

**QUALIDADE NUTRICIONAL E MICROBIOLÓGICA DE ENCHIDOS**

**Juliana Isabel Susano Mendes**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do  
Grau de Mestre em Tecnologias da Ciência Animal*

Orientado por:

**Prof. Dra. Maria Leticia Fernandes Estevinho**

Coorientado por:

**Prof. Dr. Alfredo Costa Teixeira**

**Bragança**

**2013**

## **Agradecimentos**

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Letícia Fernandes pela sua disponibilidade e ajuda para me orientar na elaboração deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Sandra Rodrigues e ao Prof. Alfredo pela ajuda e disponibilidade na elaboração deste trabalho.

Às técnicas, D.<sup>a</sup> Arminda e D.<sup>a</sup> Fátima, do Laboratório de Microbiologia, pela ajuda, disponibilidade e momentos de alegria.

À técnica do Laboratório de Carnes, Bina, pela sua ajuda e disponibilidade.

À Andreia e Ana, de Engenharia Biotecnológica, que estagiaram no Laboratório de Microbiologia, pela ajuda que me deram no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os estagiários, que passaram pelo laboratório, pelos momentos de alegria e diversão.

Aos meus pais pela ajuda, apoio, compreensão e paciência que tiveram nesta fase da minha vida.

À minha família pelo apoio que me deram.

Aos meus amigos pela amizade.

## RESUMO

Os produtos de salsicharia tradicional portuguesa são, pelas suas características psico-sensoriais, produtos alimentares da mais alta qualidade, constituindo um património cultural que interessa preservar. A elaboração de enchidos constitui uma forma de conservação da carne. A produção de enchidos tradicionais, quer de forma artesanal quer a nível mais industrializado, deverá ser enquadrada segundo as exigências actuais de higiene/salubridade, numa dupla perspectiva: de protecção do consumidor e de valorização económica dos recursos locais. Os consumidores têm tendência para valorizar especialmente as características psico-sensoriais e nutricionais dos produtos tradicionais, embora também tenham vindo a dar cada vez mais importância à segurança dos alimentos. A qualidade do produto pode estar em causa sempre que se desenvolvem microrganismos que comprometam o sabor, o cheiro, a consistência e o aspecto destes produtos, ou seja, microrganismos envolvidos em processos glicolíticos, proteolíticos e lipolíticos. Neste contexto, surgiram estratégias de valorização comercial dos produtos tradicionais, através da certificação e consequente atribuição das marcas. O processo de certificação é um recurso importante para a protecção destes produtos, uma vez que, para além de se procurar assegurar as condições de higiene com que estes são produzidos, também são respeitados os métodos de fabrico tradicionais, garantindo, assim, a autenticidade e a origem dos mesmos.

Neste estudo avaliaram-se as características físico-químicas e nutricionais e a segurança microbiológica de cinco amostras de enchidos portugueses diferentes.

Da análise dos nossos resultados, para as características físico-químicas e nutricionais, verificou-se que as cinzas situaram-se entre 3,81 e 6,5%, pH entre 4,52 e 6,04,  $a_w$  entre 0,81 e 0,95, humidade entre 1,37 e 3,58% e gordura total entre 6,22 e 47,86g.

Da análise microbiológica das várias amostras de enchidos, verificou-se que os mesófilos tinham valores compreendidos entre 3,01 e 5,75 log UFC/g, psicrófilos entre 0,0 e 4,92 log UFC/g, bolores e leveduras entre 0,0 e 5,71 log UFC/g, coliformes entre 0,0 e 4,67 log UFC/g, *Escherichia coli* entre 0,0 e 3,63 log UFC/g e presença de *Staphylococcus aureus*.

**Palavras-chave:** enchidos, certificação, segurança microbiológica, características nutricionais, características físico-químicas.

## ABSTRACT

The traditional Portuguese sausage products are, by their nature psycho-sensory, food products of the highest quality and are a cultural heritage that matters preserve. The preparation of sausages is one way of keeping the meat. The production of traditional sausages, either by hand or at most industrialized, should be framed in accordance with the current requirements of hygiene / sanitation, a double perspective: consumer protection and economic valorization of local resources. Consumers tend to appreciate especially the psycho-sensory characteristics and nutritional of traditional products, although they have also been giving more importance to food safety. Several microorganisms (lipolytic, glucoytic and proteolytic microorganism) can develop in dry smoked sausages and undertake changes on their taste, smell, consistency, flavour and aspect. In this context, emerged strategies on commercial value of traditional products, through certification and consequent allocation of marks. The certification process is an important feature for protecting such products, since, in addition to seeking to ensure the hygiene conditions in which they are produced, are also adhered to traditional manufacturing methods, thus guaranteeing the authenticity and the same origin.

In this study we evaluated the physical-chemical and nutritional characteristics and microbiological safety of five different samples of Portuguese sausages.

From the analysis of our results, for the physical-chemical and nutritional characteristics, it was found that the ashes were between 3.81 and 6.5%, pH between 4.52 and 6.04,  $a_w$  between 0.81 and 0.95, moisture between 1.37 and 3.58% and total fat between 6.22 and 47.86 g.

From the microbiological examination of multiple samples of sausages, it was found that the mesophiles had values between 3.01 and 5.75 log UFC/g, psychrophiles between 0.0 and 4.92 log UFC/g, molds and yeasts between 0.0 and 5.71 log UFC/g, coliforms between 0.0 and 4.67 log UFC/g, *Escherichia coli* between 0.0 and 3.63 log UFC/g and presence of *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** sausage, certification, microbiological safety, nutritional characteristics, physicochemical characteristics.

## ÍNDICE

RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJECTIVOS.....	11
3. DEFINIÇÃO DE ENCHIDOS.....	12
4. PROCESSO DE FABRICO DE ENCHIDOS.....	12
4.1.Selecção da matéria-prima:escolha.....	13
4.2.Miga.....	14
4.3.Preparação da massa e condimentação.....	14
4.4.Cura.....	15
4.4.1. Agentes de cura.....	15
4.5.Maturação.....	16
4.6.Enchimento.....	18
4.7.Atadura e picado.....	18
4.8.Tratamentos para produtos curados crus e cozidos.....	18
4.8.1. Fumagem.....	19
4.8.2. Secagem.....	21
4.9.Embalagem.....	22
5. IMPORTÂNCIA DA CERTIFICAÇÃO (DOP's).....	22
5.1.Certificação de produtos.....	24
5.2.Vantagens de um produto ser certificado como DOP, IGP e ETG.....	24
6. SEGURANÇA ALIMENTAR E PERIGOS MICROBIOLÓGICOS.....	25
6.1.Perigos microbiológicos.....	25
6.1.1. <i>Microrganismos Aeróbios Totais a 30°C e Microrganismos Aeróbios Psicrófilos</i> .....	25
6.1.2. <i>Bolores e Leveduras</i> .....	26

6.1.3.	<i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	27
6.1.4.	<i>Salmonella</i> .....	28
6.1.5.	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	29
6.1.6.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
6.1.7.	<i>Clostridium botulinum</i> .....	30
6.1.8.	<i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	31
6.1.9.	<i>Trichinella spiralis</i> .....	31
6.2.	Perigos Químicos.....	34
6.3.	Perigos Físicos.....	34
7.	CARNE.....	35
7.1.	Composição química e estrutura da carne de porco e da gordura.....	35
7.1.1.	Água.....	36
7.1.2.	Proteínas.....	37
7.1.3.	Lípidos.....	39
7.1.4.	Hidratos de Carbono.....	41
7.1.5.	Cinzas.....	41
7.2.	Factores que afectam a qualidade.....	42
7.2.1.	Actividade da água ( $a_w$ ).....	42
7.2.2.	Acidez.....	43
8.	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
8.1.	Material.....	45
8.1.1.	Amostras de enchidos.....	45
8.2.	Avaliação microbiológica dos enchidos.....	46
8.2.1.	Contagem de microrganismos mesófilos totais (NP-3788:2002)..	46
8.2.2.	Contagem de microrganismos psicrófilos.....	47
8.2.3.	Contagem de bolores e leveduras.....	48
8.2.4.	Contagem de clostrídios sulfito-redutores (ISSO 15213:2003)...	49
8.2.5.	Contagem de coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i> (Método Oficial AOAC).....	50
8.2.6.	<i>Salmonella</i> (Método Oficial AOAC 989.13).....	51
8.2.7.	<i>Staphylococcus aureus</i> (NP 4400-1:2002).....	52
8.3.	Caracterização dos enchidos.....	54
8.3.1.	Análise físico-química/nutricional.....	54
8.3.1.1.	Humidade.....	54

8.3.1.2.Cinzas Totais.....	54
8.3.1.3.pH.....	54
8.3.1.4.Actividade da água.....	55
8.3.1.5.Lípidos.....	55
<b>9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
9.1.Análise microbiológica do enchido.....	56
9.2.Análise físico-química e nutricional dos enchidos.....	62
<b>10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>
<b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	pág. 45
Figura 2.....	pág. 47
Figura 3.....	pág. 48
Figura 4.....	pág. 49
Figura 5.....	pág. 50
Figura 6.....	pág. 51
Figura 7.....	pág. 52
Figura 8.....	pág. 52
Figura 9.....	pág. 53
Figura 10.....	pág. 55
Figura 11.....	pág. 55

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.....	pág. 32
Tabela 2.....	pág. 44
Tabela 3.....	pág. 57
Tabela 4.....	pág. 60
Tabela 5.....	pág. 63
Tabela 6.....	pág. 66

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos de salsicharia tradicional portuguesa são, pelas suas características organolépticas, produtos alimentares da mais alta qualidade, constituindo um património cultural que interessa preservar (Martins, 1984). O termo “salsicharia” é mundialmente conhecido e engloba todos os produtos de transformação cárnea. Destes fazem parte não só os enchidos mas também todas as carnes curadas como os presuntos, as pás e muitos outros. Em Portugal para o fabrico destes produtos é utilizada, predominantemente, a carne de porco.

Os 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 (Regulamento (CE) n.º 853/2004). Estes apresentam uma grande variedade comercial, de sabores, texturas e formas, como resultado da diversidade das matérias-primas, dos ingredientes e dos processos de fabrico utilizados. A elaboração de enchidos constitui uma forma de conservação da carne (Almeida, 2009). O termo carne curada é aplicado numa vasta gama de produtos cárneos, apesar do seu significado depender com o tipo de produto e o país de origem. Tradicionalmente, um produto cárneo curado implicava a utilização de um sal (cloreto de sódio, nitrato ou nitrito) que produzia colorações e sabores característicos no produto (Almeida, 2009).

Os enchidos tradicionais portugueses são produtos únicos que têm normalmente origem em zonas geográficas que estão, em regra, associadas à respectiva designação comercial, e que têm uma forte ligação ao desenvolvimento dessa região. De facto, a qualidade do produto é influenciada pela raça do animal, pela natureza dos solos, vegetação, clima e pela tecnologia de fabrico (Almeida, 2009). São sobejamente conhecidos os enchidos tradicionais, no entanto, tem-se verificado uma quebra na produção destes produtos. As razões são conhecidas, salientando-se em primeiro lugar a emigração rural das últimas décadas, que levou ao abandono dos locais de origem da maior parte da população activa, na sua quase totalidade agrária, aquela que constituía o suporte fundamental da produção destes produtos. Em segundo lugar, a desmotivação da reduzida população jovem residente para trabalhos desta índole, inclusive, com alterações dos hábitos alimentares. O desenvolvimento tecnológico também contribuiu para esta quebra, na

medida em que, até décadas recentes, os processos de cura tradicionais de produtos cárneos constituía a única forma de os conservar ao longo do ano, enquanto que com a introdução do frio na conservação a situação foi significativamente alterada. No entanto, esta situação é mais aparente que real, pois a tecnologia dos produtos tradicionais introduz-lhe características organolépticas peculiares pelo que continuam a ser consumidos, paralelamente ao consumo de carne fresca. Por outro lado, o facto das entidades oficiais respectivas só recentemente terem despertado para a importância destes produtos no desenvolvimento regional, daí ter sido insignificante o seu apoio na protecção deste valioso património cultural, que, uma vez perdido, se tornará quase impossível refazer (Fernandes, 1985).

Actualmente volta a verificar-se uma maior procura dos produtos tradicionais, existindo, todavia, uma situação de incapacidade para satisfazer essa procura, tanto quantitativa como qualitativamente (Fernandes, 1985).

A produção de enchidos tradicionais, quer de forma artesanal quer a nível mais industrializado, deverá ser enquadrada segundo as exigências actuais de higiene/salubridade, numa dupla perspectiva: de protecção do consumidor e de valorização económica dos recursos locais. Os consumidores têm tendência para valorizar especialmente as características psico-sensoriais (organolépticas) e nutricionais dos produtos tradicionais, embora também tenham vindo a dar cada vez mais importância à segurança dos alimentos (Almeida, 2009).

A qualidade do produto pode estar em causa sempre que se desenvolvem microrganismos que comprometam o sabor, o cheiro, a consistência e o aspecto destes produtos, ou seja, microrganismos envolvidos em processos glicolíticos, proteolíticos e lipolíticos (Almeida, 2009). A microbiota dos enchidos tem, por isso, manifesta influência na decomposição, afectando assim negativamente a qualidade deste tipo de produtos, pelo que a sua caracterização se reveste de grande importância.

Neste contexto surgiram estratégias de valorização comercial dos produtos tradicionais, através da certificação e consequente atribuição das marcas: Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG) (Almeida, 2009).

O processo de certificação é um recurso importante para a protecção destes produtos, uma vez que, para além de se procurar assegurar as condições de higiene com que estes são produzidos, também são respeitados os métodos de fabrico tradicionais, garantindo, assim, a autenticidade e a origem dos mesmos (Cruz *et al.*, 2007).

## **2. OBJECTIVOS**

Este trabalho teve como objectivo global a avaliação das características físico-químicas e segurança microbiológica de enchidos de várias regiões de Portugal adquiridos em estabelecimentos comerciais.

Desenvolveu-se de acordo com os seguintes objectivos específicos: avaliação da qualidade nutricional, avaliação da qualidade microbiológica, isolamento e identificação dos microrganismos presentes nos enchidos (com particular relevância aos bolores e leveduras).

### 3. DEFINIÇÃO DE ENCHIDOS

Apesar da enorme variedade de enchidos produzidos em Portugal, no âmbito deste trabalho iremos analisar linguiças, chouriços e salpicões (IGP ou DOP), produtos que passaremos a definir.

**Linguiça** – é um enchido em forma de salsicha, feito de carne de porco, temperada com cebola, alho e outras especiarias. Pode ser consumida fresca após preparação ou sofrer processo de cura e conservação por meio de defumação. Tem um sabor similar ao chouriço, entretanto, o seu tempero normalmente é muito mais leve que o tempero do chouriço (Price *et al.*, 1994).

**Chouriço** – pode ser de vários tipos: carne, sangue, mel, etc. A chouriça de carne é feita à base de carne e gorduras de porco picadas e misturadas com pimentão, alho, sal e outras especiarias, condimentos e aditivos autorizados. Pode ser tradicional (feita exclusivamente com tripas naturais), com tripas artificiais, em que sofreu um processo de maturação/secagem, com ou sem fumo, corrente (feita com couratos cozidos ou salmorados) ou extra (feita com carnes seleccionadas mais magras). Apresenta uma consistência firme, uma cor avermelhada e brilho (Anderson, 2000).

**Salpicão** – pode ser feito segundo diversas variantes, tanto no modo de preparação como no tempero aplicado à carne de porco. O invólucro é de tripa de porco e o preparado é feito com lombo de porco, ou outras peças magras, e gordura rija. São usadas grandes peças de carne do lombo, temperadas com colorau, alho, louro e vinho. A carne fica durante algum tempo em “vinha de alhos”. O tempo do fumeiro varia consoante a região (Price *et al.*, 1994).

### 4. PROCESSO DE FABRICO DE ENCHIDOS

Nas últimas décadas o processo de fabrico de enchidos passou a ser maioritariamente industrial, apesar de se basear nos processos de elaboração tradicionais. As variações introduzidas no processo de fabrico tradicional relacionam-se principalmente com a mecanização dos processos e a utilização de câmaras de secagem e/ou fumagem com controlo de temperatura e humidade relativa, conseguindo-se deste modo uma produção contínua ao longo do ano, em qualquer zona geográfica, independente das condições climatéricas (Almeida, 2009).

O processo de produção de enchidos compreende as seguintes etapas: escolha, miga, preparação da massa e condimentação, maturação, enchimento, atadura e picado e tratamento térmico (Incze, 1998).

Apesar da enorme variedade de enchidos tradicionais portugueses, a sua produção baseia-se em dois pilares fundamentais (Kramlich, 1976):

**Estabilização da Matéria-Prima** – nesta fase pretende-se que o produto precedente se transforme num produto estável à temperatura ambiente, sem que se verifique o desenvolvimento de microrganismos que o tornem impróprio para consumo. Isto é conseguido nas chamadas etapas frias e que correspondem às primeiras etapas de elaboração dos enchidos: escolha, miga, preparação da massa e condimentação.

**Desenvolvimento das características sensoriais** – através de reacções químicas e enzimáticas, os lípidos e proteínas dão origem a compostos sápidos e aromáticos que conferem as qualidades organolépticas características dos enchidos. Estas reacções ocorrem na segunda fase de produção que corresponde à maturação ou cura.

A tecnologia de produção de enchidos varia segundo o país produtor. A descrição que se segue é relativa ao fabrico de enchidos tradicionais portugueses.

#### **4.1. Selecção da matéria-prima: escolha**

A escolha consiste na selecção das carnes e das gorduras mais adequada a cada tipo de enchidos (Sousa e Ribeiro, 1997). Esta etapa é importante, pois removem-se da carne as partes que não são apropriadas para utilizar em salsicharia, por afectarem a qualidade dos produtos finais (Almeida, 2009).

A relação músculo/gordura da carne é muito importante, pois a quantidade de gordura afecta a qualidade dos produtos curados, conferindo-lhes tenrura, suculência e sabor. Para além disso, também mantém a humidade da fibra muscular, facilitando a actuação dos microrganismos que levam a cabo as fermentações que ocorrem durante a cura (Almeida, 2009).

