doutor Alfredo Jorge Costa Teixeira

Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Bragança

2012



Nome: Cátia Sofia Araújo Silva

Orientador:

Professor Doutor Alfredo Jorge Costa Teixeira, Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Bragança

Co-orientadora:

Professora Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho, Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Bragança

Dedicatória

Aos meus pais, avó, irmão e irmã,
Por todo o esforço que fizeram, apoio,
e carinho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Alfredo Jorge Costa Teixeira, pela disponibilidade, simpatia e ajuda sempre que necessária.

À Professora Doutora Maria Leticia Estevinho, co-orientadora, o meu agradecimento pela sua total disponibilidade, orientação, apoio, e ensinamentos.

À Professora Doutora Sandra Sofia do Quinteiro Rodrigues, pela elaboração e organização do tratamento dos dados experimentais e ajuda prestada.

A todos os que trabalham no Laboratório de Microbiologia, um muito obrigado pela boa disposição, bons momentos e ajuda sempre que necessário, em especial à Mestre Ana Paula Pereira por todo o apoio e amizade que sempre me ofereceu.

A todos que trabalham no Laboratório de Carnes, Kátia, Ana, Filipe e Mestre Etelvina Pereira pela disponibilidade, simpatia e ajuda.

Às minhas amigas, que mesmo à distância estiveram presentes nesta etapa da minha vida e sempre me apoiaram e animaram, em especial à Ana Adaixo pela ajuda, companheirismo e amizade demonstrados.

A todos os que não mencionei mas que estiveram do meu lado e sempre me deram força.

Índice

| | |
|---|------|
| Dedicatória..... | iii |
| Agradecimentos | iv |
| Índice de figuras | vii |
| Índice de Tabelas | viii |
| Índice de Gráficos..... | ix |
| Resumo | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| 1. Introdução..... | 3 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 5 |
| 2.1 Enchidos..... | 5 |
| 2.2 Definição de enchidos e salsicha fresca..... | 6 |
| 2.3 Caracterização das raças Churra Galega Bragançana e Serrana | 6 |
| 2.4 Microbiologia nos produtos cárneos..... | 8 |
| 2.5 Métodos de deteção dos microrganismos | 10 |
| 2.6 Microrganismos | 11 |
| 2.6.1 Aeróbios mesófilos | 11 |
| 2.6.2 Aeróbios psicrófilos | 12 |
| 2.6.3 Bolores e leveduras | 13 |
| 2.6.4 <i>Staphylococcus aureus</i> | 13 |
| 2.6.5 Esporos clostrídios sulfito-redutores | 14 |
| 2.6.6 Coliformes totais e <i>Esherichia coli</i> | 15 |
| 2.6.7 <i>Salmonela spp.</i> | 15 |
| 2.6.8 <i>Listeria monocytogenes</i> | 16 |
| 3. Material e Métodos | 18 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.1 | Localização e Instalações..... | 18 |
| 3.2 | Matéria-prima | 18 |
| 3.3 | Análises Microbiológicas..... | 19 |
| 3.3.1 | Colheita/Receção das amostras..... | 20 |
| 3.3.2 | Contagem total da flora microbiana aeróbia mesófila | 20 |
| 3.3.3 | Contagem total da flora microbiana aeróbia psicrófila..... | 20 |
| 3.3.4 | Quantificação de bolores e leveduras | 21 |
| 3.3.5 | Quantificação de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| 3.3.6 | Pesquisa de estafilococos coagulase positiva pela técnica de cultura com confirmação de colónias | 22 |
| 3.3.7 | Pesquisa e quantificação de clostrídios sulfito-redutores | 22 |
| 3.3.8 | Pesquisa de <i>Salmonella spp</i> | 23 |
| 3.3.9 | Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> | 23 |
| 3.4 | Análise Estatística..... | 24 |
| 4. | Resultados e Discussão | 25 |
| 5. | Conclusões | 33 |
| 6. | Referências Bibliográficas | 34 |
| Anexos | | 39 |
| A. | Meios de Cultura | 39 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Cabra Serrana | 7 |
| Figura 2 – Ovelha Churra Galega Transmontana | 7 |
| Figura 3 - Diagrama do processo de obtenção das salsichas frescas de ovino e caprino | 19 |
| Figura 4 – Kit Simplate | 21 |
| Figura 5 – Fluorescência na presença de <i>E. coli</i> , quando exposta a placa a uma lâmpada de UV (365nm)..... | 22 |
| Figura 6 – Kit 1-2 TEST..... | 23 |
| Figura 7 – Placa CHROMagar Listeria | 24 |

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Valores obtidos para mesófilos, psicrófilos, *S.aureus*, bolores e leveduras, clostrídios sulfito-redutores, coliformes totais, *E.coli*, *Salmonella* spp e *L.monocytogenes*, nas salsichas obtidas a partir de carne de ovino com e sem colorau 26

Tabela 2 - Valores obtidos para mesófilos, psicrófilos, *S.aureus*, bolores e leveduras, clostrídios sulfito-redutores, coliformes totais, *E.coli*, *Salmonella* spp e *L.monocytogenes*, nas salsichas obtidas a partir de carne de caprino com e sem colorau 27

Tabela 3 – Efeito do colorau na qualidade microbiológica das salsichas 30

Tabela 4 – Efeito da espécie na qualidade microbiológica das salsichas 30

Índice de Gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 – Contagem total média de mesófilos | 31 |
| Gráfico 2 – Contagem total média de psicrófilos | 31 |
| Gráfico 3 – Contagem total média de coliformes totais | 32 |
| Gráfico 4 – Contagem total média de leveduras..... | 32 |

Resumo

Este trabalho teve como objetivo global a avaliação da qualidade microbiológica de um novo produto, salsichas frescas obtidas a partir de carne de ovino e caprino. As salsichas frescas são um enchido cru, de massa granulosa, constituídas por carne de ovino ou de caprino, gordura de porco, condimentos e aditivos. Relativamente aos objetivos específicos, foram analisados os parâmetros, de qualidade comercial (microrganismos aeróbios mesófilos, psicrófilos e bolores e leveduras); de qualidade sanitária (coliformes totais e fecais); e de segurança (*Salmonella* spp, clostrídios sulfito-redutores, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*).

Foi utilizada a carne proveniente de caprinos (raça Serrana) e ovinos (raça Churra Galega Bragançana) para a produção dos enchidos. Foram selecionados animais com peso e idade que não se enquadravam nas marcas de qualidade (DOP e IGP), ou seja, de segunda categoria, sendo o seu valor comercial reduzido.

Os resultados obtidos para os vários parâmetros analisados oscilaram entre $7,2 \times 10^3$ e $5,6 \times 10^5$ UFC/g para a flora aeróbia mesófila, <1 e $9,7 \times 10^4$ UFC/g para os psicrófilos, $1,1 \times 10^3$ e $7,5 \times 10^5$ UFC/g para as leveduras e $1,8 \times 10^4$ e $2,3 \times 10^5$ UFC/g para os coliformes totais.

Clostrídios sulfito-redutores, *Esherichia coli*, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* estavam ausentes em todas as amostras analisadas.

Não se observaram diferenças significativas entre os enchidos obtidos a partir de carne de ovino e caprino. Verificou-se que o colorau teve uma influência pouco significativa nos microrganismos aeróbios mesófilos nos enchidos obtidos a partir de carne caprina.

Palavras-chave: segurança microbiológica, salsichas frescas, microrganismos, ovino, caprino

Abstract

The main aim of this study was to evaluate the overall microbiological quality of this new product, fresh sausages obtained from sheep and goats. Sausages are a stuffed raw, grainy mass, consisting of meat of sheep or goats', pork fat, spices and additives. For specific purposes, the parameters analyzed were, the commercial quality (mesophilic aerobic microorganisms, yeasts and molds and psychrophiles); sanitary quality (total and fecal coliforms) and safety (*Salmonella* spp, sulfate-reducing clostridia and *Staphylococcus aureus*).

We used the meat from sheep (Serrana) and goats (Churra Galega Bragançana) for the production of sausages. We selected animals with weight and age who did not fit in quality marks (DOP and IGP), of the second category, and with commercial value reduced.

The results ranged between 7.2×10^3 and 5.6×10^5 for aerobic mesophilic flora, for psychrophiles 9.7×10^4 ; 1.1×10^3 and 7.5×10^5 for yeasts and total coliforms 1.8×10^4 and 2.3×10^5 . *Clostridium*, *Esherichia coli*, *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* were absent in all samples.

There were no significant differences between sausages made from sheep and goat meat. It was found that the red pepper had a negligible influence on mesophilic aerobic microorganisms in sausages made from goat meat.

Key-word: microbiological safety, fresh sausages, microorganisms, sheep, goats

1. Introdução

Os enchidos tradicionais vêm de tempos imemoráveis, têm o valor do saber dos nossos antepassados, mantendo pormenores e segredos que vão passando de geração em geração. São produtos de grande importância socioeconómica para as zonas rurais, pois valorizam os recursos locais, o emprego e o rendimento, contribuem também para a potencialização do índice demográfico local, iniciativas empresariais e fatores de inovação gerando conseqüentemente, novas oportunidades de mercado. São uma marca de cultura e etnografia nacional. Estes são produtos únicos que têm origem em zonas geográficas específicas sendo a sua qualidade é influenciada pelas raças animais, pela natureza dos solos, da vegetação, do clima e pela tecnologia de fabrico (Salavessa, J., 2009).

