



CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA
DE ALHEIRAS PRODUZIDAS ARTESANALMENTE NA
TERRA FRIA TRANSMONTANA

ODETE LINDA ARMANDO ZEFANIAS

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

Orientado por:

Professor Doutor Augusto Pilão Vasco Cadavez

Doutora Úrsula Gonzales-Barrón

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Bragança, 2020

*Dedico este trabalho a minha avó Tereza Tinga
Nhanombe “em memória”.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida e de poder estar aqui para desfrutar deste momento ímpar na minha vida.

Ao Instituto de Bolsas de Moçambique e ao Instituto Politécnico de Bragança que com a sua cooperação, tornaram possível a realização deste curso de mestrado.

Aos meus orientadores, Professor Vasco Cadavez e Dra. Úrsula Gonzales-Barrón, líderes do Grupo de Investigação *Food Safety and Quality Analytics*, pelo acompanhamento e ensinamentos que me foram proporcionados durante o desenvolvimento desta tese.

A minha família pelo apoio incondicional que embora à distância conseguiram transmitir e em especial ao meu companheiro de vida Mário Mahundla pelo apoio e confiança e acima de tudo por acreditar em mim.

A todos que directa ou indirectamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO) por fornecer o laboratório e os equipamentos necessários para que este trabalho pudesse ser realizado.

Este trabalho teve o apoio do Programa PRIMA da União Europeia e da Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do projeto “Innovative Bio-Interventions and Risk Modelling Approaches for Ensuring Microbial Safety and Quality of Mediterranean Artisanal Fermented Foods” (PRIMA/0001/2018).

A todos o meu muito obrigado!

RESUMO

A alheira é um enchido tradicional que está ligado à cultura e aos costumes das populações da região de Trás-os-Montes, cujos registos de fabrico remontam ao século XV. Atualmente, a produção de alheiras assume um papel importante na economia regional e nacional, pelo que é muito importante estudar e caracterizar as propriedades físico-químicas e microbiológicas para assegurar a qualidade das alheiras tradicionais. Deste modo, este trabalho teve dois objectivos principais: (i) estudar as características físico-químicas e microbiológicas ao longo do processo de fabrico de alheiras produzidas na região de Trás-os-Montes; e (ii) definir um mapa de qualidade, tendo em consideração as características físico-químicas e microbiológicas das alheiras produzidas de forma artesanal.

Para alcançar o objetivo 1 (Estudo 1), foram colhidas amostras, constituídas por cinco alheiras em três pontos de amostragem, em três lotes da cozinha de VINHAIS e em dois lotes da cozinha de BRAGANÇA. Os três pontos de amostragem foram efetuados no dia do enchimento, no meio do processo de maturação e no fim do processo de maturação, portanto as alheiras estavam prontas para a venda.

Para o objetivo 2 (Estudo 2), foi delineado um trabalho de amostragem de alheiras artesanais produzidas e comercializadas na região de Trás-os-Montes. Assim, foram adquiridas cinco alheiras de quinze produtores regionais, todavia apenas são apresentados os resultados de seis produtores, uma vez que a pandemia COVID-19 nos impediu de concluir as análises físico-químicas e microbiológicas em tempo útil para a conclusão desta dissertação.

Os resultados do Estudo 1 revelaram que as alheiras do produtor de BRAGANÇA apresentaram maior ($p < 0,05$) a_w (0,991 versus 0,985) e teor humidade (51,9 versus 48,9%) e menor ($p < 0,05$) pH (5,42 versus 5,54) que as alheiras do produtor de VINHAIS. Como esperado, ao longo do processo de maturação observou-se uma diminuição ($p < 0,05$) destes parâmetros, pelo que os valores mínimos foram obtidos nas alheiras prontas para comercialização. Já na composição proximal, as alheiras do produtor de BRAGANÇA

apresentaram maiores ($p < 0,05$) teores de proteína bruta (9,82 versus 9,40%) e de cinzas (1,47 versus 1,40%) que as alheiras do produtor de VINHAIS. Já o teor de gordura bruta não diferiu ($p > 0,05$) entre produtores (22,7 versus 22,5%) e as alheiras do produtor de VINHAIS apresentaram maior ($p < 0,05$) teor de hidratos de carbono (14,2 versus 17,8%). Os microrganismos avaliados neste trabalho foram os mesófilos, coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. As alheiras do produtor de BRAGANÇA apresentaram contagens superiores de mesófilos (6,69 versus 5,45 log ufc/g) e de *S. aureus* (3,34 versus 2,90 log ufc/g) que as alheiras do produtor de VINHAIS. As alheiras de ambos os produtores apresentaram contagens baixas de coliformes, de *E. coli* e de *C. perfringens*. É também de salientar que foi detectada a presença de *Salmonella* em quatro alheiras das 75 analisadas. Ao longo do processo de maturação as contagens de todos os microrganismos aumentaram de forma gradual.

Os resultados do Estudo 2 evidenciaram uma elevada variação nos parâmetros físico-químicos estudados entre as alheiras dos diferentes produtores, o pH variou entre 3,39 e 4,62 e a_w entre 0,974 e 0,991. Todas as alheiras analisadas apresentaram contagem de mesófilos superior a 6,5 log ufc/g. A análise de componentes principais identificou duas componentes que explicaram 55,5% da variação nas 11 variáveis originais. Cabe destacar que os três microrganismos patogénicos analisados, *Salmonella*, *S. aureus* e *C. perfringens* estão positivamente correlacionados entre si, o que indica que as más condições de higiene e as práticas de fabrico pobres são responsáveis pelas incidências destes microrganismos patogénicos.

As alheiras artesanais apresentam elevada variabilidade nas características físico-químicas e microbiológicas. A dimensão da segurança microbiológica é essencial para a valorização destes produtos, pelo que a melhoria do processo de fabrico e o seguimento das boas práticas de higiene, em todas as etapas de elaboração, são fundamentais para garantir tanto a estabilidade microbiológica como a segurança das alheiras.