O critério de escolha das carnes para o fabrico de enchidos deve permitir a obtenção de uma massa de composição equilibrada entre as fracções muscular e lipídica, de forma a cumprir o estipulado pela legislação portuguesa. Um baixo teor em gordura reflecte-se,

por exemplo, na qualidade da maior parte dos chouriços, que se tornam secos e quebradiços, prejudicando a sua aparência, textura e flavour (Sousa e Ribeiro, 1997). Quando se utilizam peças muito ricas em gordura, pode-se obter um produto final com uma percentagem de matéria gorda que, para além de ultrapassar os limites aceitáveis, tem inconvenientes tecnológicos, nomeadamente baixo poder de retenção da água, difícil ligação da massa e mau aspecto (Almeida, 2009).

#### **4.2. Miga**

Esta operação tem por finalidade reduzir a carne a pequenos fragmentos, cujas dimensões variam em função do tipo de produto (Sousa e Ribeiro, 1997).

O corte das carnes era originalmente realizado à mão, mas actualmente existem equipamentos que realizam esta operação. A utilização deste tipo de equipamentos reduz a manipulação do produto que, aliado à utilização de carnes refrigeradas ou congeladas, tem uma acção positiva na redução da contaminação microbiológica (Patarata *et al*, 1998).

#### **4.3. Preparação da massa e condimentação**

Depois de migada, a carne é colocada em recipientes apropriados, adicionando-se outros ingredientes essenciais ou facultativos em função da natureza do enchido: água, vinho ou vinagre, arroz, pão, farinha, sangue, salsa, pimentão, alho, cominhos, cravinho, canela, colorau, sal, louro e erva-doce. Estas substâncias são de extrema importância, uma vez que conferem características organolépticas desejáveis e apreciáveis, contribuindo para a tipicidade dos produtos. Tem sido demonstrado um papel importante destes condimentos na inibição da actividade dos microrganismos de degradação e patogénicos. Por outro lado, parece que favorecem o crescimento de bactérias lácticas promovendo a fermentação láctica. Esta operação exige muita experiência, dado que, por um lado, é necessário que ocorra a mistura completa de todos os condimentos e, por outro, esta movimentação não pode ser excessiva, para não introduzir muito O<sub>2</sub> na massa, que vai facilitar as oxidações e dificultar a multiplicação das bactérias lácticas (Almeida, 2009).

Para obter enchidos de qualidade, a mistura da massa com os condimentos deve ser efectuada de uma forma cuidada, evitando que este fique demasiado gordo ou demasiado magro (Almeida, 2009).

## **4.4. Cura**

A cura é a fase mais importante da preparação dos enchidos. No decorrer desta fase, ocorrem transformações físico-químicas que modificam a carne, conferindo-lhe características próprias e aumentando o período de conservação do produto. Consiste na introdução e distribuição das substâncias com acção de cura. Existem três procedimentos diferentes: cura seca, cura húmida ou salmoura e injeção de salmoura no enchido (Sousa e Ribeiro, 1997).

Em Portugal, a cura está quase sempre associada à fumagem, o que dá continuidade aos processos físicos, químicos e microbiológicos que tiveram início na fase de maturação, resultando num produto com características organolépticas e de conservação completamente diferentes das da matéria-prima que lhe deu origem (Elias *et al.*, 2006).

### **4.4.1. Agentes de cura**

Incluem-se neste grupo os nitritos e nitratos usados no fabrico de enchidos e produtos cárneos fumados. Surgindo originalmente como contaminantes do sal, podem, no entanto, ser adicionados intencionalmente (ASAE, 2009). Nas concentrações que são empregues, os sais de cura têm um efeito conservante (Urbain, 1976).

A maior parte dos produtos cárneos curados são decompostos pelo desenvolvimento de bactérias Gram positivas, leveduras e bolores. A adição de sais de cura cria um meio bacteriologicamente selectivo, no qual apenas um grupo restrito de microrganismos é capaz de se multiplicar. Quando aplicados em associação, estes agentes têm maior eficácia conservante do que quando usados individualmente (Urbain, 1976).

Os nitratos são utilizados como aditivos com o intuito de conferir e manter a cor vermelha da carne, originada por uma reacção química entre o pigmento da carne, a mioglobina, e o ião nitrato, através da acção de certos microrganismos, impedir o desenvolvimento da bactéria *Clostridium botulinum* que produz a toxina responsável pelo botulismo, e estabilizar o aroma das carnes armazenadas, dado que previnem a oxidação com formação de produtos indesejáveis (ASAE, 2009). Estes agentes controlam o crescimento de bactérias em produtos embalados a vácuo, como é o caso de muitos enchidos e produtos cárneos portugueses. Os nitritos também inibem reacções de oxidação dos ácidos gordos em carnes, reduzindo o desenvolvimento do ranço. A utilização destes compostos apresenta dois tipos de riscos para o consumidor: a

toxicidade do nitrito que, ao ligar-se à hemoglobina do sangue, de uma forma semelhante à que faz com a mioglobina da carne, forma metahemoglobina, a qual é incapaz de transportar oxigénio, e a formação de nitrosaminas, que são agentes cancerígenos e podem formar-se por influência das condições ambientais do estômago, ou a partir de produtos que sofram um aquecimento muito forte (bacon) ou ricos em aminas nitrosáveis (peixe e produtos fermentados). A utilização destes aditivos é, deste modo, um dos exemplos mais claros de uma decisão tomada, na qual são pesados os riscos e benefícios da sua acção, sendo permitidos por quase todas as regulamentações, embora com medidas complementares, como restrições na dosagem e uso conjunto de inibidores da formação de nitrosaminas. O fabrico de produtos cárneos com nitrito de sódio ou nitrito de potássio deve ser cuidadosamente controlado (Freitas e Figueiredo, 2000).

#### **4.5. Maturação**

Após o período de cura, segue-se a maturação (Prandl *et al.*, 1994). A fase de maturação é caracterizada essencialmente pela entrada e difusão do sal nos fragmentos de carne e solubilização e extracção das proteínas miofibrilares e pelo desenvolvimento da população microbiana com a libertação de produtos do seu metabolismo. As proteínas miofibrilares, quando extraídas, tornam viscosas as superfícies dos fragmentos da carne e desempenham um papel fundamental na ligação das massas (Elias *et al.*, 2006). Nesta fase, intensifica-se o aroma da cura e outras características organolépticas e estabiliza-se a cor do curado dos produtos. A pasta dos enchidos, depois de amassada, é deixada em repouso. Por razões de economia e para impedir a proliferação de microrganismos patogénicos, a duração desta fase deve ser devidamente controlada (Sousa e Ribeiro, 1997).

Durante a maturação, o produto sofre fermentação conduzida por bactérias lácticas, a qual confere ao produto um sabor mais ácido. A fermentação pode ocorrer naturalmente ou, nalguns casos, ser dirigida através da adição de culturas de arranque (Vasilopoulos *et al.*, 2008). A fermentação é o processo em que a massa de salsicha crua e microbiologicamente instável se transforma num produto estável, com elevadas qualidades organolépticas e inócuo do ponto de vista microbiológico (Feiner, 2006). Consiste, essencialmente, no aumento da temperatura dos enchidos após o enchimento, de forma a promover o desenvolvimento da microflora láctica, naturalmente presente na

carne (Fraqueza & Patarata, 2006). A maturação é um fenómeno complexo, no qual o sal, a água e os microrganismos desempenham um papel relevante. O sal penetra nos fragmentos da carne e, extrai a água e as proteínas das fibras musculares. Para além disso, contribui para inibir o crescimento das bactérias que exigem uma  $a_w$  elevada, como é o caso da maioria das espécies patogénicas. É também, em parte, responsável pela acidificação da carne (Almeida, 2009).

A massa, depois de maturada, adquire características organolépticas, físicas e químicas diferentes e “sui generis”. Esta transformação resulta das operações físicas e dos condimentos, mas sofrendo a presença e acção de microrganismos específicos que provocam a maturação. Estes, para proliferarem, ao contrário dos microrganismos patogénicos, necessitam de um meio ácido, uma humidade entre 70 e 80% e uma temperatura inferior a 10°C. Se a temperatura for superior a 15°C durante 10 horas, as condições tornam-se propícias à proliferação de microrganismos patogénicos, nomeadamente o *Staphylococcus aureus*. A diminuição de pH dificulta o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Poderá ainda afectar a actividade da água ao originar uma maior ‘retenção’ de água pelas proteínas, resultando numa menor quantidade de água disponível e livre para os processos metabólicos. No entanto, estas condições são próprias à multiplicação de alguns fungos. O sal adicionado à carne nesta fase aumenta a pressão osmótica e pode interferir com o processo de fermentação. A adição de quantidades muito elevadas ou muito baixas poderá favorecer o crescimento de bactérias lácticas indesejáveis, tendo como consequência a obtenção de um produto sem as características pretendidas (Prandl *et al.*, 1994).

As bactérias pertencentes à família *Lactobacillaceae* contribuem para acidificar o meio, fermentando os hidratos de carbono da carne, contrariando deste modo o desenvolvimento dos microrganismos nocivos e melhorando as qualidades ligantes das proteínas musculares pelo sal (Sousa e Ribeiro, 1997).

Durante o repouso da massa, o desenvolvimento dos microrganismos específicos da maturação deve ser favorecido, enquanto que a proliferação dos patogénicos deve ser inibida, caso contrário, o produto pode sofrer alterações. De facto, durante esta fase, é importante controlar a temperatura, a humidade, a limpeza do local, dos utensílios de fabrico e a higiene dos produtores.

Estes fenómenos associados às fermentações conduzidas por microrganismos provocam a ligação e maturação das massas (Almeida, 2009).

A maturação da carne continua após o enchimento e fumagem ou dessecação do produto (Almeida, 2009).

#### **4.6. Enchimento**

Esta operação consiste na introdução da pasta no invólucro que lhe é destinado. A tripa utilizada, que pode ser de origem animal, de colagénio ou celulose, dependendo das características do enchido e das condições tecnológicas, deve estar em boas condições higiénicas e íntegra, de modo a suportar as pressões necessárias à obtenção de um enchimento compacto. O enchimento realiza-se para que a pasta entre sob pressão de modo a preencher a tripa e, ao mesmo tempo, conseguir a dilatação máxima compatível com a sua elasticidade. Caso contrário ficam espaços cheios de ar que prejudicam a qualidade dos produtos favorecendo a rancificação e a decomposição (Almeida, 2009).

#### **4.7. Atadura e picado**

Terminado o enchimento, a peça é comprimida e ajustada à mão pelo lado externo obtendo-se uma distribuição uniforme. A forma de atar varia conforme as tradições locais e o produto fabricado. Após a atadura, os enchidos tradicionais são picados em toda a extensão com agulha para facilitar a saída de ar e água indesejáveis (Almeida, 2009).

#### **4.8. Tratamentos para produtos curados crus e cozidos**

A função desta etapa é provocar a desidratação e a intensificação dos fenómenos bioquímicos de lipólise e proteólise. As temperaturas aplicadas nesta etapa são consideravelmente superiores às anteriores. Os fenómenos proteolíticos e lipolíticos que ocorrem nesta etapa são muito importantes e vão influenciar de forma directa a textura, o aroma e o sabor dos enchidos. Pode efectuar-se por três processos: escaldão, fumagem e atmosfera ambiente (Prandl *et al.*, 1994).

#### 4.8.1. Fumagem

A fumagem é uma das técnicas mais antigas utilizadas na conservação dos enchidos e outros produtos cárneos. A fumagem é um procedimento tecnológico em que os produtos são submetidos à acção de compostos químicos obtidos pela combustão lenta das madeiras não resinosas e bem secas. Alguns desses compostos têm propriedades conservantes e conferem características sensoriais aos enchidos (Fraqueza & Patarata, 2006). Para isso, os enchidos são colocados em câmaras, estufas, fumeiros ou à lareira, ficando completamente sujeitos ao fumo. No início, a fumagem tem por objectivo a penetração do fumo no enchido, facilitada pela grande humidade de que este dispõe. Progressivamente, com o aquecimento melhoram-se as condições de desenvolvimento microbiano. A acidificação torna-se mais intensa devido à acção de bactérias ácido-lácticas. Simultaneamente, vai-se desidratando o enchido (redução de  $a_w$ ).

Adicionalmente, os compostos fenólicos do fumo exercem uma acção antioxidante que tem como consequência retardar a degradação oxidativa dos lípidos e uma acção bacteriostática, que permite estabilizar a carga microbiana do produto fumado. Estas acções reflectem-se nas qualidades higiénica, organoléptica e nutricionais dos produtos finais (Prandl *et al.*, 1994).

A acção conservadora do fumo é exercida pelo efeito combinado do aquecimento, da secagem e dos compostos químicos com acção antimicrobiana, como os aldeídos, os fenóis e os ácidos (Prandl *et al.*, 1994).

A fumagem tem implicações nutricionais e melhora a qualidade sensorial, a segurança e a vida útil do produto cárneo fermentado e seco, dependendo esta transformação de muitos factores, como a humidade relativa, a velocidade e a temperatura do ar, bem como do tipo, densidade, composição e tempo de actuação do fumo (Andrés *et al.*, 2007).

A cor dos produtos fumados resulta da sedimentação de substâncias corantes, principalmente compostos voláteis do grupo dos fenóis, os quais sofrem polimerização ou oxidação. No entanto, a principal causa da coloração escura durante a fumagem reside nas reacções de escurecimento não enzimático ou reacção de Maillard (Sousa e Ribeiro, 1997).

O sabor característico que os produtos fumados apresentam, deve-se à reacção que ocorre entre uma mistura de vários componentes do fumo e a matéria-prima. As proteínas reagem primeiro com os compostos com grupos carbonilo, seguindo-se os fenóis e os ácidos carboxílicos, sendo essencialmente estes os responsáveis pelo aroma a fumo (Sousa e Ribeiro, 1997).

A acção do fumo na textura resulta na modificação por desnaturação ou coagulação das fibras musculares da carne ou da tripa (Sousa e Ribeiro, 1997).

Resumindo, a fumagem determina a cor apetecível, a dessecação, a esterilização, a sapidez, a suavidade e o brilho dos enchidos (Almeida, 2009).

Na escolha do equipamento utilizado nesta fase, é muito importante verificar a sua aptidão. A qualidade dos produtos tradicionais está dependente de uma boa escolha do equipamento, pois pode ser um dos factores mais importantes no fabrico destes produtos. O equipamento deve permitir o controlo muito rigoroso dos parâmetros temperatura e humidade relativa (Almeida, 2009).

A lenha utilizada na fumagem deve produzir pouca chama e muito fumo, que deve ser limpo, claro, seco, desprovido de partículas carbonosas e não transmitir sabor desagradável aos enchidos (Almeida, 2009).

O fumo actua sobre os enchidos através da sua composição (acção antiséptica) e da sua temperatura (por desidratação). É bem conhecido o intenso poder fungistático dos componentes do fumo. A duração e a temperatura da fumagem varia com o tipo de enchido existindo uma relação entre a natureza e a dimensão do enchido e a intensidade do fumo (Fraqueza, 2003).

No caso dos enchidos, como o chouriço tradicional português, a fumagem deve realizar-se a frio (temperatura inferiores a 25°C), prolongando-se assim a fase de maturação.

Distinguem-se dois processos de fumagem consoante a temperatura atingida pelo fumo: a fumagem a frio e a fumagem a quente. Na fumagem a frio, a temperatura do fumo ao nível dos produtos não ultrapassa 30 ou 40°C, excepto no primeiro dia, em que muitas vezes, pode chegar aos 50 e 60°C. Na fumagem a quente, a temperatura do fumo eleva-se a 70-90°C (Almeida, 2009).

#### 4.8.2. Secagem

A secagem dos alimentos é um dos métodos mais antigos de conservação, onde a água é evaporada pela exposição do alimento ao calor (luz solar, microondas, etc) e ao ar.

Após a fumagem, os enchidos continuam a sofrer secagem, e para isso são colocados em câmaras preparadas para o efeito. As transformações iniciadas na fumagem, nomeadamente a desidratação e a acidificação, devem continuar a diminuir a actividade da água para valores que permitem a conservação e segurança sanitária dos produtos. Ocorrem também um conjunto de fenómenos bioquímicos que determinam as características organolépticas (sápidas e aromáticas), que são características da salsicharia tradicional (Prandl *et al.*, 1994).

A intensidade da secagem pode ser variável, influenciando as propriedades físico-químicas e organolépticas do produto e promovendo a sua estabilidade durante o armazenamento (Fraqueza & Patarata, 2006).

Durante a secagem, deve efectuar-se o controlo rigoroso das condições ambientais, de forma a manter o equilíbrio entre a evaporação superficial e a dessecação interna. A temperatura óptima de secagem deve variar entre os 12 e os 18°C. Temperaturas mais elevadas favorecem o desenvolvimento de microrganismos prejudiciais, o crescimento excessivo de fungos e aceleram a dessecação; temperaturas mais baixas diminuem a multiplicação dos microrganismos favoráveis. A duração pode variar entre 10 a 120 dias, dependendo do tipo de produto, diâmetro e tamanho. Este deverá conter no final 30-40% de humidade. Outro factor que também afecta a secagem é a ventilação, que não deve ser muito fraca, nem muito forte (Almeida, 2009). A redução da  $a_w$  durante a secagem afecta a evolução da maturação por redução da actividade enzimática (Varman & Sutherland, 1998). Uma  $a_w$  inferior a 0,91 é sinal de estabilidade do produto e um parâmetro chave para a conservação do mesmo (Fraqueza & Patarata, 2006).

O tempo de secagem depende de uma série de variáveis, como as relacionadas com o ar (temperatura, velocidade, humidade e características do fluxo) e com o produto (humidade, tamanho das partículas de carne, invólucro e estrutura) (Andrés *et al.*, 2007).

Após esta fase, os enchidos são considerados produtos finais prontos a serem consumidos. Convém, no entanto, salientar que, posteriormente continuam a decorrer transformações bioquímicas, mas menos intensas.

#### **4.9. Embalagem**

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

As embalagens devem cumprir vários objectivos. Por um lado, devem conferir protecção ao produto, servir de suporte a todas as informações legais e de orientação para o consumidor, por outro serem neutras e não reagirem com o produto, permitirem um manuseamento adequado durante a distribuição, facilitarem a automatização, serem de fácil abertura e nalguns casos também fáceis de voltar a fechar, serem apelativas, serem capazes de quando necessário resistirem ao processamento térmico, terem um custo adequado às necessidades e serem facilmente recicláveis (Ahn & Min, 2007).