Os produtos de salsicharia portuguesa são, pelas suas características nutricionais e organoléticas, produtos alimentares da mais alta qualidade que interessa preservar. Recentes mudanças sociais, como alterações dos hábitos dos consumidores, a diversificação da oferta, o crescimento da concorrência aliado ao aumento das expectativas e do nível de exigência dos consumidores, obriga a que o investimento em novas tecnologias e novos produtos sejam objetivos estratégicos de mercado. É de extrema importância desenvolver produtos diferenciados para que estes não sejam confundidos com os vulgares tendo deste modo o seu lugar no mercado.

Convém salientar que, a qualidade dos enchidos pode estar comprometida quando se desenvolvem microrganismos que afetam negativamente as características deste tipo de produtos. Para garantir a sua inocuidade, torna-se imperioso o controlo da sua qualidade (Lacasse, D., 1998).

A análise de alimentos é uma área importante da microbiologia alimentar, que tem como objetivo pesquisar, quantificar e identificar microrganismos veiculados pelo consumo de água e alimento. Quando os alimentos são manipulados, processados e armazenados de forma incorreta podem pôr em risco a saúde de um grande número de consumidores, provocando doenças de origem alimentar que constituem hoje um dos mais importantes problemas de saúde pública a nível mundial.

O presente trabalho integra o projeto intitulado “Obtenção de novos produtos transformados de carne de ovinos e caprinos”, financiado no âmbito do programa

PRODER Medida 4.1 Cooperação para a Inovação, QREN SI I&DT – Projetos em Co-Promoção nº 21511 - BISOVICAP.

Tem como principal objetivo a elaboração de dois novos produtos de origem animal, baseados na utilização de carne, de baixo valor comercial, de ovino e caprino, procedente de animais com peso e idade fora dos limites de comercialização como carne fresca com Denominação de Origem Protegida (DOP) ou Indicação Geográfica Protegida (IGP). Aumenta-se assim o rendimento das explorações agrícolas, das indústrias de produtos cárneos, reutiliza-se a carne de ovinos e caprinos de segunda categoria, e potencializam-se as raças autóctones que lhe estão na origem.

Este trabalho teve como objetivo global a avaliação da qualidade microbiológica de salsichas obtidas a partir de carne proveniente destes animais. Os objetivos específicos são:

- Quantificação de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrófilos e bolores e leveduras;
- Quantificação e pesquisa de coliformes totais e fecais; e
- Pesquisa de *Salmonella* spp, clostrídios sulfito-redutores, *Listeria Monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Após uma breve introdução ao tema no primeiro capítulo, apresentamos, no segundo capítulo uma breve revisão bibliográfica sobre a importância dos enchidos, definição de enchido e salsicha fresca, caracterização das raças de ovino (Churra Galega Transmontana) e caprino (Serrana), microbiologia nos alimentos, métodos de deteção dos microrganismos e uma breve descrição de cada um dos microrganismos pesquisados. No terceiro capítulo procedeu-se à descrição das metodologias utilizadas para a realização do trabalho. No quarto capítulo apresentam-se os resultados obtidos e a sua discussão. Por fim no quinto capítulo as conclusões.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Enchidos

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

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

O que era inicialmente uma atividade essencialmente caseira industrializou-se e, na primeira metade do século XX, acompanhando a revolução industrial, surgiram as primeiras indústrias de salsicharia. Hoje, existem muitas pequenas e médias empresas que produzem a mais variada gama de produtos de salsicharia que, pela sua diversidade, origens, características organoléticas e saber fazer baseado na tradição, são cada vez mais um alimento presente na mesa dos portugueses (Fraqueza, 2008).

Em Portugal, uma das regiões que se caracteriza pelo fabrico de enchidos é o Norte de Portugal, nomeadamente Trás-os-Montes, onde é enorme a diversidade e especificidade de produtos cárneos tradicionais desenvolvidos.

A criação de ovinos e caprinos destaca-se como uma das oportunidades económicas para a região, são animais com capacidade de aproveitar restos de culturas e consumir uma grande variedade de plantas, estando perfeitamente adaptados a este meio ambiente. Em função do aumento da procura por carnes de ovino e caprino, têm surgido no mercado novos produtos e sabores de forma a ir de encontro às expectativas e necessidades dos consumidores, cada vez mais exigentes na qualidade e variedade dos produtos.

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

2.2 Definição de enchidos e salsicha fresca

Segundo o Regulamento (CE) n.º 853/2004, enchidos são produtos cárneos pertencentes ao grupo dos preparados à base de carne, os quais se definem como produtos transformados resultantes da transformação da carne ou da ulterior transformação desses produtos transformados, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca. Entre estes produtos encontram-se as salsichas frescas, que por definição são um enchido cru, de massa granulosa, constituídas por carne, gordura de porco, condimentos e aditivos (NP-723 (1989)).

Devido às suas características este produto deve ser conservado no frio (0-4°C) ou congelado (-18°C), até ser consumido.

A salsicha fresca pode ser considerada o primeiro alimento de conveniência prática do mundo pois é uma forma simples de processamento que contribui para a conservação da carne, além de agregar valor monetário. São encontradas para venda em forma de gomos, envoltos em material plástico; sob vácuo, que, juntamente com a refrigeração, aumenta a sua vida de prateleira.

Estes são alimentos muito expostos a contaminação e representam um excelente meio para a multiplicação de microrganismos. As prováveis fontes de contaminação envolvem matéria-prima de qualidade higiênico-sanitária insatisfatória, envoltórios, temperos ou condimentos, assim como a água usada em todas as operações de limpeza (Milani et al, 2003).

2.3 Caracterização das raças Churra Galega Bragançana e Serrana

Segundo Teixeira (2009), a carne é uma das principais fontes de proteína da dieta humana sendo várias as origens desta proteína animal. Os ovinos e caprinos são das espécies que, a nível mundial e nos últimos anos, vem experimentando, consideráveis aumentos. Os fatores que constituem uma das principais preocupações do mundo rural são os de ordem social e económica, por isso é importante valorizar estes animais e lançar novos produtos.

Cabra Serrana



Figura 1 – Cabra Serrana

A origem da cabra Serrana (figura 1) perde-se no tempo, remontando ao período do Quaternário da era Cenozóico, ou seja, há cerca de 3 milhões de anos.

A carne caprina, é uma carne magra, com pouca gordura subcutânea, intermuscular e intramuscular. Apresenta boa textura, alto valor nutritivo, principalmente em proteína, minerais e vitaminas, e boa digestibilidade (Haenlein, 1992).

Esta é a raça mais representativa das raças portuguesas, com um efectivo de 43% do total nacional. Entre as raças caprinas autóctones é a mais prolífica, a que apresenta maior fertilidade e que possui maior capacidade leiteira, sendo considerada em termos produtivos a melhor raça caprina portuguesa.

Possui dois produtos certificados com Denominação de Origem Protegida, o Cabrito Transmontano e o Queijo de Cabra Transmontano.

Ovelha Churra Galega Bragançana



Figura 2 – Ovelha Churra Galega Transmontana

O ovino Bragançano (figura 2), como todos os outros englobados, tradicionalmente, nas raças churras autóctones, tem relações filogénicas com o *Ovis aries* Studery (grupo de ovelhas difundido na zona superior costa

mediterrânica).

As particularidades da área que constitui o seu berço (Terra Fria) determinaram a formação de um tipo de animal bem diferenciado, com características genéticas que se transmitem de geração para geração, bem ajustadas às condições ambientais desta parcela da Terra Fria, influenciada pelas serras de Montezinho e Nogueira. (Sobral, M et al, Recursos Genéticos: Raças Autóctones, espécies ovina e caprina; 1987).

Possui um produto certificado com Denominação de Origem Protegida (DOP), o Cordeiro Bragançano.

2.4 Microbiologia nos produtos cárneos

A segurança alimentar é definida no Codex Alimentarius como a “garantia de que os alimentos não apresentam perigo para o consumidor quando são preparados e/ou consumidos de acordo com o uso para o qual foram destinados”. Esta remete para padrões de qualidade e boas práticas sanitárias e de higiene, é a garantia de que um alimento não causará dano ao consumidor através de perigos biológicos, químicos ou físicos, quando é preparado e consumido de acordo com o uso esperado.

É impossível obter um enchido sem a presença de microbiota ativa. Estes contêm misturas de carne, sal, especiarias, água, e uma microbiota específica, que neles se desenvolve, e que é diferente daquele que coloniza a carne fresca (Lechowich, 1976). A natureza e composição da microflora dos enchidos dependem das técnicas e condições de fabrico, uma vez que o tempo, o tipo e a temperatura dos diferentes processos a que estes são sujeitos, influenciam significativamente a população microbiana do produto final (Samelis et al., 1994).

São várias as origens dos microrganismos presentes nos alimentos, desde o solo e a água, passando pelos utensílios e recipientes onde estão contidos sem esquecer o Homem que por práticas de higiene pessoal e manipulação incorretas, é o principal veículo de muitos microrganismos patogénicos. Contudo se forem seguidas boas práticas de fabrico a carga microbiana será baixa e não será uma preocupação para a saúde pública.

São vários os fatores que afetam a evolução da flora bacteriana num alimento: fatores intrínsecos (estão relacionados com os próprios alimentos, como o pH, a_w), e, fatores extrínsecos (relacionados com as condições ambientais em que se encontram e são mantidos) (Lacasse, D., 1998).