Palavras-chave: Produto cárneo, processamento, patogénicos, composição proximal, análise de componentes principais, mapa de qualidade

ABSTRACT

Alheira is a traditional sausage that is linked to the culture and customs of the people of the Trás-os-Montes Portuguese region, whose manufacturing records date back to the 15th century. Currently, the production of alheiras plays an important role in the regional and national economy, so it is very important to study and characterize the physicochemical and microbiological properties to ensure the quality of traditional alheiras. Thus, this work had two main objectives: (i) to study the physicochemical and microbiological characteristics of alheiras throughout the manufacturing process of sausages elaborated by two artisanal producers, one in BRAGANÇA and the other in VINHAIS; and (ii) to construct a quality map, taking into account the physicochemical and microbiological characteristics of artisanally produced alheiras.

In order to achieve objective 1 (Study 1), samples were taken, consisting of five sausages from three sampling points, three batches from the VINHAIS producer and two batches from the BRAGANÇA producer. The three sampling points were made on the day of stuffing, in the middle of the maturation process and at the end of the maturation process.

For objective 2 (Study 2), a sampling scheme of artisanal sausages produced and marketed in the region of Trás-os-Montes was designed. Five alheiras were acquired from fifteen regional producers, however only the results of six producers are presented in this thesis, since the pandemic COVID-19 prevented us from completing the laboratorial analyses in time for the conclusion of this dissertation.

The results of Study 1 revealed that the alheiras from the BRAGANÇA producer had a higher ($p < 0.05$) water activity (0.991 versus 0.985) and moisture content (51.9 versus 48.9%) and lower ($p < 0.05$) pH (5.42 versus 5.54) than that of VINHAIS producer. As expected, during the maturation process, a decrease ($p < 0.05$) in these parameters was observed, so that the minimum values were obtained in the sausages ready for commercialization. On the other hand, in the proximate composition, the alheiras from the producer of BRAGANÇA had higher ($p < 0.05$) contents of crude protein (9.82 versus

9.40%) and ashes (1.47 versus 1.40%) than the alheiras from the VINHAIS producer. The crude fat content did not differ ($p>0.05$) between producers (22.7 versus 22.5%) and those from VINHAIS producer had a higher ($p<0.05$) carbohydrate content (14.2 versus 17.8%). The microorganisms evaluated in this work were mesophiles, coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Salmonella* spp. The alheiras from the producer of BRAGANÇA showed higher counts of mesophiles (6.69 versus 5.45 log ufc/g) and *S. aureus* (3.34 versus 2.90 log ufc/g) than those of the producer of VINHAIS. The sausages from both producers showed low counts of coliforms, *E. coli* and *C. perfringens*. It should also be noted that *Salmonella* was detected in four out of the 75 analyzed. Throughout the maturation process, the counts of all microorganisms increased gradually.

The results of Study 2 evidenced a high variation in the physicochemical parameters studied among the sausages of the different producers, the pH varied between 3.39 and 4.62 and water activity between 0.974 and 0.991. All of the analyzed sausages had mesophiles counts above 6.5 log cfu/g. The principal component analysis identified two components that explained 55.5% of the variation in the 11 original variables. It should be noted that the three pathogenic microorganisms analyzed, *Salmonella*, *S. aureus* and *C. perfringens* were positively correlated with each other, which indicates that poor hygiene conditions and poor manufacturing practices are responsible for the incidence of these pathogenic microorganisms.

Artisanally produced alheiras have high variability in physicochemical and microbiological characteristics, which can negatively impact their level of stability and safety. For the valorization of these typical products, appropriate standards of manufacturing process and good hygiene practices should be followed at all stages of production by artisanal producers.

Keywords: Meat product, processing, pathogens, proximate composition, principal component analysis, quality map

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. A Alheira: Origem e Características	4
2.2. Importância Económica da Alheira e Outros Enchidos para a Região	5
2.3. Regimes de Qualidade e Certificação dos Produtos Tradicionais	6
2.3.1. Importância da certificação de produtos tradicionais	7
2.3.2. Alheiras certificadas	8
2.4. Enquadramento Legal na Produção de Alheira	10
2.4.1. Obrigação dos operadores em relação às boas práticas de higiene	10
2.4.2. Obrigação dos operadores em relação aos critérios microbiológicos.....	11
2.5. Características Físico-Químicas e Valor Nutricional da Alheira	12
2.6. O Fabrico da Alheira.....	12
2.6.1. Ingredientes essenciais na elaboração das alheiras.....	13
2.6.2. Condimentos essenciais na elaboração das alheiras	14
2.6.3. Processo de produção.....	15
2.7. Fatores que Influenciam na Estabilidade das Alheiras	19

2.7.1.	Atividade da água (aw)	20
2.7.2.	pH	21
2.7.3.	Temperatura de conservação	22
2.8.	Microbiologia Associada à Produção de Alheiras	22
2.8.1.	Bactérias mesófilas	23
2.8.2.	Coliformes totais e fecais	24
2.8.3.	Escherichia coli	24
2.8.4.	Staphylococcus aureus	25
2.8.5.	Salmonella spp.....	26
2.8.6.	Clostridium perfringens	27
3.	METODOLOGIA	29
3.1.	Amostragem das Alheiras	29
3.1.1.	Estudo 1: Características ao longo do processo do fabrico.....	29
3.1.2.	Estudo 2: Mapa de qualidade composicional e microbiológica	30
3.2.	Análises Microbiológicas	31
3.2.1.	Preparação da amostra	31
3.2.2.	Contagem total de aeróbios mesófilos	31
3.2.3.	Contagem de coliformes totais e Escherichia coli.....	32
3.2.4.	Pesquisa de Salmonella spp.....	32
3.2.5.	Contagem de Staphylococcus aureus.....	33
3.2.6.	Contagem de Clostridium perfringens	34
3.3.	Análises Físico-Químicas.....	35
3.3.1.	Preparação da amostra	35
3.3.2.	Determinação do pH.....	36