#### **5. IMPORTÂNCIA DA CERTIFICAÇÃO (DOP's)**

De um modo geral pode dizer-se que uma DOP (Denominação de Origem Protegida) ou uma IGP (Indicação Geográfica Protegida) é o nome de uma região ou de um local determinado que serve para designar um produto originário dessa região ou desse local, e cuja qualidade ou características se devem ao meio geográfico (DOP) ou cuja reputação ou determinada qualidade podem ser atribuídas a essa origem geográfica (IGP). A Especialidade Tradicional Garantida (ETG) é dada a um produto agrícola ou género alimentício produzido a partir das matérias-primas tradicionais, ou com uma composição tradicional ou um modo de produção e/ou de transformação tradicional e que reflecta o tipo de produção e/ou transformação tradicional conforme regulamentarmente previsto, através da obtenção de um Certificado de Especificidade (CE) (Cruz *et al.*, 2007).

Por outras palavras, para que um produto possa beneficiar de uma DOP, tem que se demonstrar que ele tem origem no local que lhe dá o nome e que tem uma forte ligação com essa mesma região, de tal forma que é possível provar que a qualidade do produto é influenciada pelos solos, pelo clima, pelas raças animais ou pelas variedades vegetais e pelo saber fazer das pessoas dessa área. Para que se possa beneficiar de uma IGP, tem que se demonstrar que pelo menos uma parte do seu ciclo produtivo tem origem no

local que lhe dá o nome e que tem uma reputação associada a essa mesma região, de tal forma que é possível ligar algumas das características do produto aos solos, ao clima, às raças animais, às variedades vegetais ou ao saber fazer das pessoas dessa área (Cruz *et al.*, 2007).

As siglas DOP, IGP e ETG são hoje muito utilizadas na rotulagem de vários produtos alimentares. Isto porque há produtos que por se distinguirem dos produtos correntes, começaram a ser designados pelos nomes das suas terras, regiões ou locais onde são produzidos. Mas, quando um produto adquire uma reputação que ultrapassa fronteiras, é possível que tenha de se defrontar no mercado com produtos copiados, ou seja, que utilizam os seus nomes: a sua Denominação de Origem (DOP), a sua Identificação Geográfica (IGP) e a sua Especialidade Tradicional (ETG). Para terminar com esta prática abusiva, a Comunidade Europeia criou em 1992 sistemas de protecção e de valorização dos produtos alimentares (Soeiro, 2006).

A União Europeia concede, através dos regulamentos (CE) nº 510/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006, relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios e do regulamento (CE) nº 509/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006, relativo às especialidades tradicionais garantidas dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios, uma protecção especial aos produtores de “especialidades regionais”. O regime possibilita aos produtores registarem-se num sistema comunitário de protecção obrigatória de determinados produtos agrícolas e géneros alimentícios com denominação.

As associações de produtores de produtos ditos tradicionais candidatos a serem reconhecidos como DOP, IGP ou ETG, devem recorrer a organismos privados e independentes de certificação com competências técnicas e materiais, protocolos e planos de controlo aprovados para proceder ao controlo das fileiras produtivas dos produtos candidatos. Estes devem ser devidamente acreditados pelo Organismo Nacional de Acreditação para que os certificados emitidos pela entidade certificadora sejam credíveis (Cruz *et al.*, 2007). Para isso, tem de obedecer a determinados requisitos e à legislação em vigor, nomeadamente da NP 45011 de 1990, relativa aos critérios gerais para o Organismo de Certificação de Produtos.

Os Organismos Privados de Controlo e Certificação devem garantir que os produtos agrícolas e géneros alimentícios que comportem uma denominação protegida,

satisfaçam as condições formuladas nos cadernos de especificações (já que os requisitos legais “normais” dos produtos devem ser objecto de acções de fiscalização pelos serviços públicos competentes). A certificação passa, sem dúvida, por uma opção estratégica de desenvolvimento das organizações, no sentido de quererem evoluir, melhorar e ganhar mercados (Cruz *et al.*, 2007).

### **5.1. Certificação de produtos**

A certificação de produtos é o procedimento pelo qual uma terceira parte (independente) afirma que é razoavelmente fundamentado esperar que um determinado produto, devidamente identificado, esteja em conformidade com o seu Caderno de Especificações ou com uma regulamentação particular relativa à sua produção, transformação, acondicionamento, rotulagem e apresentação comercial (Ministério da Agricultura, 2005). Esta certificação é efectuada de acordo com as metodologias definidas pelo sistema nº5 da ISO/IEC (International Standard Organization), que pressupõe a realização de uma auditoria e ensaios a uma amostra de produto a certificar, após os quais dá direito ao uso da Marca Produto Certificado. Segue-se um acompanhamento anual (auditoria e ensaio) aos produtos certificados para verificar se o fabricante mantém as condições iniciais de certificação (Amorim, 2006).

### **5.2. Vantagens de um produto ser certificado como DOP, IGP e ETG**

De acordo com o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Pescas (2007), as vantagens de um produto ser certificado são:

- Incentivar a produção agrícola diversificada;
- Proteger os nomes dos produtos contra imitações e utilizações indevidas;
- Promover os produtos característicos de determinados locais;
- Melhorar o rendimento dos agricultores;
- Fixar a população rural;
- Ajudar os consumidores, fornecendo-lhes informações relativas às características específicas dos produtos.

## 6. SEGURANÇA ALIMENTAR E PERIGOS MICROBIOLÓGICOS

### 6.1. Perigos microbiológicos

De acordo com Forsythe (2002), as fontes comuns de perigos microbiológicos são:

- *As matérias-primas.* A flora microbiana das matérias-primas entrando numa fábrica de alimentos pode ser controlada pelo uso de fornecedores confiáveis, certificados de qualidade e monitorização de temperatura no recebimento. Os ingredientes podem ser rejeitados se não estiverem em conformidade com os padrões estipulados.

- *Pessoal.* Estima-se que aproximadamente 1 em 50 empregados abriga  $10^9$  patógenos por grama de fezes sem demonstrar qualquer sintoma clínico. Consequentemente, higiene pessoal precária como não lavar as mãos pode deixar  $10^7$  patógenos sob as unhas. O movimento de pessoal numa fábrica precisa de ser controlado. Deverá haver áreas de baixo risco separadas das de alto risco. Essencialmente, a área de baixo risco é aquela onde os ingredientes são contados, pesados, misturados e cozidos. Após o cozimento, o alimento entra nas áreas de alto risco. Um cuidado maior é necessário se não houver nenhum tratamento térmico posterior para destruir quaisquer bactérias provenientes de contaminação ambiental ou pessoal ou para prevenir o crescimento de organismos sobreviventes.

- *O ambiente.* A qualidade microbiológica da água precisa ser monitorizada frequentemente, uma vez que pode haver repercussões graves no caso de contaminações por patógenos alimentares.

Seguidamente, iremos fazer referência aos principais microrganismos envolvidos em doenças de origem alimentar.

#### 6.1.1. Microrganismos Aeróbios Totais a 30°C e Microrganismos Aeróbios Psicrófilos

A contagem de microrganismos totais a 30°C permite estimar a totalidade dos microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos presentes num alimento, sem contudo especificar a que grupos mais restritos pertencem, nomeadamente as bactérias ácido-lácticas, *Enterobacteriaceae*, psicrotróficos, bolores e leveduras entre outros (Mossel *et al.*, 1995).

Este critério microbiológico tem, então, limitado valor como indicador de agentes potencialmente patogênicos, que podem estar presentes assim como as suas toxinas, em produtos alimentares com baixas contagens de microrganismos totais (Esteves, 2005).

Os psicrófilos caracterizam-se por terem temperaturas máximas de crescimento inferiores a 25°C e crescimento ótimo entre os 10°C e 15°C, apesar da sua grande maioria conseguir desenvolver-se, embora de forma lenta, a temperaturas próximas e abaixo dos 0°C. Neste caso, o seu desenvolvimento fica limitado pela  $a_w$  do produto congelado, sendo exemplo de microrganismos tolerantes a estes condicionalismos alguns bolores (Ambrosini *et al.*, 2000).

Os resultados microbiológicos em produtos alimentares reflectem a sua qualidade sanitária e indicam, para além das condições higiénicas das matérias-primas utilizadas, a forma como os produtos foram manipulados ao longo do seu ciclo produtivo. Excepções feitas aos produtos fermentados, estas contagens não devem ser elevadas já que tal é geralmente reflexo da utilização de matérias-primas muito contaminadas, ou da ocorrência de deficiências na manipulação e processamento do alimento ao longo do seu fabrico e distribuição (Esteves, 2005).

### **6.1.2. Bolores e Leveduras**

Os fungos são microrganismos eucariotas, heterotróficos, caracteristicamente micelares, que se dividem em bolores e leveduras, com interesse não só do ponto de vista da deterioração dos alimentos mas também pelas múltiplas utilizações industriais em que participam como agentes fermentativos (Moss, 2000).

A grande dispersão dos bolores e leveduras no ambiente justifica a sua frequente aparição como contaminantes nos produtos alimentares, visto que estes, em virtude da sua composição, constituem um excelente meio para a fixação e reprodução de grande número de espécies fúngicas, cuja proliferação ocorre com facilidade por serem mais tolerantes a factores extremos que limitam o desenvolvimento bacteriano, como baixos valores de  $a_w$ , pH e temperatura (Ross & Nichols, 2000).

Porém, a capacidade de desenvolvimento dos bolores a baixas temperaturas constitui um problema na conservação dos produtos cárneos quando estes, após o processamento térmico, são contaminados com esporos destes microrganismos que, desenvolvendo-se,

vão alterar o aspecto e as características nutricionais e organolépticas dos produtos, abreviar a sua conservação e eventualmente contaminá-los com micotoxinas. São frequentes os géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. (Guerrero & Chabela, 2000).

Neste tipo de produtos, para além da qualidade das matérias-primas, o controlo do desenvolvimento dos bolores e leveduras passará pelos cuidados a ter com a qualidade do ar nas zonas de alto risco em que o produto permanece após o processamento térmico e antes de ser embalado, na utilização de embalagens adequadas, a vácuo ou com atmosfera modificada, visto que são aeróbios estritos, ou pelo eventual recurso a conservantes (Guerrero & Chabela, 2000).

Na ausência de cuidados após o processamento térmico, desenvolvem-se geralmente leveduras pertencentes aos géneros *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Torulaspora* spp. e *Tricosporon* spp., que por serem microaerófilas crescem em ambientes onde existem quantidades residuais de oxigénio como pode acontecer nas embalagens a vácuo ou em atmosfera modificada, passando nestes casos o seu controlo pela utilização de conservantes (Guerrero & Chabela, 2000).

### **6.1.3. *Escherichia coli* O157:H7**

*E. coli* é um microrganismo que pertence à família das *Enterobacteriaceae* e que existe naturalmente no intestino do Homem e dos animais de sangue quente, mesmo que a sua dificuldade em sobreviver em ambiente extraentérico implique que a sua presença nos alimentos seja quase sempre sinónimo de uma contaminação recente (Anderson & Pascual, 2000). A dose infectante é muito baixa, para além de ser um microrganismo tolerante a condições de acidez extremas, tolerando bem o ambiente ácido do estômago (Doyle *et al.*, 1997). Trata-se ainda de um microrganismo que tolera ácidos orgânicos, sobrevivendo bem em alimentos ácidos (Conner e Kotrola, 1995). Apesar de não se multiplicar, sobrevive bem em condições adversas de baixa  $a_w$  e concentrações elevadas de sal e nitrito de sódio existentes em produtos cárneos fermentados e secos (Clavero e Beuchat, 1996). Na maioria das vezes é inócua, mas algumas estirpes são patogénicas para o Homem e provocam toxinfecções alimentares mediante patologias distintas que frequentemente estão associadas ao consumo de alimentos como a água, vegetais, leite cru, queijos de pasta mole, carne e produtos cárneos (Oteiza *et al.*, 2006). Tem sido

demonstrado que a partir do momento em que o microrganismo entra na cadeia alimentar, pode sobreviver bem em superfícies, especialmente em condições de refrigeração. A avaliação da capacidade de persistência deste microrganismo nos ambientes de laboração é importante para prever e controlar o eventual aparecimento de surtos de doença (Maule, 2000). A presença de *E. coli* nos alimentos fica quase sempre a dever-se a más práticas de fabrico e falta de cuidados de higiene por parte dos manipuladores, mas também pode ser veiculada por matérias-primas de baixo nível higiénico. A sua presença constitui deste modo um excelente indicador relativo à higiene dos alimentos, alertando também para a eventual presença de outros microrganismos entéricos potencialmente mais perigosos como a *Salmonella* spp. e a *Shigella* spp. (Santos *et al.*, 2008).

#### **6.1.4. *Salmonella***

O género *Salmonella* pertence à família das *Enterobacteriaceae* e é formado por bactérias Gram-negativas em forma de bacilo, não esporulantes, aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de se desenvolver a temperaturas compreendidas entre os 7°C e os 49,5°C, constituindo um dos microrganismos patogénicos com maior responsabilidade a nível mundial na ocorrência de toxinfecções alimentares associadas aos mais variados tipos de alimentos (Almeida, 2008).

O seu carácter ubíquo e a sua conhecida resistência a condições ambientais desfavoráveis fazem da *Salmonella* um dos microrganismos patogénicos mais perigosos e difíceis de controlar, o que associado à sua capacidade de crescimento a baixas temperaturas, lhe possibilita prevalecer em ambientes como os das indústrias alimentares. Os produtos à base de carne, leite e ovos quando consumidos após tratamento térmico insuficiente ou recontaminação pós processamento geralmente devida a deficientes cuidados higiénicos dos manipuladores são importantes veículos deste microrganismo (Vieira-Pinto, 2008).

O facto de pequenas quantidades de *Salmonella* poderem provocar doença, torna-se particularmente importante garantir a sua completa ausência nos alimentos prontos a comer, o que é possível através da eleição cuidada das matérias-primas, com um eficiente processamento térmico acima de 63°C e a aplicação criteriosa de normas de fabrico que contemplem especialmente os perigos de recontaminação e o respeito pela

manutenção a temperaturas abaixo de 7°C ou preferencialmente 4°C ao longo de todo o ciclo de produção e distribuição (Cox, 2000).

Devem ser tomadas medidas de controlo do crescimento deste microrganismo através da combinação de processos que incluem a fermentação láctica e a cura. Adicionalmente, deve ser implementado o controlo das condições de higiene durante o fabrico, bem como o controlo da contaminação do produto final pelas matérias-primas (contaminação cruzada) (Forsythe, 2002).

#### **6.1.5. *Listeria monocytogenes***

Esta bactéria foi isolada a partir de vários ambientes, incluindo vegetação em decomposição, terra, ração animal, esgoto e água. É resistente a diversas condições ambientais, é psicotrófica, podendo crescer a 3°C. Já foi encontrada em vários alimentos, tanto crus como processados, onde pode sobreviver e multiplicar-se rapidamente. Entre esses alimentos, incluem-se carne (principalmente avícola) e produtos de carne e salsichas de carne crua fermentada (Forsythe, 2002). A sua grande dispersão no ambiente, dado tratar-se de um microrganismo ubiqüitário, e capacidade de sobrevivência em condições adversas, tornou *L. monocytogenes* numa preocupação na indústria alimentar ocupando hoje nos países industrializados um local de destaque em termos de saúde pública (Salavessa, 2009). São vários os alimentos já incriminados como veículos da infecção por *Listeria*, dependendo a taxa e frequência de contaminação do alimento considerado (Rocourt, 1994). A origem da contaminação dos alimentos é por vezes difícil de determinar dado o carácter ubiqüitário deste microrganismo. O desrespeito pelas boas práticas de higiene, contaminação cruzada, manipulação inadequada e tratamento térmico insuficiente contribuem para a ocorrência de infecções de listeriose em humanos. Refira-se serem os alimentos processados, prontos a comer, mesmo quando incluem no seu processamento um tratamento listericida, o tipo de alimentos mais frequentemente incriminados por casos de listeriose humana. Tal facto é devido de forma generalizada a uma contaminação após o referido processamento (Salavessa, 2009).

### **6.1.6. *Staphylococcus aureus***

Os Estafilococos coagulase positiva são microrganismos geralmente usados como indicadores de contaminação dos alimentos pelo manipulador. É uma bactéria da família das *Micrococaceae*, em forma de cocos, Gram-positiva, que se agrupa de forma irregular em cachos, é desprovida de motilidade e de capacidade de esporular, sensível ao calor e à acção dos desinfectantes mas também extremamente resistente a condições ambientais adversas como baixos valores de  $a_w$  (Reinoso *et al.*, 2008).

Estas bactérias são frequentemente isoladas a partir da pele, cabelo e nasofaringe de humanos (portadores sãos) e animais de sangue quente, sendo algumas capazes de produzir enterotoxinas responsáveis pelo síndrome de enterotoxigose estafilocócica, facto que é particularmente grave quanto estas toxinas são extremamente resistentes ao calor podendo muitas vezes persistir no produto já processado, livre de formas viáveis deste microrganismo (Esteves, 2005).

De facto, algumas estirpes podem não ser detectadas ou a sua presença ser muito baixa nos alimentos, mas tal não invalida que se encontrem presentes ou que existam já quantidades de toxina capazes de surtir efeito, e tratando-se de um microrganismo oportunista em condições de baixa competição microbiana poderá vir facilmente a desenvolver-se, o que é sempre manifesto sinal de falta de higiene ligada a deficiências de manipulação (Harvey & Gilmour, 2000).

### **6.1.7. *Clostridium botulinum***

O grupo bacteriano dos sulfito-redutores é constituído por germes pertencentes ao género *Clostridium*, que têm em comum a capacidade de reduzir o sulfito a sulfureto; são frequentemente utilizados na avaliação da qualidade higiénica da água e dos produtos de origem animal apesar da sua presença em produtos frescos ser diminuta e da sua detecção ser muitas vezes dificultada pelo facto de muitas das espécies mais relevantes esporularem de forma escassa (Anderson & Pascual, 2000).

Trata-se de microrganismos ubíquos, frequentes no solo, sedimentos marinhos, plantas, intestino e nas feridas infectadas do Homem e de outros animais; são anaeróbios ou microaerófilos, capazes de produzir esporos extremamente resistentes às temperaturas elevadas e que constituem por isso um potencial perigo para os produtos cujas barreiras de conservação assentam no processamento térmico e na anaerobiose; as espécies mais

relevantes para a saúde humana são o *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani* e *C. difficile* (Blaschek, 2000).

O facto deste grupo de microrganismos marcadores não persistir no produto processado e apesar do nível de contaminação com *C. botulinum* em produtos cárneos ser frequentemente baixo, a confirmação da eficiência do processamento térmico permite uma maior segurança, considerando que a letalidade verificada não excluía a hipótese de sobrevivência dos esporos mais resistentes das espécies de *C. botulinum* mesófilas, cujo desenvolvimento ficava então exclusivamente limitado pelas baixas temperaturas de conservação (Peck & Stringer, 2005).