A principal finalidade das análises microbiológicas é verificar a inocuidade dos alimentos, por isso se pesquisam os microrganismos mais facilmente cultiváveis e identificáveis cujo número é revelador da qualidade microbiológica do produto. Estas análises têm dois objetivos: controlar a qualidade microbiológica geral dos géneros alimentares (efetuar testes para verificar o alcance da contaminação dos alimentos, a eficácia das boas práticas de fabrico, a higiene da manipulação, condições de armazenagem e a sua salubridade); e detetar a presença de microrganismos patogénicos ou de toxinas suscetíveis de causarem toxinfecção alimentar.

Na fase final de fabrico, um produto alimentar contém uma flora microbiana que é o resultado de contaminações sucessivas, e também das condições de armazenamento, que deve ser considerada quantitativamente e qualitativamente.

- Quantitativo, pois a amplitude da contaminação ou a carga microbiana de um alimento aumenta a probabilidade de alteração do produto antes do consumo, e;
- Qualitativo, em que os microrganismos transmitidos pelas principais fontes de contaminação podem influenciar o tipo de alteração.

A evolução do sector agro-alimentar tem contribuído para criar incertezas, por parte do consumidor, sobre a qualidade dos produtos e a industrialização da cadeia alimentar gerando incertezas sobre a higiene dos produtos e a fiabilidade dos processos de produção e de transformação (Valceshini e Nicolas, 1995).

O controlo das características da matéria-prima é um passo importante para garantir a segurança dos produtos.

Para se poder produzir e colocar géneros alimentares no mercado, é necessário cumprir algumas regras que têm vindo a ser estabelecidas com maior rigor, na legislação nacional e comunitária, fundamentadas em conhecimentos técnicos e científicos.

O controlo da qualidade microbiológica apresenta dois aspetos: qualidade sanitária, que reflete a higiene que envolve a preparação dos alimentos e as suas condições de armazenamento; e, a qualidade comercial, que visa o controlo da flora de alteração para

uma conservação mais prolongada do produto e a manutenção de qualidades organolépticas aceitáveis.

A microflora dos enchidos tem grande influência na sua decomposição afetando negativamente a sua qualidade. É importante salientar que os produtos cárneos podem ser contaminados, especialmente por fungos, dependendo das condições de embalagem e armazenamento do produto. Podem desenvolver-se colónias a partir de pequenas contaminações, e mesmo que o crescimento seja reduzido, podem tornar o alimento impróprio para o consumo. Usam-se assim embalagens que limitam esse desenvolvimento prolongando a vida comercial dos produtos.

A conservação da carne e dos seus produtos é diretamente influenciada pela ação do frio. A temperaturas de 4°C é promovida a conservação e maturação de produtos cárneos e os microrganismos mesófilos responsáveis pela deterioração dos produtos, e também agentes de doenças de origem alimentar são normalmente inibidos. No entanto, a esta temperatura de refrigeração, propicia-se o desenvolvimento de microrganismos psicrófilos. A congelação da carne (-18°C) inibe a atividade microbiana e reduz a velocidade das reações enzimáticas, prolongando o seu tempo de vida de prateleira (Huis In't Veld, 1996).

Para uma análise microbiológica ter resultados fiáveis é necessário ter em conta a preparação e o tratamento da amostra, pois são passos de grande importância. Os critérios microbiológicos relativos aos géneros alimentares são definidos pelo Reg. (CE) nº 1441/2007, de 5 de Dezembro, apesar de ainda não estarem estabelecidos para todo o tipo de produtos.

2.5 Métodos de deteção dos microrganismos

Atualmente os métodos de análise são comumente divididos em métodos “convencionais” e métodos “rápidos” (Franco; Landgraf, 2007).

Os métodos microbiológicos convencionais que assentam, fundamentalmente, nas contagens microbianas são morosos, trabalhosos e exigem longos períodos de tempo até obtenção de resposta.

Contudo, tendo em vista evitar surtos de toxinfecção alimentar, entre outros, há necessidade de detetar rapidamente os microrganismos patogénicos. Por isso foram

introduzidas novas técnicas, mais rápidas e baseadas em conceitos completamente novos. São os métodos rápidos microbiológicos cujo principal objetivo é a obtenção de resultados rápidos, reduzindo o trabalho e os erros do operador, apresentando maior especificidade e sensibilidade.

Os métodos rápidos surgiram a partir da década de 90, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos e melhorar a produtividade laboratorial. Além destes objetivos, estes métodos visam também a simplificação do trabalho e a redução de custos. Para alguns métodos, a essas vantagens, aliam-se outras como maior sensibilidade e especificidade que os métodos convencionais (Franco; Landgraf, 2007).

2.6 Microrganismos

Os microrganismos de interesse em alimentos são encontrados em três grandes grupos: bactérias, bolores e leveduras. Na impossibilidade de monitorizar de forma eficiente a contaminação dos alimentos por todos os microrganismos, recorre-se à pesquisa dos microrganismos denominados indicadores, extremamente úteis no controlo da qualidade quanto à presença de microrganismos patogénicos e deteriorantes (Jay, 2000).

Para produtos de origem animal, a segurança e a qualidade podem ser estimadas com o uso da contagem de microrganismos indicadores nomeadamente a contagem de aeróbios mesófilos, de coliformes totais e de *Escherichia coli*. Para equipamentos e utensílios inclui-se, ainda, a contagem de bolores e leveduras, outro importante microrganismo é o *Staphylococcus aureus*, que pode indicar manipulação inadequada.

2.6.1 Aeróbios mesófilos

As bactérias são largamente estudadas por serem responsáveis por processos de deterioração, participarem da elaboração de alimentos e/ou por serem responsáveis por toxinfecções de origem alimentar.

As bactérias aeróbias mesófilas compreendem a maioria dos microrganismos patogénicos responsáveis por toxinfecções alimentares. A permanência dos alimentos perecíveis a temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$), pode ter consequências sanitárias temíveis, por isso são escolhidas como indicadoras da higiene geral.

São um grupo muito importante do ponto de vista sanitário, formam a flora dominante dos alimentos mantidos à temperatura ambiente ou dos refrigerados que foram submetidos a uma interrupção mais ou menos prolongada da permanência no frio.

Nesta categoria encontramos todas as bactérias parasitas e comensais dos seres humanos e dos animais de sangue quente. Também inclui várias espécies saprófitas que crescem em meio natural, responsáveis pela alteração dos alimentos armazenados à temperatura ambiente.

A sua temperatura ótima de crescimento situa-se entre os 30°C e os 40°C, mas o crescimento é possível a partir de aproximadamente 10 ou 15°C até 45°C.

Segundo Tortora et al (2003), o tipo de microrganismo mais comumente encontrado são os mesófilos apresentando a temperatura ótima de crescimento entre 25°C e 40°C.

A sua contagem fornece uma estimativa da contaminação microbiana total e altas contagens estão normalmente relacionadas à baixa qualidade e reduzida vida de prateleira dos produtos, indica também matéria-prima excessivamente contaminada; limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas; higiene insuficiente na produção ou conservação dos alimentos; condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou a conservação dos alimentos, ou uma combinação destas circunstâncias. (Siqueira,1995)

2.6.2 Aeróbios psicrófilos

Estes microrganismos são notáveis pela capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração sendo a sua temperatura de multiplicação entre os 0 °C e 20°C, alguns morrem se expostos à temperatura ambiente (25 °C). A temperaturas entre 4 e 10 °C os microrganismos psicrófilos deterioram alimentos armazenados por longos períodos.

O seu metabolismo é mais lento que o dos microrganismos mesófilos e são assim pouco competitivos nos alimentos mantidos à temperatura ambiente. Frequentemente minoritários na flora de contaminação, tornam-se, rapidamente dominantes após uma permanência nos alimentos em frigorífico, câmara fria ou armazém frigorífico.

Estes microrganismos têm uma importância considerável como agentes de alterações de alimentos desde a generalização da refrigeração, no entanto poucas espécies patogênicas pertencem a este grupo.

2.6.3 Bolores e leveduras

As leveduras dos alimentos são capazes de se multiplicar a temperaturas compreendidas entre 0 e 40°C, com uma temperatura ótima de 25 – 27°C, e a sua resistência a elevadas temperaturas é considerada fraca, pois quase todas as leveduras são destruídas a temperaturas de pasteurização (Loureiro, 1992). A maior resistência térmica demonstrada por determinadas espécies prende-se com a formação de ascosporos, ligeiramente mais resistentes ao calor que as células vegetativas.

As leveduras diferenciam-se dos bolores por se apresentarem, usual e predominantemente, sob forma unicelular, crescem e reproduzem-se mais rapidamente do que os bolores.

Os bolores e leveduras são indicadores importantes da eficiência de práticas de sanitização de equipamentos e utensílios durante a produção e transformação de alimentos.

2.6.4 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do género *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família *Staphylococcaceae* e quando vistos ao microscópio aparecem na forma de cacho de uva. São anaeróbias facultativas, com maior desenvolvimento sob condições aeróbias, quando produzem catalase.

As bactérias do género *Staphylococcus* são habitantes usuais da pele, das membranas mucosas do trato respiratório superior, e podem ser encontradas no solo, na água, no ar, no homem e nos animais, sendo frequentemente pesquisado em alimentos, pois a sua presença está associada a práticas de higiene e manipulação, limpeza e desinfecção inadequadas.

Dos microrganismos reconhecidos como potenciais causadores de doenças, o principal envolvido nos surtos provocados por manipulação inadequada é o *S.aureus*

que possui uma ampla distribuição na natureza e capacidade de sobreviver e se multiplicar facilmente nos alimentos quando encontra as condições adequadas.

A maioria das estirpes cresce aerobicamente a temperaturas entre 7°C-48°C, sendo a sua temperatura ótima de crescimento entre 35°C-40°C, este sobrevive também ao congelamento, a -18°C.