3.3.3.	Determinação da atividade de água (a_w)	36
3.3.4.	Determinação do teor de humidade da alheira	37
3.3.5.	Determinação da matéria seca da alheira liofilizada	37
3.3.6.	Determinação do teor de cinzas	38
3.3.7.	Determinação do teor de gordura bruta	38
3.3.8.	Determinação do teor de proteína bruta.....	39
3.4.	Análise Estatística dos Dados.....	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1.	Evolução das Propriedades Intrínsecas das Alheiras Artesanais ao Longo do Processo de Fabrico	42
4.2.	Variabilidade da composição proximal das alheiras ao longo do processo de fabrico.....	46
4.3.	Qualidade microbiológica dos insumos e das alheiras artesanais ao longo do processo de fabrico.....	50
5.	MAPA DE QUALIDADE COMPOSICIONAL E MICROBIOLÓGICA DE ALHEIRAS COMERCIALIZADAS EM TRÁS-OS-MONTES.....	60
6.	CONCLUSÕES	69
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Evolução da produção de produtos de transformação cárnea e dos enchidos em Portugal, no período 2000 a 2017.	5
Figura 2.2: Símbolos de Denominação de Origem Protegida (DOP) e de Indicação Geográfica Protegida (IGP) utilizados em produtos cárneos tradicionais de Portugal.....	7
Figura 2.3: Diagrama do processo de produção das alheiras	16
Figura 3.1: Exemplo de colónias típicas de microrganismos mesófilos em Ágar Plate Count.	32
Figura 3.2: Exemplo de colónias típicas de <i>S. aureus</i> com halo que desenvolveram em ágar BP.	33
Figura 3.3: Exemplo das colónias típicas de <i>Clostridium perfringens</i>	34
Figura 3.4: Esquema da preparação das amostras para análises físico-químicas.....	35
Figura 4.1: Evolução do pH das alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais.	44
Figura 4.2: Evolução da atividade da água das alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais.	45
Figura 4.3: Evolução da humidade das alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais.	47
Figura 4.4: Evolução das contagens de mesófilos totais nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais.	54
Figura 4.5: Evolução das contagens de coliformes totais nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais.	55
Figura 4.6: Evolução das contagens de <i>E. coli</i> nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais.	56
Figura 4.7: Evolução das contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais.	57

Figura 4.8: Evolução das contagens de <i>Clostridium perfringens</i> nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais.	58
Figura 5.1: Mapa bi-dimensional das características composicionais e microbiológicas das alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes.	65
Figura 5.2: Mapa da qualidade composicional e microbiológica das alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes.	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Características e especificações das alheiras certificadas com regime IGP	9
Tabela 2.2: Critérios microbiológicos que se aplicam na produção de alheiras	11
Tabela 2.3: Características físico-químicas das alheiras avaliadas em diferentes estudos....	13
Tabela 2.4: Classificação de Alimentos e medidas de controlo com base na atividade da água.....	20
Tabela 2.5: Tipos de microrganismos em função à temperatura de crescimento.....	22
Tabela 3.1: Descrição da amostragem das alheiras nas Cozinhas de Vinhais e de Bragança	30
Tabela 3.2: Descrição das amostras de alheiras recolhidas nos mercados locais.....	31
Tabela 4.1: Propriedades intrínsecas (pH, atividade da água a_w e humidade) das alheiras elaboradas em produtores artesanais de Bragança e Vinhais, por produtor e por etapa do processo dentro de cada produtor.	42
Tabela 4.2: Análise proximal em base húmida (% bh) e base seca (% bs) das alheiras elaboradas em produtores artesanais de Bragança e Vinhais, por produtor e por etapa do processo dentro de cada produtor.	48
Tabela 4.3: Qualidade microbiológica de alguns insumos utilizados na elaboração das alheiras por produtor artesanal.	50
Tabela 4.4: Grupos microbianos quantificados em alheiras elaboradas em produtores artesanais de Bragança e Vinhais, por produtor e por etapa do processo dentro de cada produtor.	52
Tabela 5.1: Propriedades intrínsecas (pH, atividade da água e humidade) das alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes.	60
Tabela 5.2: Análise proximal em base húmida (% bh) e base seca (% bs) das alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes.	62
Tabela 5.3: Grupos microbianos quantificados em alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
DGADR	Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
EFSA & EDCD	European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
INE	Instituto Nacional de Estatística
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
USDA & FSIS	United States Department of Agriculture & Food Safety and Inspection Service

1. INTRODUÇÃO

Designam-se por produtos tradicionais aqueles produtos espacialmente ligados a um território, à cultura e aos costumes ou modos de fazer, com um mínimo de permanência no tempo ou antiguidade, detentores de características qualitativas particulares que os diferenciam dos outros produtos (Albert & Muñoz, 1996), e que revelam interesse histórico, etnográfico, social ou técnico, evidenciando valores de memória, autenticidade, singularidade ou exemplaridade (Soeiro, 2014). Hoje, estes alimentos tradicionais estão no centro das atenções enquanto instrumentos potenciadores de desenvolvimento agrícola e rural. Apesar de sempre terem estado no mercado, mas de forma não expressiva em termos quantitativos, os conceitos de referências associados aos alimentos tradicionais e artesanais ganham cada vez mais importância ao nível do mercado, bem como os produtores e os distribuidores tendem a aumentar a produção, a diversificar a oferta e a melhorar a sua forma de apresentação (Tibério et al., 2008). Para além de que, sendo a base da economia de territórios mais sensíveis, os produtos tradicionais constituem a principal ocupação de pessoas e famílias desses territórios (Territórios em Rede, 2011).