#### **6.1.8. *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolítica***

*Campylobacter* constitui uma das principais causas de gastroenterite no homem. Devido às suas características (microaerófilo e termófilo), não se multiplica bem nos alimentos, sendo que a principal fonte da infecção para o homem são alimentos contaminados. Foi isolado de alimentos como carne de vaca, porco, produtos cárneos, pescado, assim como de outras fontes de origem ambiental (Zanetti *et al.*, 1996). Para controlar a multiplicação deste microrganismo deve evitar-se a contaminação cruzada de alimentos cozinhados e armazenar os alimentos em refrigeração. *Yersinia enterocolítica* está presente em todo o ambiente. Pode ser encontrada em carnes. A causa exacta da contaminação alimentar é desconhecida. No entanto, a prevalência desta bactéria no solo, água e animais oferece amplas oportunidades para que entre em produtos alimentares (Forsythe, 2002). Apesar de já há alguns anos ter sido reconhecida como agente patogénico para o homem, apenas recentemente foi percebido o seu significado como agente de toxinfecção alimentar. A ubiquidade e capacidade de multiplicação a temperaturas de refrigeração, sem que os alimentos contaminados apresentem sinais aparentes de deterioração, obrigam a uma preocupação acrescida relativamente a este microrganismo. Convém salientar que a maior parte das estirpes isoladas de animais, de alimentos e do ambiente são geralmente não patogénicas (Bottone, 1999).

#### **6.1.9. *Trichinella spiralis***

As infecções provocadas por *Trichinella* são chamados triquinoses, são frequentemente adquiridos pela ingestão da larva sob a forma de quisto em carne de porco mal cozida,

tratada ou preparada. A larva do parasita enquistar-se no músculo. A FSIS (Food Safety Inspection Service) recomenda que todos os produtos cárneos derivados do porco devam ser tratados através do calor, refrigeração ou por processos de cura para destruir o parasita. A temperatura de 62.2°C, normalmente atingida e até excedida durante o processamento térmico, é considerada suficiente para matar este parasita. No entanto, produtos que sejam tratados a temperaturas inferiores (põe ex. no caso da fumagem) necessitam de tratamentos adicionais, passando pelo controlo do tamanho das peças cárneas, dos teores de sal utilizados, assim como do tempo e temperatura de secagem. Outra forma de eliminar este parasita é através da congelação da carne (Forsythe, 2002).

A Tabela 1 apresenta uma lista de bactérias patogénicas associadas à carne e produtos cárneos, as respectivas condições de crescimento e algumas medidas preventivas.

*Tabela 1 – Condições de crescimento de bactérias patogénicas associadas à carne e produtos cárneos e medidas preventivas (adaptado de FSIS (1999))*

<b>Microrganismo patogénico</b>	<b>Temperatura de crescimento</b>	<b>pH</b>	<b>a<sub>w</sub></b>	<b>Medidas preventivas e de controlo</b>
<i>Bacillus cereus</i>	10-48°C	4,9-9,3	0,91	Condições apropriadas de aquecimento/arrefecimento
<i>Campylobacter jejuni</i>	30-47°C	4,7-7,5	>0,97	Condições apropriadas de aquecimento/arrefecimento e congelação. Evitar a contaminação cruzada
<i>Clostridium botulinum</i>				Adição de nitratos e sal, refrigeração, acidificação a pH <4.6 e redução da a <sub>w</sub> <0.93
Grupo I (toxina tipo A, B, F)	10-48°C	>4,6	0,95	
Grupo II (toxina tipo B, E, F)	3,3-45°C		0,98	
<i>Clostridium perfringens</i>	15-50°C	5,5-8,0	0,95	Condições apropriadas de aquecimento/arrefecimento e de cozedura (tempo/temperatura)

*Tabela 1 – Condições de crescimento de bactérias patogénicas associadas à carne e produtos cárneos e medidas preventivas (adaptado de FSIS (1999)) (continuação)*

<i>Escherichia coli O157:H7</i>	10-42°C	4,5-9,0	0,95	Condições apropriadas de aquecimento/arrefecimento e de cozedura (tempo/temperatura)
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5-44°C	5,2-9,6	0,92	Tratamento apropriado com calor, programa de higiene e desinfeção, separação de matérias-primas dos produtos pronto a comer
<i>Salmonella</i>	5-46°C	4,0-9,0	0,95	Tratamento apropriado com calor, programa de higiene e desinfeção, separação de matérias-primas dos produtos prontos a comer
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,5-46°C	5,2-9,0	Aerobiose: 0,86 Anaerobiose: 0,91 Toxinogénese: A – 0,87 B – 0,90 C – 0,94	Controlo do pH, apropriado tratamento térmico, redução da $a_w$  Boas condições de higiene durante a manipulação
<i>Yersinia enterocolítica</i>	2-45°C	4,6-9,6	0,95	Apropriada refrigeração, apropriado tratamento térmico, controlo do sal e acidez, prevenção da contaminação cruzada

Apesar de não analisar os perigos químicos e físicos neste trabalho, irei fazer uma breve referência a estes parâmetros.

## **6.2. Perigos Químicos**

Nesta categoria de perigos inclui-se um vasto conjunto de perigos de origens diversas, desde perigos associados directamente às características das próprias matérias-primas até perigos criados ou introduzidos durante o processo, passando por aqueles que resultam da contaminação das matérias-primas utilizadas. Deste conjunto de perigos químicos destacam-se:

- Aditivos alimentares directos (se utilizados em concentrações indevidas);
- Pesticidas químicos (insecticidas, rodenticidas, fungicidas, herbicidas, reguladores de plantas, desfoliantes,...);
- Medicamentos veterinários (antibióticos, promotores de crescimento);
- Metais pesados (cobre, chumbo, mercúrio,...);
- Toxinas naturais (toxinas associadas a mariscos, cogumelos,...);
- Alérgenos (glúten, lactose,...);
- Substâncias naturais vegetais (solanina em batata, hemaglutinina e inibidores de protease em feijão vermelho e ervilhas, cianógenos em caroços de frutas, fitoalexinas em batata doce e aipo);
- Químicos criados pelo processo ou introduzidos no processo (produtos de limpeza e desinfecção, lubrificantes) (Baptista *et al.*, 2003).

## **6.3. Perigos Físicos**

Nesta categoria de perigos inclui-se um conjunto vasto de perigos que podem ter uma origem diversa, desde objectos que podem estar presentes nas matérias-primas até objectos que podem ser introduzidos nos produtos alimentares por via da manipulação a que os alimentos estão sujeitos no decurso dos processos. Os objectos introduzidos no decurso dos processos podem também eles ter origem diversa. Estes podem provir dos materiais de embalagem e acondicionamento das matérias-primas, de produtos em curso

de fabrico ou de produtos finais, dos equipamentos e utensílios e dos operadores. Assim, entre os perigos físicos mais frequentes é possível enumerar materiais de natureza diversa, tais como: vidros, madeiras, pedras, metais, materiais de isolamento ou de revestimento, ossos, plásticos e objectos de uso pessoal (Baptista *et al.*, 2003).

## **7. CARNE**

### **7.1. Composição química e estrutura da carne de porco e da gordura**

A composição bioquímica da carne de porco oferece excelentes condições para a multiplicação da maioria dos microrganismos. Ao nível da estrutura, o tecido conjuntivo e as bainhas tendinosas constituem barreiras naturais que impedem a penetração dos microrganismos nas partes profundas da massa muscular. O mesmo se pode dizer do tecido adiposo subcutâneo e intermuscular. A multiplicação microbiana inicia-se com particular rapidez nos locais de corte em que as fibras cortadas transversalmente ficam desprotegidas. A carne fresca apresenta valores de  $a_w$  compreendidos entre 0,985 e 0,995, o que constitui um parâmetro ideal para o desenvolvimento dos microrganismos, mesmo os mais exigentes, nomeadamente bacilos Gram negativos (Prandl *et al.*, 1994).

Em relação ao pH, a carne fresca apresenta valores de pH compreendido entre 5,6 e 6,2, após conclusão do processo de maturação. A influência destes valores sobre o crescimento dos microrganismos responsáveis pela decomposição da carne é pouco significativo. No entanto, o crescimento das Enterobacteriáceas e microrganismos psicotróficos decresce quando o valor de pH é inferior a 5,8 (Prandl *et al.*, 1994). Alimentos de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ) são os mais sujeitos a multiplicação microbiana, tanto de espécies patogénicas quanto de espécies deteriorantes. Já nos alimentos ácidos ( $\text{pH}$  entre 4,0 e 4,4), há predominância de crescimento de leveduras, de bolores e de algumas poucas espécies bacterianas, principalmente bactérias lácticas. Nos alimentos muito ácidos ( $\text{pH} < 4,0$ ), o desenvolvimento microbiano fica restrito quase que exclusivamente a bolores e leveduras (Franco & Landgraf, 2005).

O potencial oxidação redução – valor Eh – da carne e órgãos frescos varia principalmente com a quantidade dos grupos sulfidrilo presentes nos enchidos e dos grupos Heme da mioglobina. Este parâmetro determina o crescimento dos microrganismos aeróbios ou dos anaeróbios. Os processos enzimáticos consumidores de

oxigénio, assim como o metabolismo microbiano, diminuem o valor Eh, favorecendo a flora anaeróbia (Prandl *et al.*, 1994).

As substâncias que se originam nos processos metabólicos, quer dos tecidos corporais, quer dos microrganismos, podem influenciar o desenvolvimento dos microrganismos; é o caso do dióxido de carbono, cuja formação exerce acção inibidora sobre numerosos microrganismos, e os ácidos que se produzem no decorrer da maturação da carne, entre os quais o ácido acético, butírico e o ácido láctico que, em termos quantitativos, é o mais importante (Prandl *et al.*, 1994). Por outro lado, a ausência de oxigénio favorece os microrganismos anaeróbios estritos, entre os quais se inclui um dos mais perigosos perigos sanitários: *Clostridium botulinum*.

Além das características intrínsecas da carne, os factores extrínsecos, nomeadamente temperatura, tensão de gases e o vapor de água, também afectam directa ou indirectamente (uma vez que influenciam um parâmetro como a actividade da água), a multiplicação dos microrganismos (Prandl *et al.*, 1994).

A composição química do músculo varia segundo a espécie animal, idade e zona muscular em causa. Em termos gerais, contém 75% de água, 18% de proteínas, 3,5% de substâncias não proteicas solúveis e 3% de gordura (Lawrie, 1998).

### **7.1.1. Água**

O teor em água tem influência na qualidade da carne, afectando a suculência, a cor, a textura e o sabor. A água é o meio universal das reacções biológicas, portanto, a sua presença influi nas mudanças que ocorrem na refrigeração, armazenamento e processamento da carne (Martins, 1984). Só uma pequena fracção de água total, cerca de 4%, se encontra fortemente unida às proteínas, designada por “água ligada”. A restante, “água livre”, compreende ainda duas fracções: uma grande parte sob a forma de água imobilizada fisicamente pela estrutura micelar das proteínas; outra pela água facilmente extraível por compressão.

A actividade da água de um alimento aproxima-se do valor máximo sempre que o seu conteúdo neste é superior a 50%, constituindo a maioria da água disponível. A capacidade de retenção de água é fortemente influenciada pelo pH e forças iónicas, saindo dos tecidos por alterações provocadas por agentes físicos, químicos ou

bioquímicos (Cheftel *et al.*, 1976). A capacidade mínima de retenção de água coincide com o pH 5 (ponto isoeléctrico da maioria das proteínas) aumentando à medida que se afasta deste. A redução do teor em água disponível necessária ao crescimento dos microrganismos e à actividade das enzimas leva à estabilidade dos produtos. Estes aspectos são muito importantes no tipo de processamento tecnológico dos produtos cárneos. A água dos produtos de salsicharia bem como a sua disponibilidade é, pois, decorrente das matérias-primas utilizadas e dos procedimentos tecnológicos a que os produtos são submetidos no decorrer do seu processamento, passando o seu controlo pela remoção da água por desidratação ou indisponibilizando-a no seio do produto, principalmente pela adição de humectantes (Leistner & Gould, 2002).

### **7.1.2. Proteínas**

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

As proteínas são susceptíveis de sofrerem alterações induzidas pelas diferentes operações de processamento como o aquecimento, o arrefecimento, a secagem, a redução de tamanho e a pressão; pelas condições ambientais como a força iónica, o pH, os tipos de sal e o potencial de oxidação-redução, mas também pela interacção com outros ingredientes a qual se acumula ao efeito das condições ambientais. Com valores de pH superiores ou inferiores ao seu ponto isoeléctrico, as proteínas possuem carga negativa ou positiva, facto que influencia a sua interacção com as moléculas de água e consequentemente a sua solubilidade (Culbertson, 2006).

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

As proteínas do músculo, para além de desempenharem uma função plástica, intervêm nos fenómenos de contracção (Prandl *et al.*, 1994).

A carne apresenta diferentes tipos de proteínas que são compostos por diferentes quantidades e tipos de aminoácidos. Existe uma grande diferença biológica entre as proteínas musculares e as proteínas do tecido conjuntivo (colagénio), pois estas últimas têm um conteúdo muito menor em aminoácidos essenciais (Prandl *et al.*, 1994).

A composição e a estrutura do colagénio dependem da espécie, raça, sexo, idade, período de crescimento, deficiência em vitaminas, etc. As fibras do colagénio diminuem o seu comprimento inicial quando submetidas a temperaturas de 60°C, transformando-se em gelatina a temperaturas superiores (Prandl *et al.*, 1994).

Do ponto de vista tecnológico, a mais importante é a mioglobina. É a principal responsável pela cor da carne e é constituída por uma proteína, a globina, e um grupo prostético heme, que tem um átomo de ferro, e um anel de porfirina. O grupo heme é o responsável pela capacidade de captação de oxigénio. A hemoglobina é a responsável pelo transporte do oxigénio e pela cor do sangue (Prandl *et al.*, 1994).

Também fazem parte dos componentes proteicos sarcoplásmicos as enzimas, que desempenham um papel importante nos fenómenos da maturação da carne.

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

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

Considerando que, para uma parte considerável da população mundial, é difícil suprir as necessidades proteicas, fenómeno com tendência a agravar-se, já que a produção de proteína resulta mais dispendiosa do que a dos lípidos ou hidratos de carbono, torna-se necessário encontrar novas fontes de proteína e melhorar a eficiência da utilização das proteínas convencionais (Simela & Merkel, 2008).

### 7.1.3. Lípidos

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

Na carne e nos produtos cárneos, adicionalmente à actividade microbiana, a principal causa de deterioração são as alterações na gordura, limitando frequentemente a vida útil das carnes congeladas e dos produtos cárneos fermentados, devido a alterações provocadas na cor, odor e sabor (Salavessa, 2009).

A gordura representa um papel importante nas características organolépticas da carne, conferindo-lhe características especiais. O sabor e aroma específicos resultam da complexa interacção dos lípidos com outros compostos do músculo e o seu teor tem influência na suculência, na dureza e no aspecto da carne (Martins, 1984).

Os lípidos têm propriedades físico-químicas peculiares que resultam da sua composição, estrutura, comportamento na fusão e na solidificação, relação com a água e outras moléculas não lipídicas, que são especialmente importantes no que diz respeito às propriedades que influenciam a textura dos alimentos (Richards, 2006).

Na carne, os lípidos encontram-se localizados no tecido adiposo (subcutâneo e intermuscular) e no tecido muscular (Flores e Toldrá, 1999).

A gordura extraída do tecido adiposo é constituída por 99% dos ésteres de glicerol e ácidos gordos, que, como lípidos de reserva, serão catabolizados, em caso de necessidade, para a produção de energia (Martins, 1984).

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

Assim, a estabilidade oxidativa dos lípidos depende de vários factores como o grau de insaturação, a natureza da insaturação relativamente ao posicionamento das duplas ligações, a presença de antioxidantes naturais ou sintéticos, a presença de metais,

cloreto de sódio, pigmentos fotossensíveis, enzimas pró-oxidantes e das condições de conservação como a temperatura, luz, oxigénio e humidade (Chu & Hwang, 2002).

O tecido adiposo localiza-se diferencialmente segundo a espécie, sendo notória e característica a localização da gordura subcutânea no porco. Apresenta diferente constituição em ácidos gordos e colagénio, conforme a sua localização anatómica. Este facto repercute-se na sua consistência e aptidão tecnológica. O toucinho, para além de possuir ácidos gordos insaturados, tem um elevado teor de colagénio, constituindo uma armadura de suporte, sendo considerado uma gordura firme e, portanto, adequada para o fabrico de enchidos crus (Martins, 1984).

Os lípidos do tecido muscular são constituídos por triglicéridos, fosfolípidos e por matérias insaponificáveis, como o colesterol (Lawrie, 1998). Estes dividem-se em lípidos intramusculares e intracelulares. Os lípidos intramusculares fazem parte das fibras musculares e os intracelulares fazem parte das mitocôndrias, membranas. São compostos principalmente de fosfoglicéridos e lipoproteínas (Flores e Toldrá, 1999).

A composição em ácidos gordos é variável com a espécie, e, dentro desta, com os factores ambientais e alimentação.

A composição em ácidos gordos, para além de ser importante para a consistência, influencia na qualidade organoléptica. Quanto mais elevada for a presença de ácidos gordos insaturados, maior é a probabilidade de oxidação (Flores e Toldrá, 1999).

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

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

impacto no pH e na  $a_w$  final do produto. Altos níveis de gordura aumentam o pH do preparado da carne, mas sem influência na fermentação do produto (Feiner, 2006).

#### **7.1.4. Hidratos de Carbono**

A carne é pobre em hidratos de carbono, sendo os principais os polissacáridos (glicogénio) e os monossacáridos (glicose e frutose) (Almeida, 2009).

O conteúdo em glicogénio varia com o tipo de músculo e com a sua actividade. No animal vivo, é aproximadamente 1,5% e, após as modificações *post-mortem*, diminui para 0,1%. As vísceras comestíveis são mais ricas em hidratos de carbono do que a carne. O fígado bovino possui entre 2 a 4% e o de suíno 1% de hidratos de carbono (Prandl *et al.*, 1994).