O género *Staphylococcus* inclui mais de 30 espécies, e embora a produção de enterotoxinas esteja normalmente associada a *S. aureus* coagulase positiva, algumas espécies de estafilococos que não produzem essa enzima também podem produzir enterotoxinas, porém pouca informação está disponível sobre surtos causados por espécies coagulase negativa (Carmo *et al.*, 2003; Jay, 2005).

Staphylococcus coagulase negativa, têm um papel fundamental no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos produtos cárneos fermentados nomeadamente, aroma, sabor, textura e cor através da capacidade de redução dos nitratos e da sua atividade lipolítica e proteolítica.

2.6.5 Esporos clostrídios sulfito-redutores

O género *Clostridium* é composto por várias espécies, e cada uma delas é caracterizada por possuir um conjunto de fatores de virulência distinto. Entre essas espécies, destaca-se o grupo dos Clostrídios sulfito-redutores, que se caracteriza por reduzir o sulfito a sulfeto de hidrogénio (H₂S) a 46°C.

A sua aplicação na análise de alimentos é fornecer uma indicação simples e rápida da potencial presença de *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*, duas espécies capazes de causar doenças transmitidas por alimentos.

Os produtos cárneos (salsichas e linguiças) estão entre os alimentos mais frequentemente associados a toxinfecções alimentares causadas por estes microrganismos, portanto a investigação destes microrganismos nestes alimentos torna-se de grande importância, uma vez que a formação de esporos por estas bactérias, e a sua ubiquidade, permite a sua sobrevivência nas condições de processamento e, durante o armazenamento, desde que outras condições intrínsecas permitam, pode ocorrer a germinação desses esporos, e multiplicação das células vegetativas, com produção das toxinas.

2.6.6 Coliformes totais e *Escherichia coli*

O género *Escherichia* faz parte do grupo *Escherichiae*, que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Fazem parte desse grupo predominantemente bactérias pertencentes aos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais homeotérmicos.

A *E. coli* é a espécie mais importante do género, definida como oxidase-negativa, os bastonetes gram-negativos variam de tamanho, 1-1,5 µm x 2-6 µm, geralmente móveis por flagelos peritriquiais, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e fermentam glicose com a produção de ácido e gás.

A sua temperatura ótima de crescimento é 37°C, mas podem crescer numa gama dos 15°C aos 45°C. Algumas estirpes de *E.coli* podem resistir a temperaturas de aquecimento de 55°C durante 60 minutos e ainda a 60°C durante 15 minutos.

A pesquisa de coliformes é sem dúvida o teste de deteção de contaminação fecal mais utilizado em todo o mundo, tanto para alimentos como para água potável. No entanto, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou microrganismos patogénicos entéricos, indicam contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo contaminação pós-processamento (Franco, Landgraf, 2007; Blood, Curtis, 1995).

A transmissão para humanos ocorre principalmente por meio de consumo de alimentos contaminados, tais como carnes cruas ou pouco cozidas e leite cru (Forsythe, 2002).

2.6.7 *Salmonella spp.*

Salmonella spp pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bactérias anaeróbias facultativas, gram negativas, oxidase negativas, catalase positivas e os membros deste género são móveis através de flagelos peritriciais exceto *S.pollorum* e *S.gallinarum*.

O género *Salmonella* é constituído por microrganismos resistentes que facilmente se adaptam a condições ambientais extremas, sendo assim uma preocupação de saúde pública, pois são patogénicas, podem multiplicar-se ativamente num grande número de alimentos pouco ácidos, a uma temperatura entre 5°C e 45°C, resistem muito tempo nos alimentos desidratados e são sensíveis aos tratamentos térmicos (pasteurização e cozimento) assim como á irradiação.

A sua temperatura ótima de crescimento é entre 35°C e 37°C, no entanto crescem numa ampla gama de temperaturas ($\leq 54^{\circ}\text{C}$) e exibem também propriedades psicotróficas que se refletem na sua habilidade de crescimento em alimentos armazenados entre 2 e 4°C.

A sua ubiquidade no meio ambiente associada a práticas de agricultura intensiva usadas na carne e no peixe, indústrias e reciclagem de matérias-primas para alimentação animal tem favorecido e contribuído significativamente para a sua contínua proeminência em carne de animais e produtos derivados (Baird-Parker et al, 2000).

2.6.8 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes são bactérias gram positivas, não esporuladas, anaeróbias facultativas e móveis através de flagelos peritricos.

É um microrganismo amplamente distribuído pelo ambiente e pode ser encontrado em diversos locais como, solo, esgotos, água, silagens, resíduos de matadouros e matéria fecal.

Listeria spp são microrganismos psicotróficos, capazes de crescer a temperaturas de refrigeração, são uma preocupação pois alteram o tempo de vida de prateleira dos alimentos refrigerados. A capacidade deste microrganismo crescer numa vasta gama de temperatura e em ambientes ácidos, bem como na ausência ou pequena quantidade de O₂, permite que esta se multiplique em diversos ambientes (Baird-Parker et al, 2000).

A contaminação de produtos cárneos por *L.monocytogenes* pode ser proveniente das instalações frigoríficas ou das salas de corte, mãos e equipamentos. Os principais

pontos de contaminação adicional incluem o contacto de alimentos com superfícies contaminadas, contaminação cruzada entre alimentos crus e processados, e processos de limpeza e desinfeção inadequados.

Este patogéneo pode causar infeções alimentares graves e a sua contaminação pode ocorrer em todas as fases da cadeia de fabrico de alimentos a partir de matérias-primas. Diversas categorias de alimentos que são preparados e armazenados de formas diferentes e em condições diversas podem ser contaminados, tais como: leite, gelado, peixes fumados e produtos de charcutaria.

Normalmente a cocção completa e pasteurização dos alimentos destroem a bactéria.

3. Material e Métodos

3.1 Localização e Instalações

Os animais foram abatidos no Matadouro Municipal de Bragança.

As salsichas foram produzidas na empresa Bísaro – salsicharia tradicional, situada em Gimonde.

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança, no Instituto Politécnico de Bragança.

3.2 Matéria-prima

Para a realização dos enchidos utilizados neste trabalho foram utilizadas 280 cabras de raça Serrana e 280 ovelhas Churra Galega Bragançana com idades entre os 5 e os 7 anos, com um peso vivo médio para os ovinos entre 35–50 kg e para os caprinos entre 25-40 kg. Na desmancha os animais, foram divididos em partes (direita e esquerda). Para o fabrico dos enchidos foi usada a parte direita do animal. O abate dos animais foi feito mensalmente entre os meses de Novembro de 2011 e Maio de 2012.

Estes animais foram fornecidos pela Associação Nacional de Caprinicultores de raça Serrana, ANCRAS, e pela Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça Churra Galega Bragançana, ACOB, provenientes de produtores do distrito de Vila Real e Bragança, cujo sistema de produção extensiva e alimentação é baseado em pastagens naturais, restolhos de cereais, palhas e complementos de cereais.

Na figura 3, apresenta-se de uma forma sumária o diagrama do processo de obtenção das salsichas.

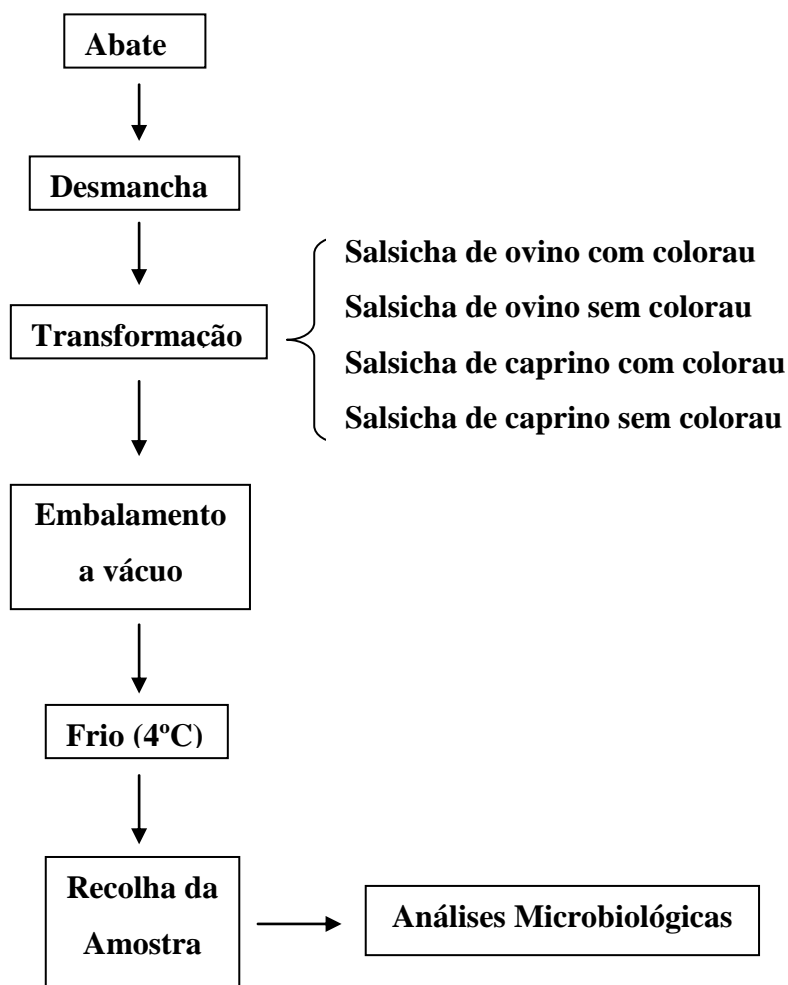


Figura 3 - Diagrama do processo de obtenção das salsichas frescas de ovino e caprino

3.3 Análises Microbiológicas

Neste trabalho foram avaliadas 4 amostras de salsichas de ovino com colorau, 4 amostras de salsichas de caprino com colorau, 5 amostras de salsichas de ovino sem colorau e 5 amostras de salsichas de caprino sem colorau (N=54). Todas as amostras foram efetuadas em triplicado.