Portugal caracteriza-se por possuir uma vasta e diversificada gama de produtos alimentares tradicionais entre os quais destacam os produtos de salsicharia, pelo que a sua valorização é de grande importância para o desenvolvimento sustentável do território (DGADR, 2018). De facto, a produção de alimentos com características tradicionais desempenha em Portugal um papel fundamental no desenvolvimento das regiões rurais, uma vez que as matérias-primas utilizadas são geralmente produzidas localmente, assim, estimulando o comércio local, criando emprego e contribuindo para a preservação do património local. Por outro lado, os consumidores tornaram-se mais atraídos por alimentos menos industrializados e estão disponíveis para pagar mais por alimentos artesanais, produzidos em estruturas mais pequenas, uma vez que são percebidos como produtos de qualidade, de propriedades organoléticas finas, e até mais saudáveis. Portanto, a valorização dos alimentos tradicionais e artesanais deve basear-se na qualidade única, assim como na segurança microbiológica. Conforme o Despacho

Normativo N° 9 (2015), os produtos com características tradicionais para que possam continuar a ser produzidos, podem em determinados casos, impor a necessidade de aplicação de regras mais flexíveis que devem ser equivalentes às aplicáveis aos estabelecimentos localizados em regiões sujeitas a condicionalismos geográficos, desde que a higiene e segurança alimentar não sejam comprometidas.

Um produto cárneo tradicional altamente consumido é a *alheira*, produzido predominantemente na região de Trás-Os-Montes. Este enchido é elaborado a partir de carne de porco, carne de frango, banha de porco, pão de trigo fatiado, azeite de oliva, sal, alho, pimentão ou outras carnes e especiarias. A massa é embutida em tripa de porco, e submetida a fermentação e secagem por aproximadamente uma semana (Silva et al., 2019), embora os tempos de produção sejam muito variáveis. O produto é sempre consumido grelhado. Contudo, apesar da popularidade da alheira em Portugal, vários estudos têm evidenciado que sobre tudo nas unidades artesanais de produção não é improvável ocorrerem falhas na aplicação das boas práticas de higiene assim como falhas ou variação no processo de fabrico (Ferreira et al., 2007; Magalhães et al., 2011). Esta falta de controlo e de normalização de processos pelos produtores artesanais é responsável pela grande variabilidade encontrada nas características físico-químicas e microbiológicas entre lotes de um mesmo produtor. Numa investigação da qualidade das alheiras artesanais não embaladas comercializadas em feiras de Bragança, Borgi (2019) reportou uma alta variação nas propriedades intrínsecas que conferem estabilidade microbiológica ao produto, nomeadamente atividade da água (0,9870; IC 95%: 0,9730 – 0,9930), pH (4,827; IC 95%: 3,70 – 5,63) e conteúdo de humidade (49,5%; IC 95%: 36,2 – 62,8%). Em termos de teores de gordura (14-18%) e proteínas (8-13%), a alheira crua também é muito variável (Campos et al., 2013; Ferreira et al., 2006a; Patarata et al., 2008; Pereira et al., 2012).

Borgi, (2019), Esteves et al. (2006a), (2006b) e (2008) reportaram ainda a presença de microrganismos patogénicos como *Salmonella* spp., *C. perfringens* e *S. aureus* neste produto tradicional. Um estudo abrangente de meta-análise sobre a segurança microbiológica dos produtos cárneos tradicionais portugueses (Xavier et al., 2014) estimou incidências médias de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* de 9,8% (IC 95%: 6,6 – 14,4%), 13,4% (IC 95%: 9,2 – 19,0%) e 25,8% (IC 95%: 15,7 – 39,3%) em enchidos a serem consumidos cozinhados, como é o caso da alheira.

Assim, este estudo foca-se na investigação da qualidade e segurança daquelas alheiras elaboradas artesanalmente em instalações conhecidas como cozinhas regionais localizadas na Terra Fria Transmontana, e enquadra-se segundo as exigências atuais de higiene e salubridade, numa dupla perspetiva, de proteção do consumidor e de valorização económica dos recursos locais. O trabalho teve por objetivos:

1. Avaliar as propriedades intrínsecas (atividade da água, pH, e conteúdos de humidade, gordura, proteína e cinzas) e grupos microbianos indicadores de higiene e segurança (mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*) ao longo do processo de fabrico das alheiras produzidas em duas cozinhas regionais; e esclarecer os fatores críticos de processamento que condicionam a sua qualidade.
2. Elucidar, mediante análise de componentes principais, a dissimilaridade nos atributos composicionais e características microbiológicas de alheiras elaboradas por um conjunto de produtores artesanais; e inferir as inter-relações ou tendências entre os atributos de qualidade antes mencionados.

Desta forma, o trabalho de investigação foi realizado em duas fases: a primeira fase visou atingir o objetivo (1) e é apresentada no Capítulo 4, enquanto o trabalho de investigação referente ao objetivo (2) é apresentado no Capítulo 5. Estes capítulos contêm resultados e discussão. O Capítulo 6 desta dissertação apresenta as conclusões gerais obtidas por meio dos resultados encontrados nos Capítulos 4 e 5. No Capítulo 2, apresenta-se uma revisão bibliográfica que serve de marco teórico ao trabalho de investigação realizado. A metodologia e protocolos utilizados para as análises físico-químicas e microbiológicas descrevem-se no Capítulo 3.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Alheira: Origem e Características

A alheira é um enchido tradicional português fermentado e maturado, geralmente obtido a partir de carne de porco. A origem das alheiras remonta desde o final do século XV e está associada à presença de comunidades judaicas em Trás-os-Montes. Segundo a tradição, foi desenvolvido um tipo de linguiça de forma semelhante àquelas que faziam parte da culinária cristã, mas recheada com frango e farinha em vez de carne de porco e gordura. Dessa maneira, os cripto-judeus escaparam de serem identificados pela inquisição por causa de seus diferentes hábitos alimentares (Ferreira et al., 2006a). Com o passo dos anos, a receita foi se tornando popular entre a população local que começou a reproduzi-la e espalhá-la para outras regiões de Portugal e do mundo (Campos et al., 2013). Atualmente, diferentes tipos de alheiras são produzidos utilizando diversas matérias-primas como carne de caça, bacalhau, atum, entre outros, nas várias unidades de produção, representando um importante recurso económico das regiões (Ferreira et al., 2006; Silva et al., 2019).