#### **7.1.5. Cinzas**

O conteúdo de cinzas ou resíduo mineral fixo, obtido após incineração da carne a 500-600°C, está compreendido entre 0,8 a 1,8%. Entre as funções importantes que exercem os iões orgânicos e inorgânicos destacam-se as seguintes: o cálcio e o magnésio desempenham um papel importante na contracção muscular; os compostos orgânicos com fósforo e com diversos ésteres do ácido fosfórico intervêm nas modificações *post-mortem*, no processo de maturação da carne e hidratação da carne (Price *et al.*, 1994).

A carne possui quase todos os minerais de importância para a nutrição humana. Em termos quantitativos, o fósforo e o potássio são os mais importantes. A relação entre potássio e sódio é favorável na carne. Os produtos cárneos processados são ricos em sódio devido a adição de sal refinado, na proporção de 2 a 3% durante a elaboração (Prandl *et al.*, 1994).

A carne também é uma boa fonte de oligoelementos, como o zinco e o ferro. A importância da carne como fonte de ferro não se baseia somente no elevado teor mas também na alta biodisponibilidade deste elemento na carne (Tabela de Composição dos Alimentos, 2007).

## 7.2. Factores que afectam a qualidade

### 7.2.1. Actividade da água ( $a_w$ )

A carne crua contém cerca de 75% de água. Num alimento deve distinguir-se a água livre e a água ligada. Para exprimir a água livre nos alimentos recorre-se ao conceito de “actividade da água” ( $a_w$ ).

A actividade da água ( $a_w$ ) é um parâmetro físico-químico que permite avaliar a fracção de água disponível nos alimentos para participar na actividade enzimática, reacções físico-químicas e no metabolismo microbiano, constituindo uma importante, e frequentemente utilizada, referência para a determinação da estabilidade e segurança sanitária dos géneros alimentícios (Sablani *et al.*, 2007).

A resposta dos microrganismos à actividade da água dos alimentos pode ser afectada por vários factores (oxidação lipídica, alteração da cor, alteração da textura, perda de nutrientes, alteração da actividade enzimática, pH, potencial de oxidação/redução, temperatura e presença de certas substâncias), sendo o crescimento microbiano, e em alguns casos a produção dos seus metabolitos, particularmente sensíveis a alterações da  $a_w$ . Os diferentes microrganismos têm geralmente um nível óptimo e um nível mínimo de  $a_w$  para crescerem, embora dependam de outros factores de crescimento do meio. O crescimento e o metabolismo exigem a presença de água numa forma disponível e a  $a_w$  é um índice desta disponibilidade para a utilização em reacções químicas e crescimento microbiano. A maioria das bactérias patogénicas encontra-se controlada quando a  $a_w$  é inferior a 0.85, sendo que a produção de toxinas é, na maioria dos casos, inibida a  $a_w$  inferiores a 0.90.

A adição de solutos a um líquido puro causa uma redução na pressão de vapor da solução, diminuindo conseqüentemente a  $a_w$ . Sendo 1 o valor de  $a_w$  obtido na água pura, o valor de  $a_w$  oscila entre 0 e 1. Quanto mais baixa for a  $a_w$  de um alimento maior será a sua estabilidade. A redução da  $a_w$  nos alimentos torna menos favoráveis as condições de crescimento e actividade dos microrganismos, entre os quais, os envolvidos nas alterações dos produtos e os patogénicos. A célula microbiana compete com as moléculas de soluto pela água livre. À excepção do *S. aureus*, as bactérias são mais competitivas pela água livre que os fungos. A actividade da água tem sido bastante utilizada como um factor de conservação de alimentos por meio da adição de sal ou açúcar (Forsythe, 2002).

Nos produtos em que a  $a_w$  é o principal factor de conservação, caso dos enchidos crus, o seu valor deve ser suficientemente reduzido para se conseguir uma adequada estabilidade e segurança sanitária. A importância atribuída ao parâmetro  $a_w$  levou à classificação dos alimentos em três categorias:

- Alimentos de humidade elevada –  $0,90 < a_w < 1,00$
- Alimentos de humidade intermédia –  $0,60 < a_w < 0,90$
- Alimentos de humidade reduzida –  $a_w < 0,60$

Os alimentos classificados como alimentos de humidade intermédia podem ser armazenados sem recurso ao frio. É nesta categoria que se inserem a maioria dos produtos de salsicharia tradicional portuguesa ( $a_w = 0.87 - 0.90$ ), cujo valor contribui para a sua estabilidade.

### **7.2.2. Acidez**

A acidez dos alimentos é, normalmente, medida por um parâmetro denominado pH, que é a expressão quantitativa da acidez ou alcalinidade do substrato e indica a quantidade de ácido ou base livre, dissolvida na parte líquida do alimento (Cantoni *et al*, 1977), cuja escala varia entre 1 e 14. Este parâmetro exerce também uma importante função na estabilidade dos produtos alimentares. Para Cheftel (1976), um pH elevado favorece a proliferação de bactérias, enquanto que um pH baixo as paralisa, chegando, em alguns casos, a inibi-las completamente. Callow, citado por Lawrie (1998), observou que um pH final da carne elevado tem efeito desfavorável na alteração das carnes curadas, no entanto, se o conteúdo salino for elevado, este efeito não é tão importante. O pH da carne desempenha um papel importante no processo da maturação da mesma. O pH é um importante factor físico-químico que condiciona as reacções enzimáticas, a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos nos alimentos, constituindo uma potencial barreira que interessa conhecer e controlar ao longo de todo o processo produtivo, a fim de garantir uma maior segurança e a conservação dos géneros alimentícios até o seu consumo final (Ordóñez & Hoz, 2007).

Dada a importância dos parâmetros  $a_w$  e pH na conservação dos alimentos foi possível estabelecer, quanto à sua estabilidade, três categorias de produtos (Tabela 2).

*Tabela 2 – Condições de armazenagem de produtos cárneos em função da  $a_w$  e pH  
(Directiva Sanitária nº 77/99/CEE de 21 de Dezembro de 1979)*

<b>Categoria</b>	<b>Critério</b>	<b>Temperatura de armazenagem</b>
Estáveis	$a_w \leq 0,95$ e $pH \leq 5,2$ ou $a_w \leq 0,91$ ou $pH \leq 4,5$	Não necessita de refrigeração
Alteráveis	$a_w \leq 0,95$ ou $4,5 < pH \leq 5,2$	$\leq 10^\circ\text{C}$
Facilmente alteráveis	$a_w > 0,95$ e $pH > 5,2$	$\leq 5^\circ\text{C}$

Em resumo, poderá afirmar-se que a estabilidade dos produtos cárneos e de salsicharia é fortemente influenciada pela combinação dos seguintes 3 factores:  **$a_w$** , **pH** e **temperatura de armazenagem**.

## **8. MATERIAL E MÉTODOS**

### **8.1. Material**

#### **8.1.1. Amostras de enchidos**

Foram analisadas amostras de cinco enchidos provenientes de diferentes regiões de Portugal, embaladas e adquiridas no mercado tradicional. Do mesmo enchido foram adquiridas três amostras de lotes diferentes. Todos os testes microbiológicos e físico-químicos foram feitos em triplicado.



**Figura 1** – Amostra de enchido (fonte: <http://www.portugalblog.com/pt-pt/2010/01/fumeiro-portugal/>)

## **8.2. Avaliação microbiológica dos enchidos**

Foi efectuada a análise microbiológica a todas as amostras de enchidos e foram quantificados/pesquisados vários microrganismos indicadores de qualidade e segurança. Foram analisados os seguintes microrganismos: contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, contagem de psicrófilos, contagem de bolores e leveduras, contagem de clostrídios sulfito-redutores, contagem de coliformes fecais e *Escherichia coli*, pesquisa de *Salmonella* e de *Staphylococcus aureus*.

O material usado foi material de uso comum em laboratório de microbiologia, e todo ele foi lavado, seco em estufa e esterilizado no autoclave.

Os componentes utilizados na elaboração dos vários meios utilizados encontram-se descritos no anexo I.

As amostras apenas foram abertas na altura da análise.

A preparação das amostras foi efectuada de acordo com as normas portuguesas (NP-1828:1982, NP-1829:1982, NP-3005:1985, EN ISO 6887-1:1999). Foram pesadas dez gramas de cada amostra de enchido e homogeneizadas com noventa ml de água peptonada (diluição  $10^{-1}$ ). Para cada amostra prepararam-se diluições decimais sucessivas utilizando o mesmo diluente (água peptonada).

### **8.2.1. Contagem de microrganismos mesófilos totais (NP-3788:2002)**

A contagem das bactérias aeróbias mesófilas foi efectuada em placas de Petri com Meio Plate Count Agar (PCA), previamente fundido, e foram inoculadas com 1 ml das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  das amostras de cada amostra de enchido. O inóculo foi semeado por incorporação. As culturas foram incubadas a 30°C durante 48-72h. De seguida, procedeu-se à contagem das colónias (entre 15 e 150) e fez-se a média das diluições para cada amostra. A contagem microbiológica expressou-se em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/g).

$$\text{UFC/g} = \Sigma c \div [\text{V} \times (\text{n}_1 + 0,1 \text{n}_2) \times \text{d}]$$

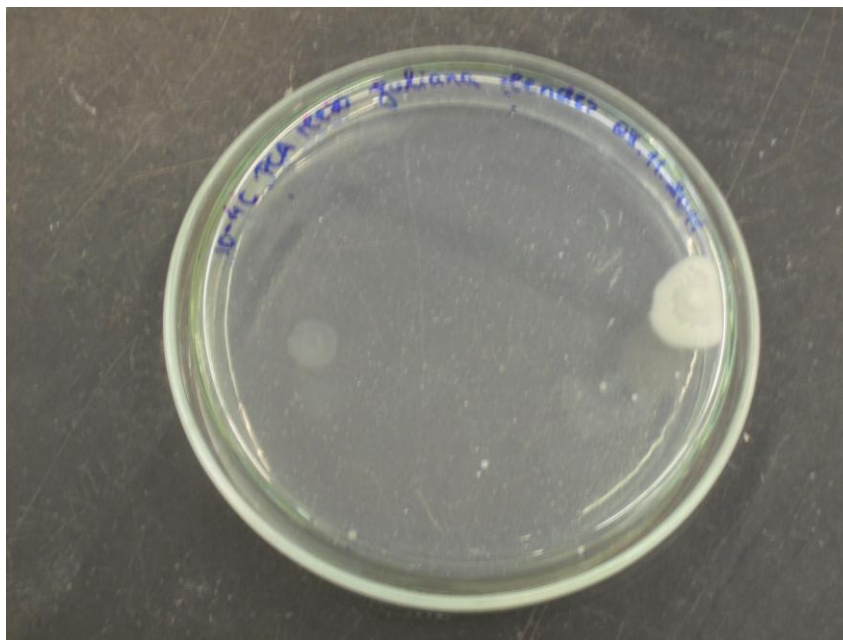
$\Sigma c$  – soma das colónias em todas as placas contadas

V – volume de inóculo semeado em cada placa

$n_1$  – número de placas da primeira diluição contada

$n_2$  – número de placas da segunda diluição contada

d – diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens



**Fig. 2** – Mesófilos em placa de Petri (fotografia tirada pela autora)

### 8.2.2. Contagem de microrganismos psicrófilos

A contagem de bactérias aeróbias psicrófilas foi efectuada em placas de Petri com Meio Plate Count Agar (PCA), previamente fundido e arrefecido, e foram inoculadas com 0,1 ml das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  das amostras de cada amostra de enchido. O inóculo foi semeado por espalhamento sobre o meio com um semeador de vidro esterilizado. As culturas foram incubadas no frigorífico durante 10 dias. De seguida, procedeu-se à contagem das colónias (entre 15 e 150) e fez-se a média das diluições para cada amostra. A contagem microbiológica expressou-se em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/g), com a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/g} = \Sigma c \div [V \times (n_1 + 0,1 n_2) \times d]$$

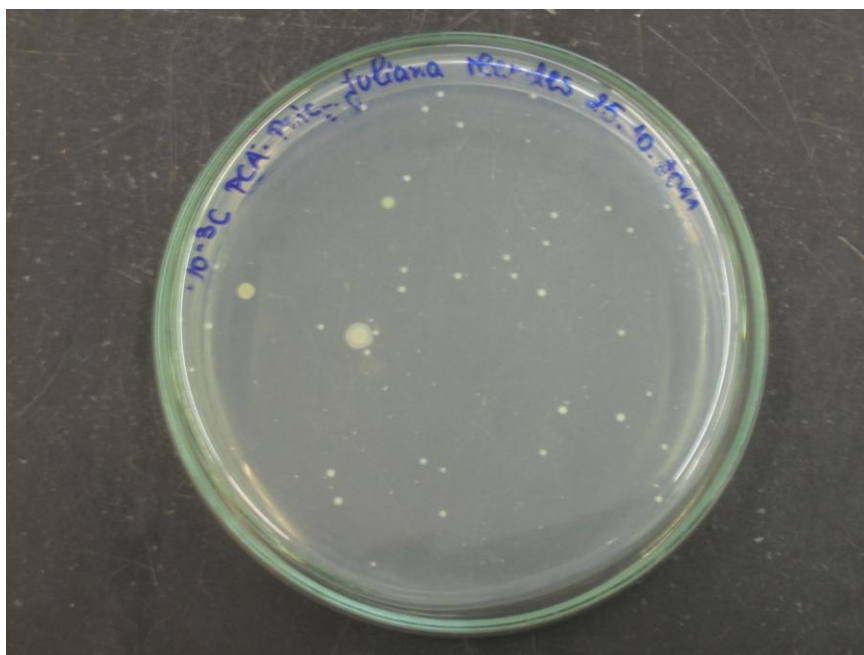
$\Sigma c$  – soma das colónias em todas as placas contadas

$V$  – volume de inóculo semeado em cada placa

$n_1$  – número de placas da primeira diluição contada

$n_2$  – número de placas da segunda diluição contada

$d$  – diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens



**Fig. 3** – Psicófilos em placa de Petri (fotografia tirada pela autora)

### 8.2.3. Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi efectuada em placas de Petri contendo meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) acidificado com ácido tartárico, previamente fundido e arrefecido, e foram inoculadas com 0,1 ml de cada uma das diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ ) de cada amostra de enchido. O inóculo foi espalhado sobre o meio com um semeador de vidro esterilizado. As placas foram incubadas a 25°C durante 48h. De seguida, procedeu-se à contagem das colónias (entre 15 e 150) e fez-se a média das diluições para cada amostra. Os resultados expressam-se em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/g), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/g} = \Sigma c \div [V \times (n_1 + 0,1 n_2) \times d]$$

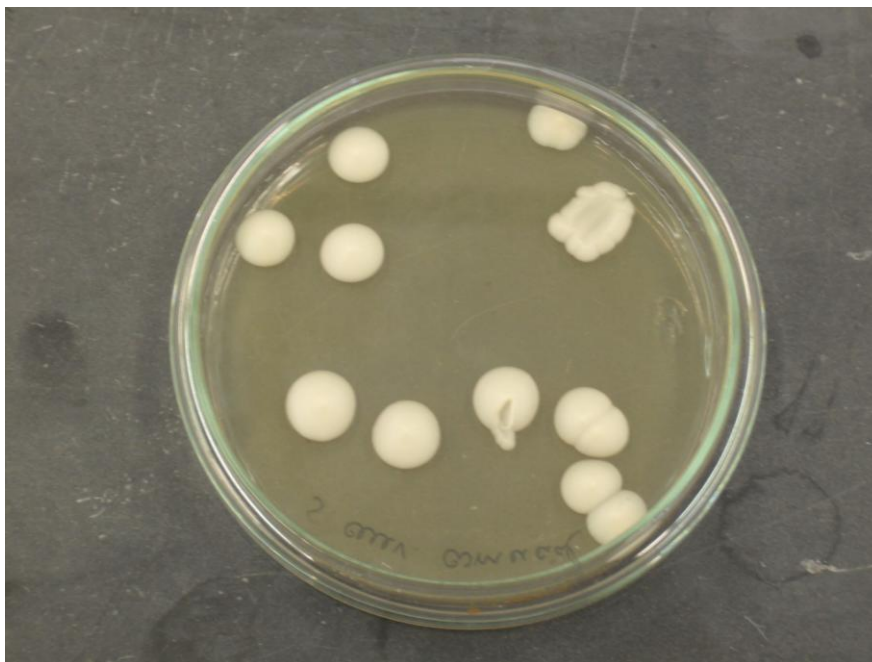
$\Sigma c$  – soma das colónias em todas as placas contadas

V – volume de inóculo semeado em cada placa

$n_1$  – número de placas da primeira diluição contada

$n_2$  – número de placas da segunda diluição contada

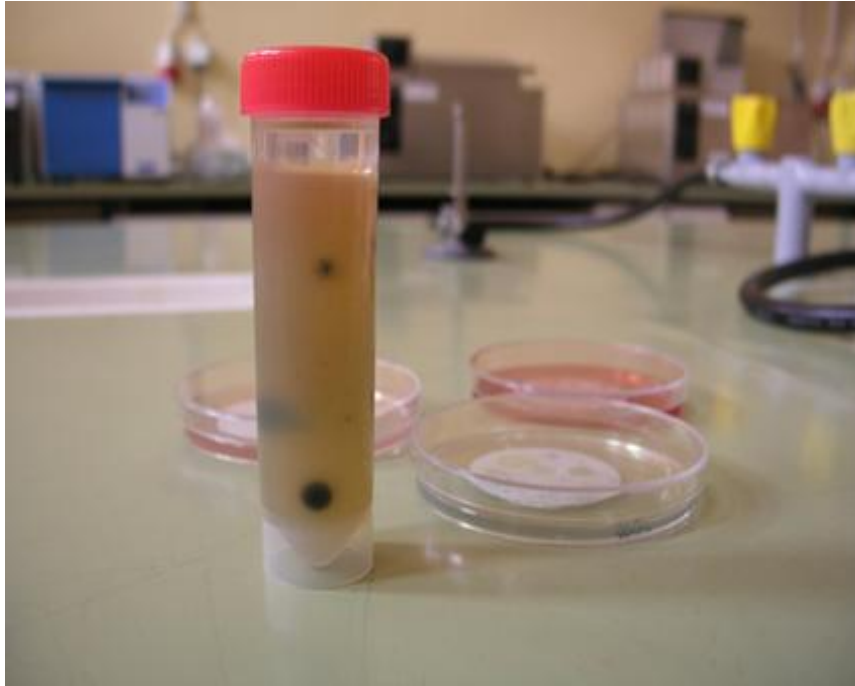
d – diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens



**Fig. 4** – Bolores e Leveduras em placa de Petri (fotografia tirada pela autora)

#### **8.2.4. Contagem de clostrídios sulfito-redutores (ISO 15213:2003)**

Para a determinação dos clostrídios sulfito-redutores, a amostra foi colocada em tubos de ensaio com 0,1 ml, 1 ml, 5 ml e 10 ml e foi inactivada em banho-maria a 80°C durante 10 minutos. O meio RCA (Reforced Clostridial Agar), enriquecido com sulfito de sódio e citrato de ferro, foi preparado e adicionado, ainda quente, às amostras anteriores. O volume de meio colocado em cada tubo foi cerca de 3 vezes o volume de amostra. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C durante 10 dias. Foram considerados positivos os tubos em que apareceu um precipitado negro à volta das colónias.