3.3.1 Colheita/Receção das amostras

As amostras foram recebidas embaladas em vácuo e congeladas. Apesar deste produto ser consumido fresco, como não foi possível efetuar as análises logo após receção da amostra procedeu-se ao seu congelamento.

A sua preparação foi efetuada em condições de assepsia, juntando 10g de salsicha, retiradas de forma aleatória do enchido, com 90ml de água peptonada (numa proporção de 1/10). Estes foram colocados no liquidificador durante cerca de 1-2 minutos em agitação mínima, obtendo-se assim a solução-mãe.

Após 30 a 60 minutos de repouso procedeu-se à realização das diluições e dos protocolos de análise.

A preparação e composição dos meios de cultura estão descritas em anexo.

3.3.2 Contagem total da flora microbiana aeróbia mesófila

A contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos totais foi efetuada segundo a ISO 4833 (2003). Foi realizada por incorporação, sendo colocado 1ml de cada diluição decimal na placa de petri com o meio de cultura Plate Count Agar (PCA), incubado a 30°C durante 72h. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (UFC/g).

3.3.3 Contagem total da flora microbiana aeróbia psicrófila

A contagem dos microrganismos aeróbios psicrófilos totais foi efetuada segundo a NP 2307 (1987). Realizou-se por espalhamento, sendo colocado 0,1ml de cada diluição em meio de cultura Plate Count Agar (PCA), incubado a $6,5 \pm 0,5$ °C durante 10 dias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (UFC/g).

3.3.4 Quantificação de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi efetuada segundo NP 2077 (1985), realizada por espalhamento de 0,1ml de cada diluição em meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) e incubado a 23 ± 2 °C durante 5 dias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (UFC/g).

3.3.5 Quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para a contagem e identificação de coliformes totais e *Escherichia coli* foi usado o kit Simplate, desenvolvido pela empresa Bio Control (método oficial AOAC).

O meio fornecido foi hidratado em 100ml de água estéril. Posteriormente foram colocados em tubo de ensaio 9ml do meio de hidratação e 1 ml da amostra, que se homogeneizou no vórtex. Inoculou-se a amostra na placa espalhando o líquido com movimentos circulares, para que os 84 poços ficassem cobertos e sem bolhas de ar, sendo o excesso de líquido removido no final. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24h a 48h. Após incubação, a contagem de coliformes totais foi efetuada contando cada poço com alteração da cor inicial do meio de cultura; a identificação e quantificação de *E. coli*, foi realizada expondo cada placa a uma lâmpada de UV (365nm) contando os poços onde se verificava fluorescência (Figura 5).

O número de coliformes foi calculado no final através da tabela fornecida pelo fabricante.



Figura 4 – Kit Simplate

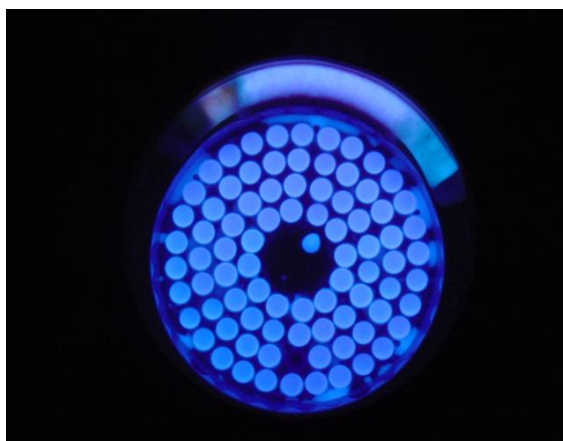


Figura 5 – Fluorescência na presença de *E. coli*, quando exposta a placa a uma lâmpada de UV (365nm)

3.3.6 Pesquisa de estafilococos coagulase positiva pela técnica de cultura com confirmação de colônias

A pesquisa de estafilococos coagulase positiva foi efetuada segundo a NP 4400-1:2002, realizada por espalhamento de 0,1ml de cada diluição decimal em meio de cultura seletivo Baird-Parker enriquecido com gema de ovo. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h a 48h. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de produto analisado (UFC/g).

As colônias características de *S.aureus*, ou seja colônias negras com halo transparente, foram repicadas e semeadas em tubo com meio Brain Heart Infusion (BHI), a 37°C durante 20h a 24h. Para pesquisa da enzima coagulase, foram inoculados 0,1ml de cada cultura em 0,3ml de plasma de coelho e incubou-se a 37°C durante 4h a 6h.

3.3.7 Pesquisa e quantificação de clostrídios sulfito-redutores

A pesquisa e quantificação de clostrídios sulfito-redutores, foi realizada tendo em consideração a norma ISO 6461/1 (1986). Aqueceu-se a amostra a 80°C durante 10 minutos, distribuída por tubos de ensaio com quantidades de 10ml, 5ml, 1ml e 0,1ml em triplicado. Posteriormente adicionou-se meio de cultura seletivo e diferencial descrito em anexo. Incubou-se em condições de anaerobiose, a 37°C durante 48h. Os resultados

foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (UFC/g).

3.3.8 Pesquisa de *Salmonella* spp

A pesquisa de *Salmonella* spp foi efetuada através do kit 1-2 TEST desenvolvido pela empresa BioControl e Ambifood.

A solução mãe foi incubada a 37 °C durante 18h ± 2h. Foi realizado um enriquecimento seletivo transferindo 1ml da solução para um tubo contendo 9ml de solução tetrionato ativado com iodo-iodeto (TBG), e incubou-se em banho-maria a 24 °C durante 6 a 8h. Após incubação, realizou-se o kit tal como o descrito pelo fabricante para alimentos crus ou altamente contaminados.



Figura 6 – Kit 1-2 TEST

3.3.9 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi efetuada através do método CHROMagar™ Listeria. Colocou-se 1g de amostra em 9ml de meio de Fraser durante 24h a 30°C, após incubação espalharam-se 100 µl sobre uma placa CHROMagar Listeria, até o líquido ser absorvido. Incubou-se durante 24 ± 2 h a 37 ± 1° C.

Na interpretação dos resultados, consideraram-se colónias características, as azuis com halo transparente, regulares e com um diâmetro não superior a 3mm. No caso de haver colónias características fez-se a confirmação por métodos convencionais ou através da identificação em meio de Listeria CHROMagar.

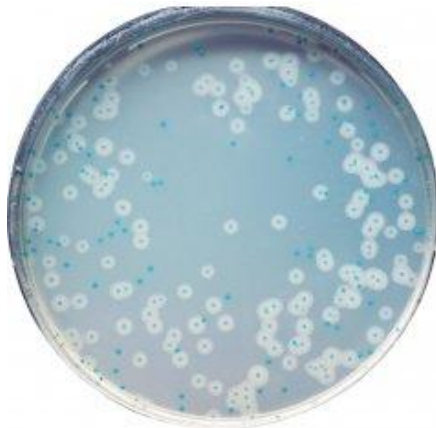


Figura 7 – Placa CHROMagar Listeria

3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância. Recorreu-se ao teste One-way ANOVA, para verificar se havia diferenças significativas entre as amostras e sempre que se verificou a existência de diferenças recorreu-se ao teste de Tukey's HSD ($\alpha= 0,05$). O programa usado foi o SPSS versão 19. Os resultados estão expressos, nas Tabelas 1 e 2.

4. Resultados e Discussão

O presente trabalho teve como objetivo analisar um novo produto alimentar, por isso é de extrema importância avaliar a sua qualidade microbiológica.

A avaliação da flora microbiana total de um produto alimentar é o processo mais utilizado para avaliar a sua qualidade, segurança e boas práticas de higiene no processo de fabrico.

Este produto alimentar foi transformado, embalado a vácuo e refrigerado, é um produto fresco com um tempo de vida útil estimado de 72h. Convém salientar que, não se enquadra nos produtos referidos nos regulamentos (CE) N° 2073/2005, e (CE) 1441/2007, nem nas normas microbiológicas de M^a Begoña de Pablo e Manuel Moragas (2008). Neste regulamento apenas existem valores limite para *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Listeria spp*. Pelo que, no presente trabalho os resultados obtidos, foram comparados com os obtidos por outros investigadores em produtos similares.

Nas tabelas 1 e 2 apresentam-se os resultados obtidos, para, mesófilos, psicrófilos, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras, esporos de clostrídios sulfito-redutores, coliformes totais, *E.coli*, e presença de *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*.