A alheira deve suas características únicas por um lado, aos seus ingredientes que incluem pão e carnes condimentadas com sal, pimenta, colorau, azeite ou banha de porco e alho que é usado como ingrediente base (Esteves et al., 2008; Patarata et al., 2008). Relativamente às características físicas, a alheira tem um formato de ferradura, com comprimento entre 20 a 35 cm e com 2 a 3 cm de diâmetro, aspeto amarelado e heterogéneo, e o seu peso oscila entre 150 e 200 gramas. Relativamente às características sensoriais, apresenta um cheiro muito leve a fumo, agradável, destacando-se o sabor a alho, azeite e uma ligeira acidez típica (DGADR, sem data). Do ponto de vista de vida de prateleira, apresenta uma vida útil de cerca de 30 dias se for armazenado a 4°C ao ar ou por mais tempo se for embalado á vácuo (Albano et al., 2009; Ferreira et al., 2006a). Contudo, é um produto que antes do consumo necessita de ser submetido a uma operação culinária de fritura ou grelhado de acordo com as preferências do consumidor (Esteves et al., 2008; Ferreira et al., 2006a).

2.2.Importância Económica da Alheira e Outros Enchidos para a Região

O fabrico de produtos de salsicharia tradicional representa uma parte considerável da indústria cárnea a nível europeu, particularmente em países mediterrânicos como Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia. Em Portugal, a atividade de “abate de animais, preparação e conservação de carne e de produtos à base de carne” em 2017, foi a mais valorizada das indústrias alimentares com 18,5% do total do valor de vendas (INE, 2019). Desde o ano 2000 até o 2012 (Figura 2.1), tem-se verificado um aumento da produção, tanto dos produtos à base de carne como da produção de enchidos, entretanto, a partir do ano de 2013 ocorreu uma redução quase constante da produção dos mesmos até o ano 2017. Apesar disso, fazendo uma análise do período 2000 a 2017, verificou-se um crescimento na ordem de 70 mil toneladas correspondentes a 150% para a fabricação de produtos à base de carne e 40 mil toneladas correspondentes a 300% para a produção dos enchidos.

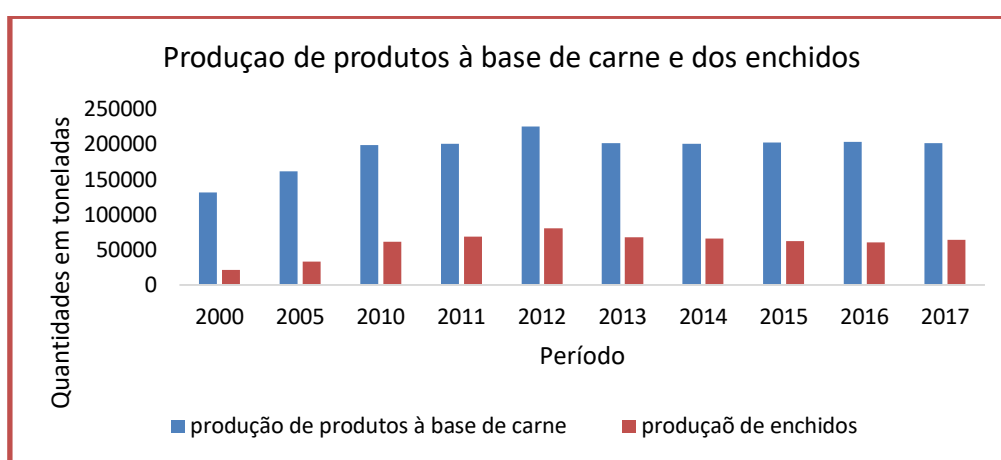


Figura 2.1: Evolução da produção de produtos de transformação cárnea e dos enchidos em Portugal, no período 2000 a 2017. Fonte: INE (2001, 2006, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018).

Em Portugal, o sector de transformação da carne e produção dos enchidos tradicionais é particularmente rico e diversificado. De acordo com o inquérito feito pela DGADR (2018), existem a nível nacional cerca de 41 produtos de salsicharia devidamente certificados com a designação IGP e DOP. Contudo, na região norte do país, destacam-se os seguintes: as alheiras do Barroso, de Mirandela e de Vinhas, as

chouriças de carne do Barroso, de Melgaço, de Vinhais, os presuntos do Barroso, de Melgaço e de Vinhais, o salpicão do Barroso, de Melgaço e de Vinhais; e a Sangureira do Barroso-Montalegre (DGADR, sem data).

No que concerne à produção da alheira, historicamente este produto era elaborado exclusivamente por produtores domésticos e a sua comercialização representava uma fonte de renda extra valiosa para as famílias (Esteves et al., 2008). Contudo, nos últimos tempos, a produção da alheira tem vindo a crescer representando ao nível industrial um volume de negócios anual de cerca de 30 milhões de euros apenas no distrito de Bragança. A produção da alheira assumiu assim um papel importante para o desenvolvimento económico da região, não apenas por suas características sensoriais únicas, mas também graças ao seu custo razoável comparativamente a outros produtos de salsicharia (Patarata et al., 2008). Também é visto como âncora gastronómica do turismo, divulgação cultural, produção e exportação, levando a um reconhecimento nacional e internacional crucial da região (Campos et al., 2013).

2.3.Regimes de Qualidade e Certificação dos Produtos Tradicionais

Os regimes de qualidade constituem a base para a identificação e proteção de denominações e menções que indicam ou descrevem produtos com características que oferecem uma mais-valia em virtude dos métodos de produção e transformação utilizados, ou em virtude do local de produção, transformação ou comercialização. De modo que, o interesse pelos produtos tradicionais como elemento integrante no desenvolvimento rural e de qualidade a nível europeu, traduziu-se na publicação de regulamentação comunitária de apoio à valorização e proteção de produtos originários de regiões conhecidas pelas suas produções tradicionais (Tibério et al., 2008). Essa regulamentação conduziu a certificação e consequente atribuição dos regimes de qualidade: Denominação de Origem Protegida (DOP) e Indicação Geográfica Protegida (IGP) a alguns produtos tradicionais portugueses.