**Fig. 5** – Clostrídios sulfito-redutores (fonte:

[http://www.esb.ucp.pt/twt5/motor/display\\_texto.asp?pagina=clostridiosulfitoredutores200405117223688&bd=cec](http://www.esb.ucp.pt/twt5/motor/display_texto.asp?pagina=clostridiosulfitoredutores200405117223688&bd=cec))

#### **8.2.5. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* (Método Oficial AOAC)**

A contagem de coliformes e *Escherichia coli* foi efectuada utilizando o método Simplate. Colocou-se um 1 ml de amostra da diluição  $10^{-2}$  de cada amostra em tubos de ensaio e adicionou-se 9 ml de Meio Simplate Hidratado, previamente adicionado a 100 ml de água estéril, por cada placa de contagem. Inoculou-se cada amostra na placa de contagem, removeu-se o excesso de líquido no algodão e incubou-se a 35°C na estufa durante 24h. Confirmaram-se os resultados após as 48h. Consideram-se positivos os poços que mudaram de cor. Os resultados expressam-se em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/g).

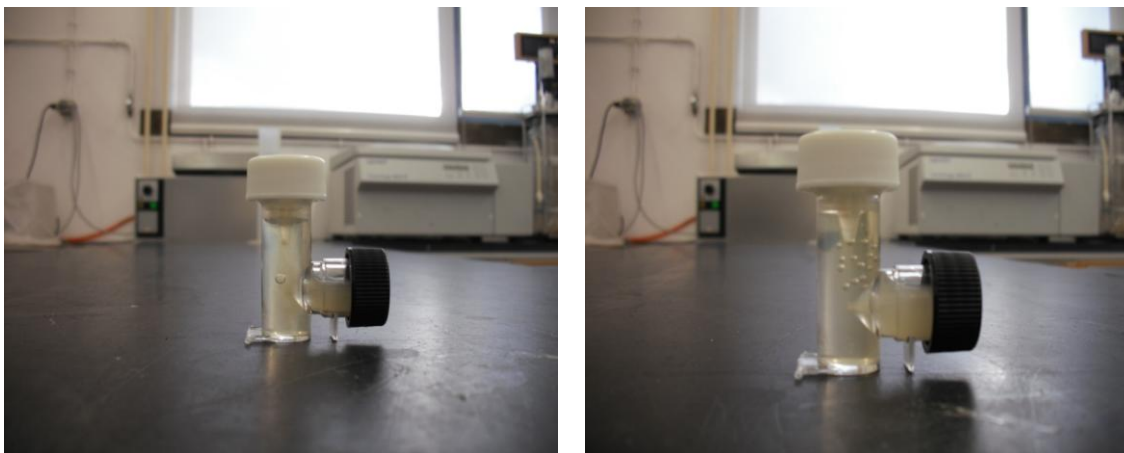


**Fig. 6** – Resultado negativo de Coliformes Totais (fotografia tirada pela autora)

#### **8.2.6. *Salmonella* (Método Oficial AOAC 989.13)**

A detecção foi efectuada usando o 1-2 TEST. Preparou-se a amostra (diluição  $10^{-1}$ ) pré-enriquecida com água peptonada e incubou-se a  $24 \pm 2$ h na estufa a  $35-37^{\circ}\text{C}$ . Passadas as 24h, transferiu-se 1 ml de pré-enriquecimento incubado, misturando 9 ml de Solução de Tetrionato previamente feito, activado com iodo-iodeto (TBG). Agitou-se suavemente e incubou-se 6-8h a  $42^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$  em banho-maria. Passadas as 6-8h, reposicionou-se o 1-2 Test com a tampa preta para cima, secou-se a tampa, retirou-se a tampa do plug da câmara usando uma pinça estéril para retirar o plug. Se o plug não for retirado a amostra incubada não é capaz de se mover desde a câmara de inoculação para a câmara de mobilidade. Transferiu-se 1,5 ml de tetrionato da incubação  $42^{\circ}\text{C}$  para a câmara de inoculação previamente vazia. De seguida, posicionou-se o 1-2 Test com a tampa branca para cima e removê-la. Cortou-se a tampa branca com uma tesoura. O corte deve ser feito onde a ponta se encontra com a base do vácuo do gel anterior. Adicionou-se 1 gota de Reagente #2 (Preparação com Anticorpo) no poço de gel formado pela ponta da tampa, na câmara de mobilidade. Uma gota do Reagente #2 deve encher uniformemente dois-terços do vácuo do gel. Isto pode ser determinado observando a solução azul do anticorpo no vácuo. Não adicionar mais do que 1 gota de Reagente #2. Colocou-se o inoculado 1-2 Test com a tampa branca para cima na estufa e incubou-se entre 14 a 30

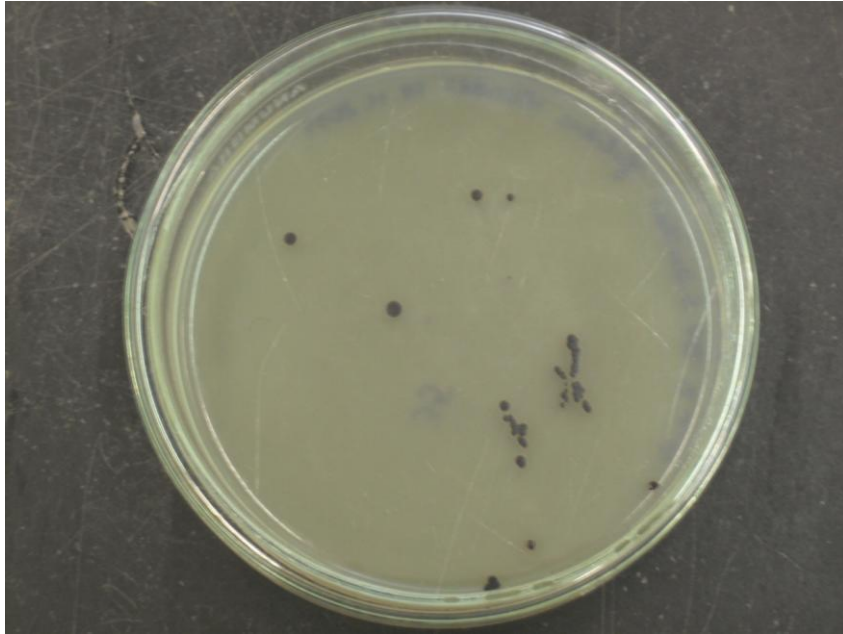
horas a 35°C. Os resultados são expressos através da presença ou ausência de *Salmonella*.



**Fig. 7 e 8** – *Salmonella* positiva e *Salmonella* negativa (fotografias tiradas pela autora)

#### **8.2.7. *Staphylococcus aureus* (NP 4400-1:2002)**

A detecção de *Staphylococcus aureus* foi efectuada em placas de Petri com Meio Baird Parker (BP), previamente fundido, enriquecido com gema de ovo e arrefecido, e foram inoculadas com 0,1 ml das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  das amostras de cada amostra de enchido. O inóculo foi semeado por espalhamento. As culturas foram incubadas a 37°C durante 48h. Para a pesquisa de Estafilococos coagulase positiva, retirou-se uma porção de cada uma das colónias seleccionadas e semeou-se em tubos com BHI (Brain Heart Infusion), previamente feito. Incubou-se a 37°C durante 20 a 24h. Juntou-se assepticamente 0,1 ml de cada cultura a 0,3 ml de plasma de coelho em tubos de hemólise esterilizados e incubou-se a 37°C. Examinou-se a coagulação do plasma após 4 a 6h. Se necessário, reincubar e examinar de novo às 24h. Considera-se a reacção coagulase positiva quando o coágulo ocupa mais de  $\frac{3}{4}$  do volume inicialmente ocupado pelo líquido. As contagens microbianas são expressas pela ausência ou presença de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.



**Fig. 9** – *Staphylococcus aureus* em placa de Petri (fotografia tirada pela autora)

### **8.3. Caracterização dos enchidos**

#### **8.3.1. Análise físico-química/nutricional**

##### **8.3.1.1. Humidade**

A humidade foi determinada segundo a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (Edição electrónica, 2008). Aproximadamente 3g de amostra de cada um dos enchidos a estudar foram secos em estufa a uma temperatura de 100 a 105°C até peso constante.

A humidade foi determinada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Humidade (\%)} = [(m_i - m_f) \div m_i] \times 100$$

$m_i$  – peso inicial da amostra

$m_f$  – peso final da amostra (peso constante)

##### **8.3.1.2. Cinzas Totais**

A cinza total de um alimento é o resíduo mineral obtido após incineração (matéria orgânica).

Colocaram-se dois gramas de enchido em cadinhos de porcelana e incineraram-se na mufla a 550°C, até obtenção de cinzas brancas (aproximadamente 4 horas).

De seguida, após arrefecimento no excicador, as cinzas foram determinadas utilizando-se a seguinte equação:

$$g(\text{cinzas})\% = [(P' - p) \times 100] \div (P - p)$$

$p$  – massa da cápsula (tara da cápsula)

$P$  – peso da cápsula + amostra

$P'$  - massa da cápsula + cinzas

##### **8.3.1.3. pH**

Este parâmetro foi determinado seguindo a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (Edição electrónica, 2008). Dissolveram-se dez gramas de enchido em 100 ml de água desionizada. O pH foi determinado por leitura directa com o medidor de pH (Meter Basic 20).

#### 8.3.1.4. Actividade da Água

Este parâmetro foi determinado colocando directamente cada uma das amostras de enchido num medidor de actividade da água (Rotronic HygroPalm. CH-8303 Bassersdorf).

#### 8.3.1.5. Lípidos

Para a determinação dos lípidos, trituraram-se as amostras de enchido sem pele e pesaram-se 1,5 a 2 gramas de amostra triturada numa balança. Adicionou-se 0,2000 a 0,2009 g de  $C_{13}$ , 0,05 g de ácido ascórbico, 15 pastilhas de hidróxido de potássio, 2 ml de água destilada e 45 ml de butanol. Colocaram-se as amostras (2 ou 4) na unidade de extracção B-815 durante 30 minutos. De seguida, adicionou-se 40 ml de solução acídica a cada amostra, agitou-se durante 3 minutos e deixou-se repousar durante umas horas. Recolheu-se da face superior, mais ou menos a meio, uma fracção da amostra obtida com uma pipeta de Pasteur. Introduziram-se os dados obtidos anteriormente (peso das amostras e dos reagentes) no cromatógrafo gasoso para a determinação da gordura.



**Figuras 10 e 11** – Cromatógrafo gasoso e Unidade de Extracção B-815 (fotografias tiradas pela autora)

## 9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.1. Análise microbiológica dos enchidos

A qualidade dos enchidos pode estar em causa sempre que se desenvolvem microrganismos que comprometam as características nutricionais destes produtos. Por isso, os microrganismos têm influência na decomposição, afectando assim negativamente a qualidade deste tipo de produtos.

Em Portugal existem especificações para alguns dos parâmetros microbiológicos analisados.

No Regulamento 1441 de 2007, os limites microbiológicos máximos são  $5 \times 10^6$  UFC/g (ou 6,70 log UFC/g) e 500 UFC/g (ou 2,70 log UFC/g), respectivamente, para a contagem de microrganismos aeróbios e *E. coli*.

Para a contagem de bolores e leveduras, o limite microbiológico máximo é de  $10^2$  UFC/ml (ou 2 log UFC/g).

Foram analisados três tipos de enchidos: salpicão, chouriço e linguiça. As amostras C e M são salpicões; as amostras G e P são chouriços e a amostra V é linguiça. Para cada amostra (C, M, G, P e V), foram analisados três lotes diferentes (CI, CII, CIII, GI, GII, GIII, MI, MII, MIII, PI, PII, PIII, VI, VII e VIII). Todas as análises foram efectuadas em triplicado.

Os resultados obtidos na análise microbiológica dos enchidos encontram-se descritos na tabela 3.

*Tabela 1 – valores obtidos para os parâmetros microbiológicos das amostras de enchido avaliadas*

Amostra de enchido	Mesófilos (log UFC/g)	Psicrófilos (log UFC/g)	Bolores e Leveduras (log UFC/g)	Coliformes Totais (log UFC/g)	E. coli (log UFC/g)
CI	5,19±0,11abc <sup>1</sup>	3,5±1,2b	4,8±0,14ab	4,67±0,11a	0,0±0,0b
CII	3,47±0,25cd	0,0±0,0c	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0b
CIII	3,74±0,19bcd	0,0±0,0c	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0b
GI	3,82±0,02bcd	0,0±0,0c	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0b
GII	3,91±1,92bcd	0,0±0,0c	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0b
GIII	3,33±0,07d	0,0±0,0c	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0b
MI	4,41±0,15abcd	0,0±0,0c	4,42±0,71b	3,66±0,27bc	0,0±0,0b
MII	3,48±0,18cd	0,0±0,0c	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0b
MIII	3,01±0,61d	0,0±0,0c	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0b
PI	5,13±0,33abc	0,0±0,0c	3,16±1,11c	2,66±0,39c	0,0±0,0b
PII	5,75±0,42a	0,0±0,0c	0,0±0,0d	3,63±0,07bc	3,63±0,07a
PIII	4,36±0,05abcd	4,91±0,3a	4,28±0,68bc	4,05±0,06ab	0,0±0,0b
VI	4,22±0,07abcd	4,79±0,37a	5,71±0,34a	3,22±1,2bc	0,0±0,0b
VII	5,48±0,45ab	4,92±0,11a	5,68±0,49a	0,0±0,0d	0,0±0,0b
VIII	3,63±0,74cd	4,48±0,02ab	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0b

<sup>1</sup>letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas para  $p \leq 0,05$

*Tabela 2 – valores obtidos para os parâmetros microbiológicos das amostras de enchido avaliadas (continuação)*

Amostra de enchido	<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva	Clostrídios sulfito-redutores	<i>Salmonella</i>
CI	Presença	Negativo	Negativo
CII	Ausência	Negativo	Negativo
CIII	Ausência	Negativo	Negativo
GI	Ausência	Negativo	Negativo
GII	Ausência	Negativo	Negativo
GIII	Ausência	Negativo	Negativo
MI	Presença	Negativo	Negativo
MII	Ausência	Negativo	Negativo
MIII	Ausência	Negativo	Negativo
PI	Ausência	Negativo	Negativo
PII	Ausência	Negativo	Negativo
PIII	Ausência	Negativo	Negativo
VI	Presença	Negativo	Negativo
VII	Ausência	Negativo	Negativo
VIII	Ausência	Negativo	Negativo

Em relação aos microrganismos aeróbios mesófilos, o valor mínimo foi de 3,01 log UFC/g para a amostra MIII, correspondendo o valor máximo à amostra PII com 5,75 log UFC/g. Relativamente aos microrganismos aeróbios psicrófilos, os valores obtidos estão compreendidos entre 0,0 log UFC/g para as amostras CII, CIII, GI, GII, GIII, MI, MII, MIII, PI e PII e 4,92 log UFC/g para a amostra VII.

Da análise da tabela verifica-se que, no que diz respeito à contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e microrganismos aeróbios psicrófilos, todas as amostras de enchido analisadas se encontram dentro dos limites estipulados pelo Regulamento 1441 de 2007. De acordo com Salavessa (2009), as médias dos valores obtidos para os aeróbios mesófilos e para os psicrófilos em maranhos (enchidos elaborados com carne de cabra) foram 7,44 log UFC/g e 7,44 log UFC/g, respectivamente, valores superiores aos obtidos neste trabalho.

Contagens muito elevadas são, em regra, sinal de deterioração dos alimentos, que passam a considerar-se impróprios para consumo quando atingem valores na ordem dos 6 a 7 log UFC/g (Candlish *et al*, 2001).

Em relação aos bolores e leveduras, os valores obtidos para estes microrganismos estão compreendidos entre 0,0 log UFC/g para as amostras CII, CIII, GI, GII, GIII, MII, MIII, PII e VIII e 5,71 log UFC/g para a amostra VI. Verificamos que os valores obtidos para as amostras CI, MI, PI, PIII, VI e VII foram superiores ao limite microbiológico estabelecido por Almeida (2009) em linguiças e chouriços. A maior parte dos valores obtidos para os bolores e leveduras foram inferiores aos determinados por Salavessa (2009) em enchidos maranhos (bolores: média 2,41; leveduras: média 4,94).

Os coliformes totais e fecais são os indicadores mais utilizados para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e água para consumo humano. Nas amostras CI, MI, PI, PII, PIII e VI verificou-se presença de coliformes totais, com o valor máximo de 4,67 log UFC/g para a amostra CI. Nas amostras CII, CIII, GI, GII, GIII, MII, MIII, VII e VIII, o valor mínimo obtido foi 0,0 log UFC/g. Na amostra PII, com o valor máximo de 3,63 log UFC/g, também se verificou a presença de coliformes fecais, com um valor de 3,63 log UFC/g. Esta amostra ultrapassou o limite estabelecido pelo Regulamento 1441 de 2007. *E. coli* estava ausente nas restantes amostras analisadas. Segundo Salavessa (2009), os valores obtidos, em enchidos maranhos, estão compreendidos entre 1,30 e 4,90 log UFC/g, com uma média de 2,62 log UFC/g. Os valores obtidos por este investigador foram superiores aos observados neste trabalho.

Relativamente aos Clostrídios sulfito-redutores e à *Salmonella*, indicadores de segurança, estavam ausentes em todas as amostras analisadas.

Nas amostras CI, MI e VI verificou-se a presença de estafilococos coagulase positiva, sugerindo que a contaminação poderá ter tido origem em manipulações inadequadas durante o processo de transformação dos enchidos.

Da análise da tabela 3, verificaram-se, de um modo geral, diferenças significativas entre as várias amostras para todos os microrganismos em estudo. Convém salientar que, diferenças significativas foram também observadas entre lotes do mesmo produto.