Tabela 1 - Valores obtidos para mesófilos, psicrófilos, *S.aureus*, bolores e leveduras, clostrídios sulfito-redutores, coliformes totais, *E.coli*, *Salmonella spp* e *L.monocytogenes*, nas salsichas obtidas a partir de carne de ovino com e sem colorau

| UFC/g | Ovino com colorau | Ovino sem colorau |
|--------------------------------------|---|---|
| Mesófilos totais | 6,6 x 10 ⁴ ± 1,5x10 ⁵ (1) (<10 – 5,3x10 ⁴) ab (2) | 3,8 x 10 ⁴ ± 1,3x10 ⁵ (1) (<10 – 1,8x10 ⁵) ab (2) |
| Psicrófilos | 5,7 x 10 ⁴ ± 2,7x10 ⁴ (1) (<10 – 9,4x10 ⁴) a (2) | 3,3 x 10 ⁴ ± 2,4x10 ⁴ (1) (<10 – 9,2x10 ⁴) a (2) |
| Bolores e Leveduras | 7,5 x 10 ⁵ ± 2,9x10 ⁵ (1) (<10 – 7,1x10 ⁶) a (2) | 3,0 x 10 ⁵ ± 2,6x10 ⁵ (1) (<10 – 1,6x10 ⁶) a (2) |
| Coliformes | 1,1 x 10 ⁵ ± 7,1x10 ⁴ (1) (<10 – 4,7x10 ⁵) a (2) | 1,4 x 10 ⁵ ± 6,3x10 ⁴ (1) (<10 – 7,3x10 ⁵) a (2) |
| <i>E.coli</i> | <10 | <10 |
| <i>Salmonella spp</i> | n.d | n.d |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | n.d | n.d |
| Clostrídios sulfito-redutores | n.d | n.d |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | n.d | n.d |

n.d – não detetado; a e b – médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ($p > 0,05$); UFC/g – Unidades Formadoras de Colónias por grama. (1) Média ± DV, (2) Variação.

Tabela 2 - Valores obtidos para mesófilos, psicrófilos, *S.aureus*, bolores e leveduras, clostrídios sulfito-redutores, coliformes totais, *E.coli*, *Salmonella spp* e *L.monocytogenes*, nas salsichas obtidas a partir de carne de caprino com e sem colorau

| UFC/g | Caprino sem colorau | Caprino com colorau |
|--------------------------------------|--|--|
| Mesófilos totais | 7,2 x 10 ³ ± 1,3x10 ⁵ (1) (<10 – 1,9x10 ⁴) b (2) | 5,6 x 10 ⁵ ± 1,5x10 ⁵ (1) (1,0x10 ⁴ – 6,9x10 ⁴) a (2) |
| Psicrófilos | <10 | 9,7 x 10 ⁴ ± 2,7x10 ⁴ (1) (<10 – 5,5x10 ⁵) a (2) |
| Bolores e Leveduras | 1,1 x 10 ³ ± 2,6x10 ⁵ (1) (<10 – 6,0x10 ³) a (2) | 8,4 x 10 ³ ± 2,9x10 ⁵ (1) (<10 – 4,7x10 ⁴) a (2) |
| Coliformes | 1,8 x 10 ⁴ ± 6,3x10 ⁴ (1) (<10 – 5,5x10 ⁴) a (2) | 2,3 x 10 ⁵ ± 7,1x10 ⁴ (1) (<10 – 1,4x10 ⁶) a (2) |
| <i>E.coli</i> | <10 | <10 |
| <i>Salmonella spp</i> | n.d | n.d |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | n.d | n.d |
| Clostrídios sulfito-redutores | n.d | n.d |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | n.d | n.d |

n.d – não detetado; a e b – médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ($p > 0,05$); UFC/g – Unidades Formadoras de Colónias por grama. (1) Média ± DV, (2) Variação.

Da análise da tabela 1 verifica-se que para as salsichas de ovino com colorau os mesófilos aeróbios totais oscilaram entre 2,0 e 5,3x10⁴ UFC/g, sendo o valor médio obtido de 6,6x10⁴ ± 1,5x10⁵ UFC/g.

Esteves (2005) e Esteves et al (2006) obtiveram valores para este parâmetro de 1,9x10⁸ e 1,0x10⁸ UFC/g, em enchidos (alheiras), segundo estes reveladores de deficiente qualidade microbiológica.

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), em alimentos prontos a comer (cozinhados) para enchidos, estes são considerados satisfatórios se os mesófilos forem ≤ 10³ e aceitáveis para valores > 10³ ≤ 10⁵.

Nogueira Pinto et al (1999) observaram que 44,7% das amostras de salsichas comerciais analisadas apresentaram contagens de mesófilos entre 10² e 10³ UFC/g e 28.9% acima de 10⁵ UFC/g.

Verifica-se que os resultados obtidos para os aeróbios mesófilos no nosso trabalho se encontram dentro dos padrões microbiológicos e são inferiores aos determinados pelos investigadores referidos anteriormente, em produtos similares.

Os microrganismos psicrófilos oscilaram entre 0 e $9,4 \times 10^4$ UFC/g, com uma média de $5,70 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^4$ UFC/g, estando os valores dentro dos limites referidos por Roça e Serrano, 1995. De facto, segundo estes autores a deterioração da carne tem início quando os psicrófilos se encontram na faixa de 10^6 UFC/g, provocando descoloração do produto; para valores na gama de 10^7 e 10^8 UFC/g surgem odores estranhos; quando atingem valores de 10^9 UFC/g, ocorrem alterações indesejáveis de sabor e forma-se limo superficial.

Para os bolores e leveduras o valor médio obtido foi de $7,50 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^5$, variando os valores entre 0 e $7,1 \times 10^6$ UFC/g. Estes valores foram superiores aos descritos por Boissonet et al (1994). Segundo este investigador, as leveduras desenvolvem-se nos enchidos nas primeiras três semanas do processo, rondando o seu teor os 10^3 e 10^4 UFC/g.

Os coliformes totais oscilaram entre 1,0 e $4,7 \times 10^5$ UFC/g, sendo o valor médio obtido de $1,10 \times 10^5 \pm 7,1 \times 10^4$ UFC/g. Segundo o INSA e como referido anteriormente, em produtos cozinhados, para coliformes totais os valores considerados satisfatórios são ≤ 10 , aceitáveis $>10 \leq 10^3$ e não satisfatórios $>10^3$. De acordo com a Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001, ANVISA, o valor de tolerância para os coliformes totais é 5×10^3 . Os valores obtidos no nosso produto situam-se acima dos legislados no Brasil, o que pode ser explicado pela diferença de matéria-prima (ovinos e caprinos) e pelo facto de se tratar de um produto não cozinhado.

Da análise da tabela 1, verifica-se que nas salsichas de ovino sem colorau o valor médio para os microrganismos mesófilos aeróbios foi de $3,80 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^5$ UFC/g. Relativamente aos psicrófilos estes variaram entre 1,0 e $1,8 \times 10^5$ UFC/g. Os valores médios obtidos para bolores e leveduras e para os coliformes totais foram $3,0 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^5$ e $1,4 \times 10^5 \pm 6,3 \times 10^4$, respetivamente.

Também, à semelhança do observado para as salsichas de ovino com colorau estes valores foram inferiores aos determinados por Esteves (2005) e Esteves et al

(2006) para os microrganismos mesófilos aeróbios, e por Roça e Serrano (1995) para os psicrófilos. Relativamente aos coliformes totais, ultrapassaram o valor estipulado pela ANVISA.

Na tabela 2 constata-se que nas salsichas de caprino com colorau os valores dos microrganismos mesófilos totais oscilaram entre $1,0 \times 10^4$ e $6,9 \times 10^4$ UFC/g. Estes valores foram inferiores aos determinados por Nogueira Pinto et al (1995), em salsichas comerciais, e Esteves et al (2006), em alheiras.

Verificaram-se diferenças significativas para os mesófilos aeróbios entre as salsichas de caprino com e sem colorau, $p \leq 0.05$ ($p=0.030$). Analisando o fator que contribuiu para esta diferença, constatou-se que foi devida ao colorau ($p=0.047$) e que entre as espécies não se obtiveram diferenças significativas (Tab. 3 e 4).

Relativamente aos microrganismos psicrófilos os valores médios obtidos foram $9,70 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^4$. No que respeita aos bolores e leveduras e coliformes totais obtiveram-se valores de $8,4 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^5$ e $2,3 \times 10^5 \pm 7,1 \times 10^4$ UFC/g, respetivamente.

Para as salsichas de caprino sem colorau (Tabela 2) os aeróbios mesófilos oscilaram entre 2,0 e $1,9 \times 10^4$ UFC/g, com um valor médio de $7,2 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^5$ UFC/g. Para os microrganismos psicrófilos, bolores e leveduras e coliformes totais foram obtidos os seguintes valores médios, <1 ; $1,1 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^5$ e $1,8 \times 10^4 \pm 6,3 \times 10^4$, respetivamente.

E.coli e indicadores de segurança (*Listeria spp*, clostrídios sulfito redutores, *Salmonella spp* e *S.aureus*), estavam ausentes em todas as amostras em estudo, ou seja, em salsichas de ovino e caprino, com e sem colorau, sugerindo que estes produtos são seguros do ponto de vista microbiológico.

De facto, segundo a Portaria n.º 451, de 19 de setembro de 1997, ANVISA a tolerância máxima permitida para *S.aureus* em produtos cárneos refrigerados ou congelados é de $5,0 \times 10^3$ UFC/g. No que diz respeito aos esporos de clostrídios sulfito redutores, o máximo permitido em enchidos cárneos é de $3,0 \times 10^3$ UFC/g de alimento.

Em algumas das nossas amostras estavam presentes colónias de *S.aureus* não características, isto é, colónias cinzentas sem halo transparente e coagulase negativa. Estas colónias foram isoladas e estão a ser identificadas no Centro Hospitalar do Nordeste – Bragança, no entanto o resultado dessa identificação ainda não é conhecido.

Convém salientar que os critérios microbiológicos fornecem-nos orientações sobre a aceitabilidade dos produtos alimentares e os seus processos de fabrico.