O DOP assinala que um produto é originário de um local ou região, cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os seus fatores naturais e humanos e cujas fases de

produção tenham todas lugar na área geográfica delimitada (Regulamento (CE) N° 1151, 2012).

O IGP é definido como sendo uma denominação que identifica que um produto é originário de um local ou região determinados, que possui determinada qualidade, reputação ou outras características que possam ser essencialmente atribuídas à sua origem geográfica e em relação ao qual pelo menos uma das fases de produção teve lugar na área geográfica delimitada (Regulamento (CE) N° 1151, 2012) (Figura 2.2).



Figura 2.2: Símbolos de Denominação de Origem Protegida (DOP) e de Indicação Geográfica Protegida (IGP) utilizados em produtos cárneos tradicionais de Portugal

2.3.1. Importância da certificação de produtos tradicionais

A certificação é de extrema importância uma vez que, procura facilitar a concorrência leal entre os produtores de géneros alimentícios com características e atributos que oferecem mais-valia, para além de disponibilizar aos consumidores informações fiáveis sobre os produtos com características específicas, de forma a permitir que façam opções de compra. De modo que, a certificação de produtos é facultativa e constitui um instrumento para a comercialização, com vantagens para todos os envolvidos, uma vez que:

- 1) **O produtor** consegue demonstrar com objetividade que o produto obtido cumpre requisitos pré-determinados, colocando-o em vantagem perante a concorrência, pois os compradores são fácil e objetivamente informados através da exibição de uma marca;

- 2) **O retalhista/comerciante** beneficia-se porque é ajudado na seleção de produtos e produtores, aproximando-se dos anseios do cliente transmitindo-lhe qualidade, segurança e autenticidade; e,
- 3) **O consumidor** reconhece a qualidade podendo optar pela diferença, tendo a certeza de que todos os aspetos relevantes do produto, a que não tem diretamente acesso, foram devidamente controlados e estão conforme ele espera.

2.3.2. Alheiras certificadas

Existem a nível nacional, três alheiras certificadas com regime IGP nomeadamente: alheira de Vinhais, alheira de Mirandela e alheira de Barroso (DGADR, sem data). Para estas alheiras poderem beneficiar deste regime, avaliaram-se vários elementos nomeadamente, o nome do produto, a descrição do produto, a delimitação da região geográfica da obtenção das matérias-primas, a região geográfica de transformação em produto final, o método de produção e, acima de tudo, os elementos que provam a origem do produto, fatores extremamente importantes para a identidade e especificidade do produto e que constam nos cadernos de especificações.

Na Tabela 2.1, pode-se apreciar que, para além das semelhanças entre os três tipos de alheiras, também existem algumas diferenças em vários aspetos. Por exemplo, a carne de porco utilizada, embora seja da raça bísara na elaboração de cada uma delas, utilizam-se partes diferentes das carcaças de carne para além de que, na alheira de Mirandela também é adicionada a banha de porco. No que diz respeito à duração da fumagem, por exemplo, a alheira de Barroso necessita apenas de 3 a 4 dias enquanto as alheiras de Mirandela e Vinhais levam pelo menos 8 dias. Algumas diferenças também são encontradas na região geográfica de produção assim como de transformação do produto. Portanto, todos esses aspetos é que determinam as características químicas e organoléticas únicas e específicas de cada tipo de alheira.

Tabela 2.1: Características e especificações das alheiras certificadas com regime IGP.

ALHEIRA	VINHAIS	MIRANDELA	BARROSO-MONTEALEGRE
DESCRIZAÇÃO			
Carne de Porco (Bísaro)	Cabeça, entremeada, barriga e aparas	Pá, cabeça e barriga	Carne agarrada aos ossos, cabeça, entremeada e aparas
Carne de aves	Galinha e peru (apenas para elaborar a calda)	Banha de porco Galinha, pato, lebre, coelho, perdiz e faisão Não utiliza cebola e salsa picada	Galinha, pato e coelho Não utiliza cebola e salsa ou malagueta
Peso do porco ao abate	100 a 200 kg	100 a 200 kg	100 a 250 kg
Caraterísticas químicas dos ingredientes incorporados	-	10 a 15% porco, 45 a 50% aves; 15 a 25% de pão, e 4 a 8% de azeite	50% porco, e o pão não excede 25%
Área geográfica de produção	Distrito de Vila Real	Concelho de Mirandela	Concelhos de Boticas, Chaves e Montalegre
Área geográfica de transformação	Distrito de Bragança	Concelho de Mirandela	Concelho de Montalegre
Lenha	Carvalho e de castanhos	Oliveira, carvalho, sobreiro, pinheiro e choupo	Carvalho, torgos, videeiros e salgueiro
Processo de fumagem	Superior a 8 dias	~ 8 dias	3 a 4 dias
Logotipo			

Fonte de elaboração: Associação Comercial e Industrial de Mirandela (2015); Associação dos Produtores de Fumeiro da Terra Fria Barrosã (sem data); Vinhais (2005).

2.4. Enquadramento Legal na Produção de Alheira

De acordo com Codex Alimentarius (2003), para que os operadores da indústria alimentar consigam proporcionar alimentos seguros e aptos para o consumo deverão aplicar as práticas de higiene estabelecidas nesse documento, em toda a cadeia alimentar desde a produção até ao consumidor final, por forma a identificar os perigos inerentes biológicos, químicos e físicos. Nesse contexto, o produtor das alheiras, seja de forma artesanal ou industrial, necessita implementar a legislação vigente relativamente às boas práticas de higiene e de fabrico. Sempre que possível e para facilitar o controlo em todas as etapas de produção, transformação e distribuição, deverá implementar um sistema HACCP, tendo em conta os pontos críticos de controlo em cada operação.