Os resultados obtidos, quer para os indicadores de contaminação, quer para os indicadores de segurança, sugerem, na generalidade, que os enchidos são seguros do ponto de vista microbiológico.

As correlações entre os parâmetros microbiológicos e físico-químicos das amostras de enchido analisadas encontram-se sumariadas na tabela 4. Consideraram-se os valores de correlação superiores a 0,3, como havendo relação entre os parâmetros em análise. Os valores de correlação inferiores a 0,3 foram considerados não correlacionados.

*Tabela 4 – Matriz de correlação entre os parâmetros microbiológicos, o pH e a<sub>w</sub> das amostras de enchido analisadas*

	Mesófilos (log UFC/g)	Psicrófilos (log UFC/g)	Coliformes (log UFC/g)	Bolores e Leveduras (log UFC/g)	E. coli (log UFC/g)	pH	a <sub>w</sub>
Mesófilos (log UFC/g)	1,000						
Psicrófilos (log UFC/g)	0,269	1,000					
Coliformes (log UFC/g)	0,545**	0,307*	1,000				
Bolores e Leveduras (log UFC/g)	0,486**	0,658**	0,633**	1,000			
E. coli (log UFC/g)	0,437**	-0,186	0,313*	-0,210	1,000		
pH	0,110	-0,635**	0,034	-0,386**	0,548**	1,000	
a <sub>w</sub>	0,007	0,326*	0,506**	0,371*	-0,056	-0,099	1,000

\*correlação é significativa para  $p \leq 0,05$

\*\*correlação é significativa para  $p \leq 0,01$

Da análise da tabela, verificou-se uma correlação negativa altamente significativa entre o pH e os psicrófilos e entre o pH e os bolores e leveduras. Relativamente à *E. coli*, a correlação com o pH foi altamente significativa e positiva.

No que diz respeito à  $a_w$ , observaram-se correlações altamente significativas e positivas com os psicrófilos, coliformes e bolores e leveduras.

Estas correlações podem ser explicadas, pelo facto de a maior parte dos microrganismos não crescerem a pH ácido. Alguns bolores e leveduras contaminantes conseguem multiplicar-se em condições desfavoráveis para a maior parte das bactérias (baixa  $a_w$  e pH <5), conferindo-lhes vantagens na colonização e multiplicação.

## **9.2. Análise físico-química e nutricional dos enchidos**

A qualidade de qualquer produto alimentar é avaliada pelas suas propriedades físicas, químicas e nutricionais.

Existem, em Portugal, regulamentos e normas (NP 1614, NP 1612 e NP 1613) para caracterizar os enchidos. Segundo a legislação, devem considerar-se os seguintes parâmetros físico-químicos e nutricionais: cinzas, pH,  $a_w$ , humidade, proteínas totais e lípidos.

Foram analisados três tipos de enchidos: salpicão, chouriço e linguiça. As amostras C e M são salpicões; as amostras G e P são chouriços e a amostra V são linguiças. Para cada amostra (C, M, G, P e V), foram analisados três lotes diferentes (CI, CII, CIII, GI, GII, GIII, MI, MII, MIII, PI, PII, PIII, VI, VII e VIII). Os resultados obtidos estão descritos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos e nutricionais das amostras de enchido avaliadas

Amostra de enchido	Parâmetros				
	Cinzas (%)	pH	a <sub>w</sub>	Humidade (%)	Total gordura (g)
CI	4,64±0,25bc <sup>1</sup>	5,2±0,08de	0,89±0,02b	1,37±0,18c	23,86±0,16g
CII	3,83±0,58c	5,32±0,01de	0,87±0,003bc	3,47±0,28a	17,16±0,07i
CIII	5,5±0,0ab	5,43±0,01cd	0,86±0,002bc	3,03±0,24ab	14,87±0,18j
GI	4,33±0,29bc	5,65±0,07bc	0,87±0,01bc	1,93±0,97bc	31,8±0,18e
GII	5,17±0,29abc	5,71±0,03b	0,85±0,01c	3,05±0,24ab	22,94±0,56g
GIII	4,83±0,29bc	5,39±0,07d	0,85±0,01c	2,59±0,28abc	19,89±0,15h
MI	4,00±1,0c	5,31±0,03de	0,95±0,01a	2,43±0,45abc	6,22±0,06l
MII	5,5±0,5ab	5,44±0,02cd	0,86±0,01bc	3,58±0,88a	12,55±0,06k
MIII	5,5±0,5ab	5,39±0,1d	0,87±0,01bc	3,18±0,34ab	16,67±0,01i
PI	6,5±0,0a	5,21±0,09de	0,81±0,02d	2,52±0,14abc	26,76±0,25f
PII	4,17±0,29bc	6,04±0,02a	0,87±0,01bc	1,56±0,37c	47,86±0,33a
PIII	3,83±0,29c	5,39±0,05d	0,94±0,002a	2,32±0,08abc	37,19±0,17c
VI	4,31±0,28bc	4,89±0,03f	0,88±0,01b	2,92±0,18ab	20,3±0,23h
VII	4,00±0,87c	5,11±0,02ef	0,85±0,01c	2,42±0,43abc	42,98±0,8b
VIII	3,81±0,75c	4,52±0,1g	0,88±0,01bc	3,39±0,29a	35,48±0,46d

<sup>1</sup>letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas para p≤0,05

Da análise da tabela, em geral, verificamos que há diferenças significativas, para todos os parâmetros, para p≤0,05.

Relativamente às cinzas, os valores obtidos situaram-se entre 3,81 e 6,5% para as amostras VIII e PI, respectivamente. Estes valores são superiores aos estipulados na Tabela de Composição dos Alimentos (2007) (0,8g), aos verificados por Price *et al.* (1994) (0,8 a 1,8%) em produtos cárneos e aos obtidos por Salavessa (2009), em maranhos (2,05% de média).

Os valores determinados para o pH oscilaram entre 4,52 e 6,04 para as amostras VIII e PII, respectivamente. Os valores de pH da carne crua de porco variam entre 5,6-6,0. Durante o processo de fabrico dos enchidos, este valor pode baixar para 4,5 (Prandl *et al.*, 1994). De acordo com Silva (2003) e Peres (2000), o pH dos enchidos é superior a

4,5. De acordo com Moretti *et al.* (2004), o pH, no salame, varia entre 6,25 e 6,37. Os valores reportados por estes investigadores foram superiores aos obtidos neste trabalho. Segundo Salavessa (2009), o pH, em maranhos, variou entre 5,60 e 6,48, com uma média de 5,92. O valor de pH da amostra PII (6,04) foi superior a 6,0, o que poderá facilitar a multiplicação de microrganismos e posterior deterioração.

O valor mínimo obtido para a  $a_w$  foi de 0,81 para a amostra PI e o valor máximo de 0,95 para a amostra MI. Segundo Peres (2000) e Silva (2003) os produtos de salsicharia tradicional portuguesa apresentam uma  $a_w$  intermédia ( $0,60 < a_w < 0,90$ ). Os valores obtidos por Moretti *et al.* (2004) em salame variaram entre 0,81 e 0,83, sendo inferiores aos valores quantificados neste trabalho. De acordo com Salavessa (2009), os valores, em maranhos, para este parâmetro estão compreendidos entre 0,926 e 0,989, com uma média de 0,945. A  $a_w$  obtida nas amostras PIII e MI encontra-se acima do valor de referência, sugerindo que estas amostras são susceptíveis a deteriorações. Teoricamente, os valores obtidos nestas amostras são suficientemente baixos para impedir o desenvolvimento de *Campylobacter* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium perfringens* e das estirpes psicotróficas de *Clostridium botulinum* tipo B e E, mas suficientemente altos para permitir o desenvolvimento de outros microrganismos saprófitas e patogénicos (Leistner & Gould, 2002).

A humidade mínima foi observada na amostra CI (1,37%), correspondendo o valor máximo à amostra MII (3,58%). Os valores determinados neste trabalho estão de acordo com a norma NP 1614-1, que refere um valor de humidade inferior a 65%. A Tabela de Composição dos Alimentos (2007) indica um teor médio de 52,8g e uma variação entre 49,7 e 55,5g. Moretti *et al.* (2004) obteve, no salame, valores de humidade entre 26,8 e 29,8g, sendo superiores aos valores indicados neste trabalho. Os valores obtidos, em maranhos, por Salavessa (2009), compreendidos entre 47,69 e 65,06%, são superiores aos nossos resultados, sugerindo que os enchidos avaliados são pouco susceptíveis a deteriorações, pois a humidade é muito baixa.

Verificamos que, em relação ao total da gordura, o valor mínimo foi de 6,22g na amostra MI e o valor máximo foi de 47,86g para a amostra PII. A Tabela de Composição dos Alimentos (2007) estipula que o teor médio, para a gordura total, é de 32,0g, oscilando entre 19,2-45,9g. De acordo com a norma NP 1613, a gordura livre presente é inferior duas vezes e meia ao teor de proteína total. Ao compararmos estes

valores com os nossos resultados, verificamos que há valores superiores e inferiores à variação de gordura descrita na Tabela de Composição dos Alimentos (2007). No entanto, os valores obtidos neste trabalho são corroborados pelas observações de Moretti *et al.* (2004), em salame (31,0 e 33,9g). De acordo com Salavessa (2009), este parâmetro, em enchidos de maranhos, variou entre 4,92% e 20,32%.

Na tabela 6, apresentam-se os valores obtidos para os ácidos gordos.

Tabela 6 – Composição dos ácidos gordos

	Amostra de enchido						
	CI	CII	CIII	GI	GII	GIII	MI
C4	0,0±0,0b <sup>1</sup>	0,0±0,0b	0,0±0,0b	0,0±0,0b	0,05±0,0a	0,02±0,03ab	0,0±0,0b
C8	0,11±0,01a	0,1±0,0a	0,08±0,0a	0,09±0,01a	0,1±0,01a	0,09±0,0a	0,09±0,0a
C10	0,03±0,04a	0,0±0,0a	0,03±0,01a	0,06±0,01a	0,03±0,04a	0,02±0,02a	0,02±0,01a
C12	0,04±0,0b	0,04±0,0b	0,03±0,0b	0,07±0,01ab	0,05±0,0b	0,05±0,01b	0,03±0,01b
C14	0,37±0,03bcde	0,12±0,01e	0,19±0,07de	0,33±0,23cde	0,44±0,01abcd	0,45±0,0abcd	0,18±0,0de
C16	5,01±0,02g	3,51±0,04i	3,02±0,01j	6,43±0,01e	4,8±0,08g	3,95±0,02h	1,31±0,01
C16:1	0,76±0,02de	0,56±0,01fg	0,5±0,0gh	1,1±0,01c	0,79±0,08de	0,69±0,01ef	0,26±0,02i
C18	2,49±0,06de	1,77±0,05f	1,45±0,01g	3,13±0,04c	2,41±0,06e	1,94±0,01f	0,58±0,01i
C18:1	9,93±0,18e	6,78±0,04hi	5,97±0,05j	12,98±0,08d	8,85±0,13f	7,4±0,03gh	2,57±0,14l
C18:2	2,73±0,05fg	2,1±0,01hi	1,86±0,02i	3,99±0,01ef	2,94±0,14e	3,12±0,04c	0,5±0,01j
C18:3	0,25±0,03abc	0,14±0,04cde	0,1±0,01def	0,3±0,06ab	0,22±0,01bcd	0,22±0,01bcde	0,0±0,0f
C20	0,03±0,04a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
C20:1	0,23±0,04cde	0,13±0,02def	0,09±0,01ef	0,27±0,1cd	0,15±0,04cdef	0,15±0,02def	0,0±0,0f
C20:4	0,12±0,01b	0,1±0,04b	0,12±0,01b	0,15±0,05ab	0,13±0,01b	0,11±0,01b	0,06±0,08b
C22	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,02±0,02a
AGS	8,47±0,0f	5,81±0,09h	5,03±0,11i	10,58±0,18d	8,28±0,12f	6,84±0,05g	2,34±0,01k
AGMIS	11,41±0,13f	7,81±0,04ij	6,85±0,06k	14,99±0,02e	10,23±0,27g	8,61±0,01hi	2,95±0,0m
AGPIS	3,24±0,06efg	2,45±0,06hi	2,15±0,04i	4,63±0,13c	3,44±0,16e	3,59±0,04e	0,58±0,09j

<sup>1</sup>letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas para  $p \leq 0,05$

Tabela 6 – Composição dos ácidos gordos (continuação)

	Amostra de enchido							
	MII	MIII	PI	PII	PIII	VI	VII	VIII
C4	0,0±0,0b <sup>1</sup>	0,0±0,0b	0,03±0,04ab	0,0±0,0b	0,0±0,0b	0,05±0,01ab	0,0±0,0b	0,0±0,0b
C8	0,11±0,01a	0,12±0,01a	0,13±0,03a	0,13±0,04a	0,1±0,01a	0,12±0,01a	0,11±0,01a	0,09±0,0a
C10	0,05±0,03a	0,05±0,01a	0,07±0,04a	0,06±0,08a	0,03±0,04a	0,04±0,06a	0,09±0,04a	0,0±0,0a
C12	0,06±0,01b	0,06±0,01b	0,05±0,0b	0,15±0,06a	0,12±0,01ab	0,06±0,02b	0,1±0,05ab	0,06±0,01ab
C14	0,12±0,04e	0,19±0,01de	0,55±0,1abc	0,67±0,01ab	0,62±0,02abc	0,37±0,08bcde	0,67±0,04a	0,6±0,01abc
C16	2,38±0,04k	3,09±0,01j	5,48±0,08f	10,26±0,08a	8,6±0,03c	4,14±0,06h	8,94±0,16b	7,7±0,1d
C16:1	0,4±0,0h	0,51±0,04gh	0,89±0,01d	1,76±0,03a	1,42±0,04b	0,7±0,01ef	1,54±0,06b	1,19±0,43c
C18	1,08±0,06h	1,41±0,0g	2,71±0,05d	4,23±0,04a	3,98±0,08b	1,88±0,01f	3,91±0,15b	4,03±0,1ab
C18:1	4,55±0,05k	6,61±0,78ij	10,43±0,06e	21,54±0,35a	16,7±0,42c	7,82±0,17g	18,21±0,52b	13,64±0,18d
C18:2	1,96±0,11i	2,42±0,02gh	3,5±0,05d	2,98±0,01ef	2,46±0,05g	2,89±0,13ef	5,03±0,2a	4,54±0,06b
C18:3	0,08±0,01ef	0,14±0,01cde	0,31±0,01ab	0,24±0,06bc	0,2±0,05bcde	0,14±0,01cde	0,38±0,06a	0,32±0,02ab
C20	0,01±0,01a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,04±0,05a	0,0±0,0a	0,05±0,02a	0,0±0,0a	0,07±0,0a
C20:1	0,05±0,0f	0,12±0,01def	0,25±0,06cd	0,5±0,01a	0,31±0,07bc	0,25±0,02cde	0,47±0,04ab	0,48±0,01a
C20:4	0,14±0,05b	0,16±0,01ab	0,13±0,02b	0,27±0,01a	0,11±0,01b	0,13±0,01b	0,19±0,02ab	0,14±0,04b
C22	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
AGS	3,99±0,08j	5,14±0,01i	9,45±0,16e	16,29±0,12a	14,09±0,03b	7,02±0,15g	14,49±0,16b	13,15±0,21c
AGMIS	5,22±0,06l	7,57±0,06jk	12,09±0,01f	24,88±0,35a	19,26±0,07c	9,16±0,17h	21,13±0,66b	16,00±0,23d
AGPIS	2,27±0,06i	2,84±0,04gh	4,11±0,01d	3,64±0,1e	2,89±0,12fg	3,3±0,13ef	5,85±0,25a	5,21±0,08b

<sup>1</sup>letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas para  $p \leq 0,05$

C4 - Butírico; C8 – Caprílico; C10 – Cáprico; C12 – Láurico; C14 – Mirístico; C16 – Palmítico; C16:1 – Palmitoleico; C18 – Esteárico; C18:1 – Oleico; C18:2 – Linoleico; C18:3 – Linolénico; C20 – Araquídico; C20:1 – Cetoleico; C20:4 – Araquidónico; C22 – Beénico; AGS – Ácidos Gordos Saturados; AGMIS – Ácidos Gordos Monoinsaturados; AGPIS – Ácidos Gordos Polinsaturados

Da análise da tabela, verifica-se que, em geral, há diferenças significativas entre os ácidos gordos presentes nas várias amostras para  $p \leq 0,05$ . O C8, C10, C20 e C22 não diferiram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras e no C14, C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2, C18:3 e C20:1 as diferenças foram altamente significativas.

Os valores obtidos para os ácidos gordos foram: C4 entre 0,0g e 0,05g (amostras GII e VI), C8 entre 0,08g (amostra CIII) e 0,13g (amostra PII), C10 entre 0,0g (amostras VIII e CII) e 0,09g (amostra VII), C12 entre 0,03g (amostras CIII e MI) e 0,15g (amostra PII), C14 entre 0,67g (amostras PII e VII) e 0,1g (amostras CII e MIII), C16 entre 10,26g (amostra PII) e 1,31g (amostra MI), C16:1 entre 0,26g (amostra MI) e 1,76g (amostra PII), C18 entre 0,58g (amostra MI) e 4,23g (amostra PII), C18:1 entre 21,54g (amostra PII) e 2,57g (amostra MI), C18:2 entre 0,5g (amostra MI) e 5,03g (amostra VII), C18:3 entre 0,0g (amostra MI) e 0,38g (amostra VII), C20 entre 0,0g e 0,07g (amostra VIII), C20:1 entre 0,48g (amostra VIII) e 0,0g (amostra MI), C20:4 entre 0,27g (amostra PII) e 0,06g (amostra MI) e C22 entre 0,0g e 0,02g (amostra MI).

Os nossos valores foram inferiores aos referenciados por Moretti *et al.* (2004) em salame e corroborados pelas observações de Forrest *et al.* (1979). Segundo o último investigador, a gordura total tem vestígios de C12, 1,3% de C14, 28,3% de C16, 2,7% de C16:1, 11,9% de C18, 47,5% de C18:1, 0,2% de C18:2 e 6,0% de C18:3. De acordo com Moretti *et al.* (2004) a gordura total tem entre 1,31 e 1,45% de C14, 23,48 e 24,55% de C16, 1,65 e 2,93% de C16:1, 10,53 e 14,53% de C18, 2,83 e 47,56% de C18:1, 6,06 e 13,34% de C18:2, 0,68 e 0,93% de C18:3, 0,92 e 0,94% de C20:1 e 0,34 e 0,41% de C20:4.