Efeito do colorau e da espécie na qualidade microbiológica dos enchidos

| | Mesófilos | Psicrófilos | Leveduras | Coliformes totais |
|---------|------------------|--------------------|------------------|--------------------------|
| Colorau | 0,047 | 0,661 | 0,324 | 0,192 |

Tabela 3 – Efeito do colorau na qualidade microbiológica das salsichas

| | Mesófilos | Psicrófilos | Leveduras | Coliformes totais |
|----------|------------------|--------------------|------------------|--------------------------|
| Espécies | 0,117 | 0,491 | 0,091 | 0,726 |

Tabela 4 – Efeito da espécie na qualidade microbiológica das salsichas

Da análise dos gráficos 1,2 e 3 observa-se que as contagens mais elevadas foram obtidas para as amostras de caprino com colorau no que diz respeito aos mesófilos aeróbios, psicrófilos e coliformes totais. Contagens superiores de leveduras foram observadas nas amostras de ovino com colorau (gráfico 4). As amostras de caprino sem colorau foram as que apresentaram os valores mais reduzidos para todos os parâmetros analisados.

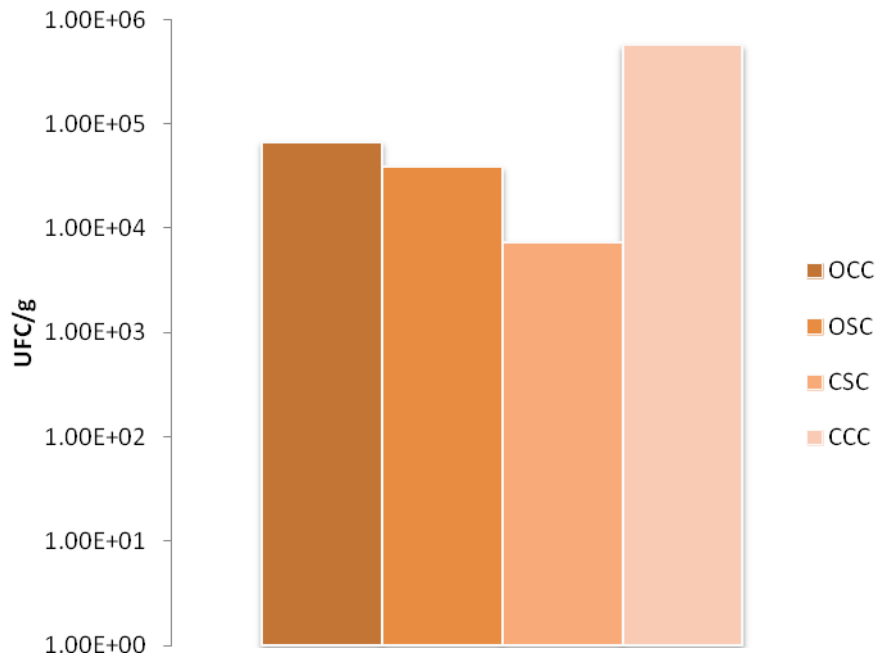


Gráfico 1 – Contagem total média de mesófilos

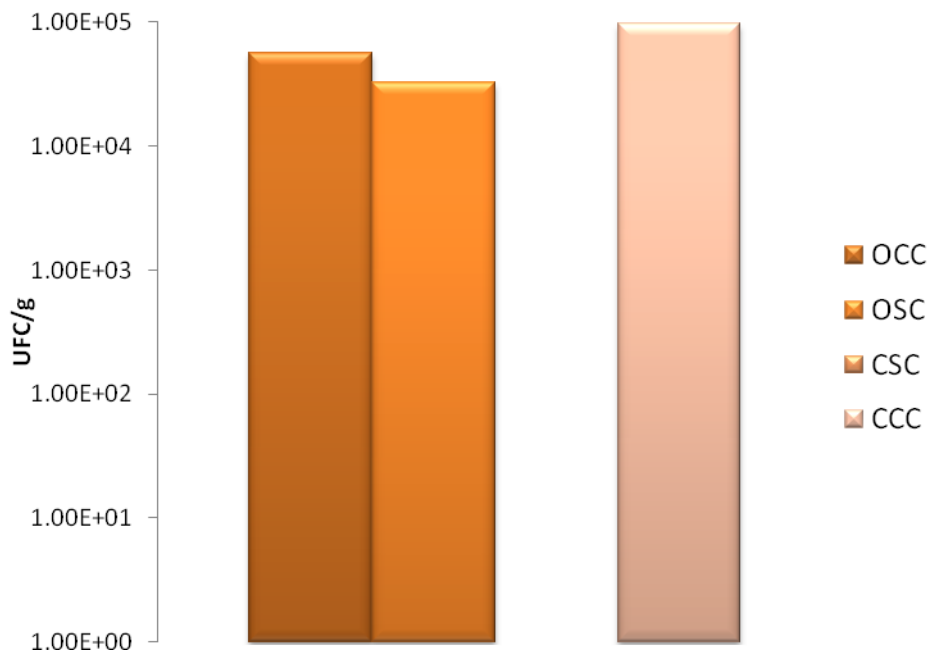


Gráfico 2 – Contagem total média de psicrófilos

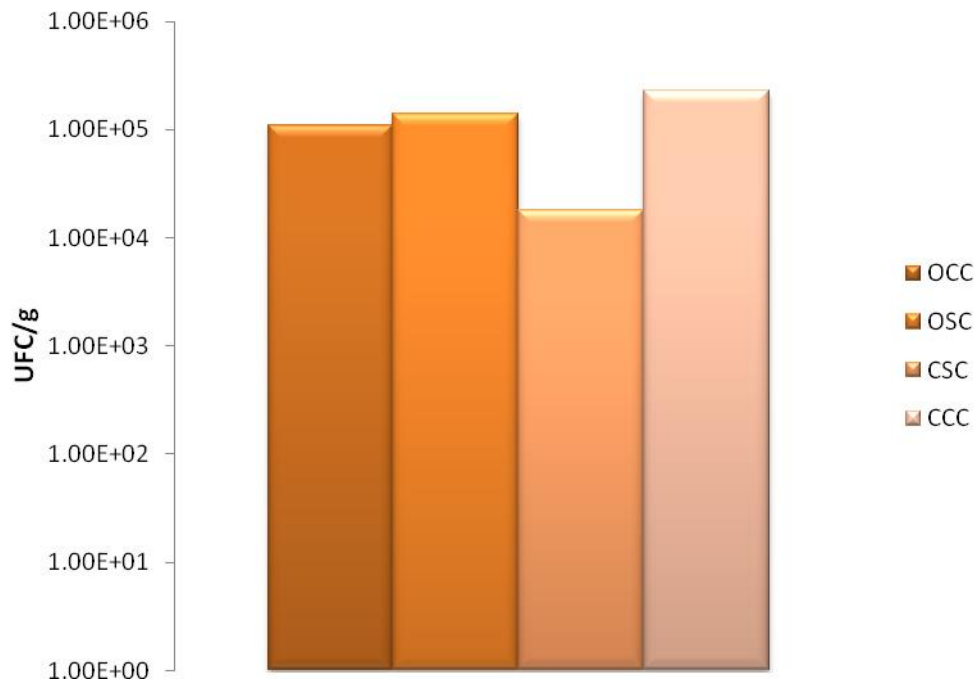


Gráfico 3 – Contagem total média de coliformes totais

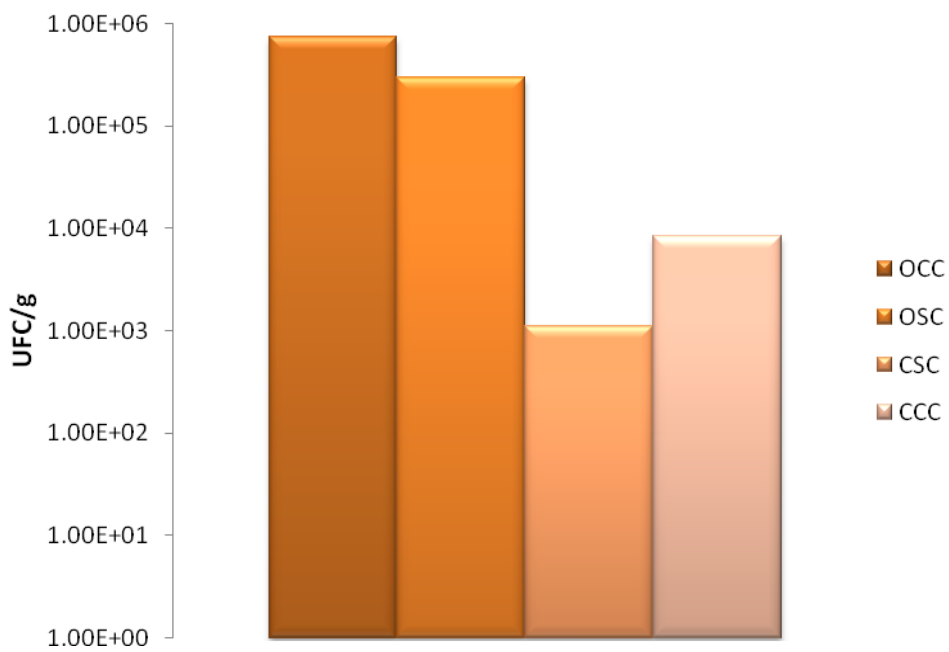


Gráfico 4 – Contagem total média de leveduras

5. Conclusões

Os produtos analisados apresentaram níveis microbiológicos satisfatórios quer no que diz respeito aos parâmetros de qualidade comercial (microrganismos aeróbios mesófilos, psicrófilos e bolores e leveduras), quer no que respeita à qualidade sanitária (coliformes totais e fecais) e segurança (*Salmonella*, clostrídios sulfito-redutores, *Listeria spp* e *Staphylococcus aureus*).