2.4.1. Obrigação dos operadores em relação às boas práticas de higiene

Para tornar mais eficiente o controlo da qualidade alimentar foi publicado o “Pacote Higiene” que entrou em vigor em todos os estados membros da União Europeia, a 1 de Janeiro de 2006. Neste pacote estão incluídos: 1) Regulamento (CE) N° 852 (2004), relativo à higiene dos géneros alimentícios, 2) Regulamento (CE) N° 853 (2004) que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Este pacote abrange a todos os operadores e produtores da indústria alimentar e aplica-se em todas as fases da produção, transformação e distribuição de alimentos.

Os operadores das empresas do setor agroalimentar como é o caso dos produtores de alheiras, são obrigados a cumprir as disposições o anexo II do Regulamento (CE) N° 852 (2004) no que concerne às instalações e locais onde os produtos estão expostos. As instalações devem compreender superfícies (incluindo de equipamentos) e utensílios, que sejam de fácil limpeza; paredes, tetos e portas que sejam lisas, impermeáveis, não absorventes e de materiais resistentes à corrosão. As medidas e frequências de limpeza e desinfeção das instalações referidas devem ser adaptadas à atividade de forma a ter em conta a respetiva microflora. Instrumentos e equipamentos devem ser mantidos permanentemente num estado de higiene satisfatório e ser limpos e desinfectados regularmente.

2.4.2. Obrigação dos operadores em relação aos critérios microbiológicos

Por forma a garantir a segurança e salubridade dos géneros alimentícios, os operadores do sector alimentar são obrigados a implementar o Regulamento (CE) N° 1441 (2007) de 5 de Dezembro de 2007 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. De acordo com o Codex Alimentarius Commission & Joint FAO WHO Food Standards Programme (2009), um critério microbiológico define a aceitabilidade de um alimento ou lote de alimentos com base na ausência ou presença ou número de microrganismos, incluindo parasitas e/ou quantidade de suas toxinas, metabolitos por unidade (s) de massa, volume, área ou lote. A presença ou ausência do microrganismo no alimento é representada por “satisfatório” se todos os valores observados indicarem a ausência da bactéria, e “insatisfatório” se for detetada a presença da bactéria em qualquer uma das unidades da amostra. Sendo que a alheira é um produto cárneo a ser consumido cozido (não é pronto para consumo), a sua qualidade higiénica e de segurança deve estar em conformidade com os critérios microbiológicos compilados na Tabela 2.2. Ausência de *Salmonella* em 25 g de produto até o fim da vida útil, e um máximo de 5000 UFC/ g de produto ao fim do processo de fabrico. *E. coli* é identificada como sendo um indicador de contaminação fecal.

Tabela 2.2: Critérios microbiológicos que se aplicam na produção de alheiras

Categoria do alimento	Microrganismo	Limites	Fase em que se aplica o critério
Produtos a base de carne	<i>Salmonella</i>	Ausente em 25g	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
Carne picada	Contagem de colónias aeróbias	5 x 10 ⁵ ufc/g (mínimo) 5 x 10 ⁶ ufc/g (máximo)	Fim do processo de fabrico
Preparados de carne	<i>E. coli</i>	500 ufc/g (mínimo) 5000 ufc/g (máximo)	Fim do processo de fabrico

Fonte de elaboração: Regulamento (CE) N° 1441 (2007).

2.5.Características Físico-Químicas e Valor Nutricional da Alheira

As características físico-químicas e a composição nutricional da alheira depende tanto dos tipos de ingredientes utilizados para a sua elaboração como dos processos de fabrico aplicados, os quais são muito variáveis de produtor a produtor, seja artesanal ou industrial (Ockerman & Basu, 2014; 2017). Para além disso, é preciso salientar que o valor nutricional da alheira também depende do tipo de tratamento térmico. De acordo com os dados do Serviço Nacional de Saúde (2019), o balanço calórico da alheira grelhada é de 306 kcal/100 g grelhada, versus os 206 kcal/100 g de alheira cozida. Como se pode constatar, a cozedura reduz consideravelmente o valor calórico comparativamente a alheira grelhada. Considerando que os adultos devem ingerir cerca de 2000 kcal por dia e que cerca de 30% devem ser fornecidos pelas refeições principais (mais ou menos 600 kcal), pode-se concluir que as alheiras estão de acordo com as diretrizes e podem ser consumidas como prato principal (Campos et al., 2013).

Relativamente à composição proximal, a alheira apresenta valores médios entre 15 e 20% de gordura bruta, e entre 10-13% de proteína bruta (Tabela 2.3; Campos et al., 2013; Ferreira et al., 2006; Patarata et al., 2008; Pereira et al., 2012). Contudo, Campos et al. (2013) relatam que, apesar da alheira não ser um alimento hipercalórico, é desequilibrado nutricionalmente pois apresenta altos teores de lípidos do que os considerados saudáveis. Os mesmos autores aconselham que para compensar esse desequilíbrio nutricional a alheira deve ser consumida acompanhada de alimentos ricos em hidratos de carbono e pobres em gordura. No que diz respeito às propriedades intrínsecas de atividade da água e pH da alheira crua, esta, também apresenta valores variáveis, que oscilam desde 0.870 a 0.987 e desde 3.84 até 5.60, respetivamente (Tabela 2.3).

2.6.O Fabrico da Alheira

A alheira é um produto tipicamente transmontano; contudo, possui particularidades em algumas zonas específicas relativamente aos processos de fabrico e nos ingredientes utilizados.

2.6.1. Ingredientes essenciais na elaboração das alheiras

Os principais ingredientes utilizados no fabrico das alheiras são essencialmente a carne, o pão e os condimentos. A carne constitui a matéria-prima principal da maioria dos produtos cárneos transformados e é essencialmente de origem suína, entretanto, às alheiras são introduzidas carnes brancas, de aves ou de caça (Ferreira et al., 2006a).