Relativamente aos ácidos gordos saturados, os valores variaram entre 2,34 e 16,29g para as amostras MI e PII, respectivamente. De acordo com a Tabela de Composição dos Alimentos (2007), os ácidos gordos totais contêm, por 100g, 11,7g de saturados. Os resultados observados no nosso trabalho estão de acordo com o estipulado pela Tabela de Composição dos Alimentos (2007) e foram superiores aos determinados por Moretti *et al.* (2004) em salame (36,49 e 39,33g).

Em relação aos ácidos gordos monoinsaturados, o valor mínimo (2,95g) observou-se na amostra MI, correspondendo o valor máximo (24,88g) à amostra PII. A Tabela de Composição dos Alimentos (2007) determina um valor médio para estes ácidos monoinsaturados de 13,5g, por cada 100g de ácidos gordos totais. Os valores

quantificados neste trabalho situam-se dentro dos valores referidos na Tabela de Composição dos Alimentos (2007) e foram inferiores aos obtidos por Moretti *et al.* (2004) em salame, que estavam compreendidos entre 44,27 e 55,64%.

Relativamente aos polinsaturados, o valor mínimo de 0,58g correspondeu à amostra MI e o valor máximo de 5,85g à amostra VII. A Tabela de Composição dos Alimentos (2007) indica o valor de 3,58g para os polinsaturados presentes em 100g de ácidos gordos totais. Analisando a tabela 6, verificamos que os valores obtidos para os ácidos gordos polinsaturados se encontram dentro dos limites estipulados. De acordo com Moretti *et al.* (2004) em salame, observaram-se valores que oscilaram entre 7,78 e 16,09%.

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No âmbito do presente trabalho de dissertação, foram desenvolvidos estudos tendo como objectivo a caracterização e avaliação das características físico-químicas, nutricionais e segurança microbiológica dos enchidos tradicionais portugueses.

Uma parte do trabalho incidiu no estudo da qualidade microbiológica de enchidos portugueses. A outra parte do trabalho incluiu estudos sobre a qualidade físico-química e nutricional.

Os resultados obtidos permitem-nos tecer as seguintes considerações finais:

- Os enchidos analisados diferiram a nível nutricional, físico-químico e microbiológico.
- Nenhuma amostra excedeu os limites estipulados pela legislação portuguesa, para os aeróbios mesófilos.
- As amostras CI, MI, PI, PIII, VI e VII excederam os limites para a contagem de bolores e leveduras.
- A amostra PII excedeu o limite microbiológico estipulado pela legislação, no que diz respeito à contagem de *E. coli*.
- Verificou-se uma correlação positiva entre a  $a_w$  e os microrganismos psicrófilos, coliformes e bolores e leveduras.
- Verificou-se uma correlação negativa altamente significativa entre o pH, os psicrófilos e bolores e leveduras. A correlação entre o pH e a *E. coli* foi positiva e altamente significativa.
- O teor de cinzas foi elevado e superior aos valores referenciados na Tabela de Composição dos Alimentos.
- O pH variou entre 4,52 e 6,04. Este último pode significar um elevado crescimento de microrganismos e posterior deterioração do enchido.
- A actividade da água variou entre 0,81 e 0,95. O valor obtido para as amostras MI e PIII foi superior a 0,90, sugerindo uma maior disponibilidade de água para o crescimento microbiano e posterior deterioração do enchido.
- O teor de humidade, em todas as amostras, está de acordo com limite estipulado pela norma NP 1614 (inferior a 65%).
- O teor de ácidos gordos totais variou entre 6,22 e 47,86g.

Estes resultados indicam que, pelas suas características nutricionais, os produtos estudados têm alta qualidade. É importante, para este tipo de produtos, que não haja alterações na qualidade nutricional e físico-química e posterior crescimento microbiano e deterioração do produto.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn, D. & Min, B. (2007). Packaging and storage. In: Toldrá, F, Hui, Y., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J., Silveira, E., Stahnke, L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Blackwell Publishing. Oxford

Almeida, I. F. M. (2009). Caracterização Preliminar do Microbiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa

Almeida, V. (2008). *Salmonella* – State of the art. In: Handouts of *Salmonella* – Surveillance & Control, Concepts and Examples. Faculdade de Medicina Veterinária / Universidade Técnica de Lisboa - Faculty of Life Sciences / University of Copenhagen. Lisbon. Portugal

Ambrosini, V., Gusils, C., Gonzalez, S. & Oliver, G. (2000). Classification of bacteria – traditional. In: Robinson, R., Batt, C. & Patel, P. Encyclopedia of food microbiology. Bath: Academic Press

Amorim, V. (2006). Certificação de Produtos ou Serviços, Revista Segurança e Qualidade Alimentar. Ano I, Nº 1

Anderson, M.<sup>a</sup> Del R. P. e Pascual, V. C. (2000). Microbiología Alimentaria – Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª Edición. Díaz de Santos, S.A. Editora. Madrid

Andrés, A, Barat, J., Grau, R. & Fito, P. (2007). Principles of drying and smoking. In: Toldrá, F, Hui, Y., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J., Silveira, E., Stahnke, L. & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing

ASAE – Autoridade da Segurança Alimentar e Económica (2009)

Baptista, P. e Venâncio, A. (2003). Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. 1ª Edição. Forvisão – Consultoria em formação integrada, Lda. (edição). Guimarães, Portugal

Beloeil, P. A., Fravallo, P., Chauvin, C., Fablet, C., Salvat, G. & Madec, F. (2003). *Listeria* spp. Contaminations in Piggeries: Comparison of Three Sites of Environmental Swabbing for Detection and Risk Factor Hypothesis. Journal Veterinary Medicine

- Blaschek, H. (2000). *Clostridium* – Introduction. In: Robinson, R., Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Bath: Academic Press
- Bottone, E. J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microbes and Infection
- Candlish, A., Pearson, S., Aidoo, K., Smith, J., Kelly, B. & Irvine, H. (2001) - A survey of ethnic foods for microbial quality and aflatoxin content. Food Additives and Contaminants. Volume 18
- Cantoni, C., Cattaneo, P. e Perlasca, M. (1977). Sulla classificazione dei prodotti di salumeria proposta dalla CEE. Retirado da Industrie Alimentari
- Cheftel, J. C. (1976). Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos. Acribia (eds)
- Chu, Y. & Hwang, L. P. (2002). Food lipids. In: Zdzisław, E. & Sikorski, E. - Chemical and functional properties of food components. Chemical and functional properties of food components series. 2<sup>a</sup> Ed. Gdansk University of Technology, Poland: CRC Press
- Clavero, M. R. & Beuchat, L. R. (1996). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. Applied and Environmental Microbiology
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. Meat Science. Volume 78
- Conner, D.E. & Kotrola, J. S. (1995). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. Applied and Environmental Microbiology
- Corredig, M. (2006). Protein – interactions in food. In: Gaonkar, A. & McPherson, A. – Ingredient interactions - Effects on food quality. Second Edition. Boca Raton: Taylor & Francis
- Cox, J. (2000). *Salmonella* – Introduction. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Bath: Academic Press

Cruz, F., Rodrigues, N., Melo, S. e Ferreira, S. (2007). Processo de certificação de produtos tradicionais: DOP, IGP e ETG. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Coimbra

Culbertson, J. (2006). Food Protein Functionality. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Boca Raton: Taylor & Francis

Doyle, M. P., Zhao, T., Meng, J. & Zhao, S. (1997). *Escherichia coli* O157:H7. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers, ed. Doyle M. P., L. R. Beuchat, T. J. Montville. Washington D.C.: ASM Press

Elias, M., Fraqueza, M.J. e Barreto, A. (2006). Caracterização do processo de fabrico do chouriço tradicional alentejano, Revista Portuguesa de Zootecnia, vol. 13

EN ISO 6887-1:1999 – Preparação da suspensão-mãe e das diluições para análise microbiológica, International Organization for Standardization (ISO), Suíça

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

Feiner, G. (2006). Raw fermented salami Meat products handbook. In: Feiner, G. Meat products Handbook Practical Science and Technologic. Reino Unido: Woodhead Publishing Limited

Fernandes, M. L. M. (1985). Contribuição para o estudo de caracterização do salpicão do Planalto Mirandês. Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro

Flores, M. & Toldrá, F. (1999). The effect of pork meat quality on its sensory perception

Forrest, J. C., Aberle, E. D., Hedrick, H. B., Judge, M. D. e Merkel, R. A. (1979). Fundamentos de ciencia de la carne. Acribia. Zaragoza

Forsythe, S. J. (2002). Microbiologia da Segurança Alimentar. Artmed Editora. Porto Alegre

Franco, B. D. G. M & Landgraf, M. (2005) Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu

Fraqueza, M. J. (2003). La Charcuterie Traditionelle Portugaise. Les Salaisons Portugaise. Compte-rendu du 7<sup>ème</sup> rencontres agroalimentaires du grand rodez “Les Salaisons du sud de L’Europe”. Rodez., France

Fraqueza, M. J. e Patarata, L. (2006). Recomendações Práticas de Higiene para enchidos tradicionais fermentados e secos. Guia Prático de aulas. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária

Freitas, A. C. e Figueiredo, P. (2000). Conservação de alimentos. Lisboa

FSIS - Food Safety Inspection Service - Safe Practices for Sausage Production (Course Manual) (1999). U. S. Department of Agriculture (USDA)

Gorski, L., Palumbo, J. D. & Mandrell, R. E. (2003). Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. Applied and Environmental Microbiology

Guerrero, I. & Chabela, L. (2000). Meat and Poultry. Spoilage of cooked meats and meat products. Problems caused by bacteria. In: Robinson, R., Batt, C. & Patel, P. Encyclopedia of food microbiology. Bath: Academic Press

Harvey, J. & Gilmour, A. (2000). *Staphylococcus aureus*. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Bath: Academic Press

Howel, N. (2006). Interactions of proteins with selected small molecules. In: Gaonkar, A. & McPherson, A. Ingredient interactions - Effects on food quality. Second Edition. Boca Raton: Taylor & Francis

Incze, K. (1998). Dry fermented Sausages. Meat Sci. 49 S169-S177

Instituto Adolfo Lutz, Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4<sup>a</sup> edição, 1<sup>a</sup> Edição Electrónica, São Paulo

ISO 15213:2003

Kramlich, W. E. (1976). Embutidos. Ciência de la Carne y de los productos cárnicos. Ed. J. F. Price e Schweigert, Acribia. Zaragoza, España

Lawrie, R. A. (1998). *Ciencia de la carne*. 6ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España

Leistner, L. & Gould, G. (2002). *Hurdle technologies – Combination treatments for food stability, safety and quality*. Food engineering series. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers

Martins, C. (1984). *Salsicharia Tradicional: perspectivas futuras*. Indústria Alimentar

Maule, A. (2000). Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Journal of Applied Microbiology*

Método Oficial AOAC 2005.03

Método Oficial AOAC 989.13

Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Pescas, 2007

Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Pescas, 2005

Moretti, V. M., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M. A., Panseri, S., Pirone, G. & Gandini, G. (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Science*, volume 66

Moss, M. (2000) - Spoilage problems. Problems caused by Fungi. In: Robinson, R., Batt, C. & Patel, P. *Encyclopedia of food microbiology*. Bath: Academic Press

Mossel, D., Corry, J., Struijk, C. & Baird, R. (1995). *Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies*. England: John Wiley and Sons Ltd

Nawar, W. (1998). Biochemical processes: Lipid instability. In: Taub, I. A. & Singh, R. P. *Food storage stability*. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press

NP 1613 – Carnes, derivados e produtos cárneos – Determinação da matéria gorda total – Método de referência

NP 1614-1 – Carnes, derivados e produtos cárneos – Determinação da humidade – Processo de referência

NP-1828:1982 – Microbiologia Alimentar – Colheita da amostra para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal

NP-1829:1982 – Microbiologia Alimentar – Preparação da amostra para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal

NP-2079:1989 – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para análise microbiológica. IPQ, Portugal

NP-2307:1987 – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para contagem de microrganismos psicotróficos. IPQ, Portugal

NP-3005:1985 – Microbiologia Alimentar – Preparação de diluições para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal

NP-3788:2002 – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para contagem de microrganismos a 30°C. IPQ, Portugal

NP 4400-1:2002 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de *Estafilococos* coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Parte 1: Técnica com confirmação de colónias (método corrente). IPQ, Portugal

Ordóñez, J. & Hoz, L. (2007). Mediterranean products. In: Toldrá, F., Hui, Y., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J., Silveira, E., Stahnke L. & Talon, R. Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing

Oteiza, J., Chinen, I., Miliwebsky, E. & Rivas, M. (2006). Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). Food Microbiology. Volume 23

Patarata, L., Saraiva, G. e Martins, C. (1998). Processos de fabrico de produtos de salsicharia tradicional. I <sup>as</sup> Jornadas de Queijos e Enchidos - Produtos Tradicionais

Peck, M. & Stringer, S. (2005). The safety of pasteurized in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. Meat Science. Volume 70

Peres, F. (2000). Tecnologia dos produtos cárneos – Aulas práticas. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco

Prandl, O., Fischer, A., Shmidhfer, T. e Sinell, H. (1994). Tecnologia e higiene de la carne. Acribia, Zaragoza, España

Price, J. F. e Schweigert, B. S. (1994). Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Acribia. Zaragoza, España

Regulamento (CE) nº 853/2004, de 29 de Abril, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal

Regulamento (CE) nº 1441/2007, de 5 de Dezembro, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios

Reinoso, E., El-Sayed, A., Lämmler, C., Bogni, C. & Zschöck, M. (2008). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. Microbiological Research. Volume 163

Richards, M. (2006). Lipid chemistry and biochemistry. In: Hui, Y. Handbook of food science technology and engineering. Boca Raton: Taylor & Francis

Rocourt, J. (1994). *Listeria monocytogenes*: The state of the science. Dairy Food and Environmental Sanitation

Ross, T. & Nichols, D. (2000). Ecology of bacteria and fungi in foods. Influence of temperature. In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. Encyclopedia of food microbiology. Bath: Academic Press

Sablani, S., Kasapis, S. & Rahman, M. (2007). Evaluating water activity and glass transition concepts for food stability. Journal of Food Engineering. Volume 78

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

Santos, M., Zaritzky, N. & Califano, A. (2008). Modeling heat transfer and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in precooked meat products in Argentina using the finite element method. Meat Science. Volume 79

Silva, J.A. (2000). Tópicos da tecnologia de alimentos. São Paulo: Varela

- Silva, M. V. (2003). Segurança alimentar de produtos cárneos tradicionais, enchidos e produtos curados. Porto: AESBUC/UCP
- Simela, L. & Merkel, R. (2008). The contribution of chevon from Africa to global meat production. *Meat Science*. Volume 80
- Soeiro, Ana (2006). Produtos Qualificados, produtos antigos e respostas modernas. *Revista Segurança e Qualidade Alimentar*. Ano I, Nº1
- Sousa, M.C., Ribeiro, A. (1997). Chouriço de Carne Português: tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica. *Revista Alimentar*, 1
- Tabela de Composição dos Alimentos (2007), Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge (INSA)
- Urbain, W. M. (1976). Conservación de la carne. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Ed J. F. Price e Schwegert, Acribia, Zaragoza, España
- Varnam, A. & Sutherland, J. (1995). *Meat and meat products. Technology, chemistry and microbiology*. Food Products Series. Chapman & Hall. London
- Vasilopoulos, C., Ravyts, F., de Maere, H., de Mey, E., Paelinck, H., de Vuyst, L. & Leroy, F. (2008). Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *J. of Appl. Microbiol.*, 104:5
- Vieira-Pinto, M. (2008). *Salmonella* in slaughter pigs – Food safety perspectives. In: Handouts of *Salmonella* - Surveillance & Control, Concepts and Examples. Faculdade de Medicina Veterinária / Universidade Técnica de Lisboa - Faculty of Life Sciences / University of Copenhagen. Lisbon. Portugal
- Zaia, D. A. M., Zaia, C. T. B. V. e Lichtig, J. (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, 21
- Zanetti, F., Varoli, O., Stampi, S. & De Luca, G. (1996). Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*

***ANEXOS***

## ANEXO I

### Meios de cultura utilizados na análise microbiológica do enchido

- **Meio PCA (Plate Count Agar)**

PCA ----- 22,5 g

Água destilada ----- 1 L

Dissolver num litro de água 22,5 g de PCA. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir cerca de 10 ml de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

- **Meio PDA (Potato Dextrose Agar)**

PDA ----- 39 g

Água destilada ----- 1 L

Dissolver num litro de água 39 g de PDA. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Adicionar 1 ml de ácido tartárico por cada 100 ml de meio. Distribuir cerca de 10 ml de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

#### Ácido Tartárico (10%)

Dissolver 10 g de ácido tartárico em 100 ml de água estéril.

- **Meio BP (Baird Parker)**

BP ----- 63 g

Água destilada ----- 950 ml

Dissolver em 950 ml de água 63 g de BP. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Adicionar gema de ovo ao meio. Distribuir cerca de 10 ml de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

#### Gema de ovo

Adicionar 50 ml de gema de ovo a 950 ml de meio.

- **BHI (Brain Heart Infusion)**

BHI ----- 37g

Água destilada ----- 1 L

Dissolver num litro de água 37 g de BHI. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir cerca de 5 ml de meio por cada tubo, esterilizados previamente.

- **Plasma de coelho**

Dissolver um tubinho de plasma de coelho com 6 ml de água estéril.

- **Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores**

RCA ----- 51g

Água destilada ----- 1 L

Dissolver num litro de água 51 g de RCA. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Adicionar 0,5 ml de sulfito de sódio e de citrato de ferro por cada litro de meio. Distribuir cerca de 3 vezes o volume de amostra por cada tubo de ensaio.

Sulfito de sódio

Adicionar 4 g de sulfito de sódio por cada 100 ml de água estéril. Homogeneizar.

Citrato de ferro

Adicionar 7 g de citrato de ferro por cada 100 ml de água estéril. Homogeneizar no agitador.

- **Solução de Tetrionato**

Tetrionato ----- 4,6g

Água destilada ----- 100 ml

Dissolver 4,6 g de tetrionato em 100 ml de água destilada e levar a ferver. Deixar arrefecer e adicionar iodo – iodeto ao meio.

### Iodo – iodeto

Adicionar a 100 ml de água destilada 2 ml de iodina. Dissolver 6 g de iodina e 5 g de iodeto de potássio a 20 ml de água. Juntar todos os reagentes obtidos e dissolvê-los.