A ausência de *E.coli*, *Salmonella spp*, clostrídios sulfito-redutores e *Listeria spp* evidenciam que este tipo de produto é seguro para os consumidores.

Os microrganismos aeróbios mesófilos, psicrófilos e bolores e leveduras situaram-se dentro dos limites para produtos similares obtidos por diversos autores sugerindo que foram seguidas boas práticas de higiene, manipulação, limpeza e desinfecção durante o processo de produção, transformação e conservação destes produtos e utilizada matéria-prima de boa qualidade.

Não se verificaram diferenças significativas na qualidade microbiológica dos enchidos obtidos a partir de carne de ovino e caprino, no entanto, os aeróbios mesófilos dos enchidos de caprino com e sem colorau foram significativamente diferentes.

Perspetivas Futuras

- Verificar a evolução da microflora ao longo de todo o processo de fabrico e não apenas no produto final.
- Efetuar análises no produto cozinhado.
- Análise microbiológica ao colorau.

6. Referências Bibliográficas

- AOAC, Official Method of Analysis, 15th ed., AOAC, Washington, DC, (1990) aspects, chemistry, microbiology, technology. Utrecht: ECCEAMST. ISBN 90-75319-04-5. p 31-46
- Baird-Parker, T.C. Gould, G. W. Lund B.M. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol 1. An Aspen Publication, 2000, cap.18
- Barreto, H. Caracterização Preliminar da Microbiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protetoras, Lisboa, 2009
- Benchat, L. R. Doyle, M. P. Montville, T. J. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. ASM Press – Whashington D.C, p. 66-79, 129-187, 353-372, 697-708.
- Blood, R.M. and Curtis, G. D.W. Media for 'total' Enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli. *Int. J. Food Microbiol*, 1995.
- Carmo, L.S, Dias, R. S., Linardi, V. R., Sena, M. J., Santos, D. A. An Outbreak of staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, MG, Brazil. *Braz Arch Biol Technol*. V.46, 2003.
- Lacasse, D., Introdução à Microbiologia Alimentar, Instituto Piaget, Ciência e Técnica, 1998.
- Esteves, A. (2005) - Perigos microbiológicos em alheira: Principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 258 f. Tese de doutoramento.
- Esteves, A., Saraiva, C., e Martins, M. C. F. C. (2006). Qualidade higiénica e segurança de produtos de salsicharia transmontana provenientes de produtores particulares, *101*, 109–114.

- Ferreira, M. C., Fraqueza, M. J., e Barreto, A. S. Avaliação do prazo de vida útil da sal-sicha fresca, *102*, 141–143, 2007.
- Forsythe, Stephen J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Trad. Maria carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – Porto Alegre: Artmed, 2002.
- Fraqueza, M.J. (2008). Tecnologia dos productos cárneos: Ingredientes. In Aulas de Tecnologia Produtos Animais. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária.
- Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. Microrganismos indicadores. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2007. cap. 3.
- Haenlein, G.F.W.. Role of goat meat and milk in human nutrition. Proceedings Vth Intern. Conf. Goats, New Delhi, India, 1992a, II: 575 – 580.
- Huis in't Veld JHJ. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int J Food Microbiol*, 1996;33:1–18.
- ISO 4400:1 (2002). Contagem de estafilococos coagulase positiva.
- ISO 4833 (2003). Contagem de microrganismos a 30°C.
- ISO 6461/1 (1986). Detecção enumeração de esporos sulfite-redutores anaeróbios (clostrídios) Parte1: Método por enriquecimento em meio líquido.
- Jay, J. M. *Modern Food Microbiology*. 6th ed. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 2000.
- Jay, J., M. *Microbiologia de alimentos*. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- Lacasse, D. *Introdução à Microbiologia Alimentar*, Ciência e Técnica, Instituto Piaget, 1998.

- Lorenzo, J. M., Temperán, S., Bermúdez, R., Cobas, N., & Purriños, L. (2012). Changes in physico-chemical, microbiological, textural and sensory attributes during ripening of dry-cured foal salchichón. *Meat science*, 90(1), 194–8.
- Lechowich, R.V. Microbiologia de la carne. In: Price, J.F.; Schweigert, B.S., ed. *Ciência de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza: Acribia, 1976. p.235-94.
- Milani, L.I.G. et al. Bioproteção de linguiça de frango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.2, p.161-166, 2003.
- Nogueira Pinto, J.P.A et al. Avaliação Microbiológica de produtos embutidos encamiñados ao serviço de orientação à alimentação pública (SOAP) da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu. *Higiene Alimentar*, V.13, n.61, p.69-70, 1999.
- NP-723 (1989) – Salsicha fresca. Definição e características.
- NP-2307 (1987). Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de microrganismos psicrotróficos.
- NP-2077 (1985). Carnes, derivados e produtos cárneos. Contagem de bolores e leveduras.
- Patarata, L., Esteves, A., Silva, A., Pinto, M. V., e Saraiva, C. Qualidade e segurança de produtos cárneos, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; Centro de Ciência Animal e Veterinária.
- Regulamento (CE) n.º 853/2004 - Estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.
- Regulamento (CE) N.o 854/2004 Do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano.

Regulamento (CE) N.º 1441/2007 Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.

Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil).

Salavessa, J. Salsicharia tradicional da Zona do Pinhal - Caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos, Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária, 2009.

Samelis, J., F. Maurogenakis and J. Metaxopoulos. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami, 1994, p. 179-196.

Santos M.I., Correia C., Cunha C.M.I., Saraiva M.M., Novais M.R.; Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – INSA; Centro de Segurança Alimentar e Nutrição – CSAN - Valores Guia para a avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração.

Siqueira, R. S. Manual de microbiologia de alimentos. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agro-industrial de Alimentos; Rio de Janeiro, 1995.

Sobral, M et al, Recursos Genéticos: Raças Autóctones, espécies ovina e caprina; 1987.

Sousa, P.M. e A.M. R. Ribeiro. - Chouriço de carne Português. Tecnologia da Produção e Caracterização Química, Microbiológica e Tecnológica, 1983.

Suttherland, J.M. Varnam A. Meat and Meat Products: Technology, Chemistry and Microbiology; Vol 3; Chapman & Hall, 1995.

Teixeira, A, Batista, S., Delfa, R., Cadavez, V. (2005). Lamb meat quality of two breeds with protected origin designation. Influence of breed, sex and live weight. *Meat science*, 71(3), 530–6.

Teixeira A.; Produção e comercialização integrada de produtos caprinos e ovinos com denominação de origem : Uma experiência de Portugal, 2009.

Teixeira, A., Pereira, E., Rodrigues, E. S. (2011). Goat meat quality. Effects of salting, air-drying and ageing processes. *Small Ruminant Research*, 98(1-3), 55–58.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. In: *Microbiologia*, 6a ed, São Paulo: Artmed,, 2003.

Valceschini, Egizio; Nicolas, François 1995, “La dynamique économique de la qualité agro-alimentaire”, In François Nicolas et Egizio Valceschini, Eds, *Agro-Alimentaire: Une Economie de la Qualité*, Economica, INRA, p. 15-37.

Anexos

A. Meios de Cultura

1. Plate Count Agar (PCA) – Meio para pesquisa de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrofílos

Extrato de levedura – 2.50g/L

Dextrose – 1.00g/L

Agar – 15.00g/L

pH final (25°C) – 7.0 ± 0.2

Dissolveram-se 23.5g de meio em 1000ml de água destilada. Ferveu-se para uma completa dissolução e esterilizou-se na autoclave a uma pressão de 15lbs a 121°C durante 15 minutos. Após arrefecer e agitar verteu-se nas placas.

2. Potato Dextrose Agar (PDA) – Meio para pesquisa de bolores e leveduras

Infusão de batata – 200.00g/L

Dextrose – 20.00g/L

Agar – 15.00g/L

pH final (25°C) – 5.6 ± 0.2

Dissolveram-se 39g em 1000ml de água destilada. Ferveu-se até completa dissolução do meio. Procedeu-se á esterilização na autoclave a uma pressão de 15 lbs a 121°C durante 15 minutos. Após arrefecer e agitar verteu-se nas placas.

3. Baird – Parker (BP) - Meio para pesquisa de Estafilococos coagulase positiva

Triptona – 10.00g/L
Extrato de carne – 5.00g/L
Extrato de leveduras – 1.00g/L
Glicina – 12.00g/L
Piruvato de Sódio – 10.00g/L
Cloreto de Lítio – 5.00g/L
Agar – 20.00g/L

pH final (25°C) – 7.0 ±0.2

Suspendeu-se 63.0g de meio em 950ml de água destilada. Ferveu-se para dissolver completamente e esterilizou-se na autoclave a uma pressão de 15lbs a 121°C durante 15 minutos. Agitou-se bem, deixou-se arrefecer e verteu-se nas placas.

4. Meio para pesquisa de Clostrídios sulfito redutores

Agar - 18g
Água - 600mL
Solução de Sulfito de Sódio (Na₂SO₃) - 90mL
Solução de Sulfato de Ferro - 6mL
Alúmen de Ferro - 2gotas
Sulfato de sódio - 2mL

pH final (25°C) - 7.6 ± 0.1