Tabela 2.3: Características físico-químicas das alheiras avaliadas em diferentes estudos

pH	a_w	Humidade (%)	Proteína bruta (%)	Gordura bruta (%)	Cinzas (%)	Hidratos de carbono (%)	Referências
5,11±0,50		52,3±4,31	11,4±2,80	18,4±4,70		15,2±3,60	Ferreira et al. (2006)
4,92±0,51	0,930±0,01	49,0±7,72	10,12±2,30	19,46±4,92	2,21±1,20	19,24±4,79	Patarata et al. (2008)
5,26±0,36	0,960±0,01						Esteves et al. (2008)
	0,991*	54,3*					Albano et al. (2009)
	0,982-0,987	52-52,5					
6,07±0,26*	0,918±0,07*	68,8±0,45*	9,94±0,93*	6,6±0,68*	1,14±0,02*		Pereira et al. (2012)
		56,4±1,64*	13,0±0,52*	15,6±1,24*		13,2±0,65*	Campos et al. (2013)
5,60							Pinto (2015)
4,34-5,92	0,870-0,960						Barros et al. (2018)
4,83±0,56*	0,987±0,004*	49,5±6,8*					Borgi (2019)
4,87-5,09	0,981-0,960						Carvalho et al. (2019)
3,84-5,54	0,968-0,998						Silva et al. (2019)

^(*)Valores obtidos em alheira crua, antes da cozedura/grelhado

Contudo, a composição química do músculo da carne varia segundo a espécie animal, sexo, idade e zona muscular em causa (Strong, 2006; Whittemore & Kyriazakis, 2008). Em termos gerais, contém 75% de água, 22% de proteínas, 3.5% de substâncias não proteicas solúveis e 3% de gordura (Whittemore & Kyriazakis, 2008).

O pão utilizado é regional de trigo cozido em forno de lenha, pesa cerca de 1,5 Kg, é redondo e resulta de uma cozedura prolongada, com uma quantidade muito reduzida ou nula de fermento (Associação Comercial e Industrial de Mirandela, 2015; Associação dos Produtores de Fumeiro da Terra Fria Barrosã, sem data; Vinhais, 2005)

2.6.2. Condimentos essenciais na elaboração das alheiras

Os condimentos tradicionalmente mais utilizados no fabrico das alheiras são o sal, o alho, o colorau e a malagueta ou piri-piri. O sal é o aditivo mais importante na produção de produtos à base de carne (Feiner, 2006), pois desempenha diversas funções, desde intensificador de sabor até agente antimicrobiano. A sua adição nos alimentos reduz a atividade da água, e por conseguinte, controla a proliferação de microrganismos indesejáveis (Ockerman & Basu, 2014). Por outro lado, o sal contribui para uma maior capacidade de extração das proteínas miofibrilares, essencial para a ligação da massa dos enchidos, favorecendo a coesividade dos produtos (Gomes, 2017). A concentração de sal utilizada em enchidos é variável. Teores entre 2 a 4% permitem o desenvolvimento das bactérias lácticas e inibem o crescimento da maioria de microrganismos (Ockerman & Basu, 2014). Contudo, os níveis normalmente encontrados nas alheiras são, no entanto, inferiores (Noronha, 2008).

Relativamente às especiarias, são definidas como substâncias aromáticas de origem vegetal, sendo utilizadas com a função de fornecer sabores e aromas aos alimentos. Não contribuem para fins nutricionais, pois não fornecem energia, assim, são consumidas em quantidades menores (Feiner, 2006). Algumas especiarias podem ajudar na digestão e no aumento de apetite, porém, outras como alecrim, sálvia e seus extratos, têm propriedades antioxidantes sendo bastante úteis para prevenir a oxidação das gorduras, enquanto outras, como tomilho e alho, têm propriedades antimicrobianas, previnem o crescimento de bactérias indesejáveis as “patogénicas” e de deterioração, sendo também que, estimulam o crescimento de bactérias lácticas (Chi & Wu, 2014; Feiner, 2006; Ockerman & Basu, 2017). Os principais condimentos utilizados no

fabrico da alheira são o alho e o colorau. Há a salientar que, as quantidades dos condimentos utilizados nas alheiras são muito variáveis, contribuindo para a diferenciação de produtor para produtor.

2.6.3. Processo de produção

O processo da produção da alheira é compreendido pelas seguintes etapas: escolha das carnes, corte da carne, cozedura da carne, corte do pão, amolecimento do pão com a calda de cozedura das carnes, mistura de todos os ingredientes, enchimento, fumagem e secagem/maturação (Figura 2.3).

Escolha das carnes: No fabrico das alheiras são escolhidas as peças de carne frequentemente obtidas da pá, da cabeça, da barriga (Associação Comercial e Industrial de Mirandela, 2015), entremeada e aparas de carne de carcaças (Vinhais, 2005). Quando se utiliza carne de aves, emprega-se as carnes de galinha e/ou peru obtidas de todas as partes exceto das vísceras, enquanto para alheiras de carne de caça, podem ser utilizadas as carnes de pato, perdiz, coelho, lebre ou faisão (Associação Comercial e Industrial de Mirandela, 2015). Schwing & Neidhardt (2008) explicam que desde o ponto de vista da qualidade do produto final, é melhor selecionar carnes provenientes de animais adultos, devido ao seu maior conteúdo de mioglobina, o que favorece uma melhor cor. Por outro lado, deve possuir bom poder tampão e capacidade de retenção de água e níveis de pH entre 5,4 e 6,0. A gordura deve ser firme, com baixo teor de ácidos gordos polinsaturados, a fim de evitar rancidez rápida e excessiva exsudação de gordura. No caso da carne de porco, a carne da região dos ombros carrega um nível mais alto de pigmentação e é preferível.

Corte das carnes: As carnes são cortadas em pedaços de dimensão média, de maneira que a cozedura seja um processo equilibrado e eficiente (Vinhais, 2005). Na produção industrial, este processo é realizado a temperaturas de refrigeração, o qual permite que o corte efetuado seja preciso, porque a ativação da proteína muscular é mais eficaz a baixas temperaturas (Feiner, 2006). Por outro lado, evita as perdas ao nível da fração lipídica que redundariam em alterações negativas da cor e textura do produto final

(Gomes, 2017), para além de que baixas temperaturas reduzem o risco de crescimento bacteriano (Feiner, 2006).

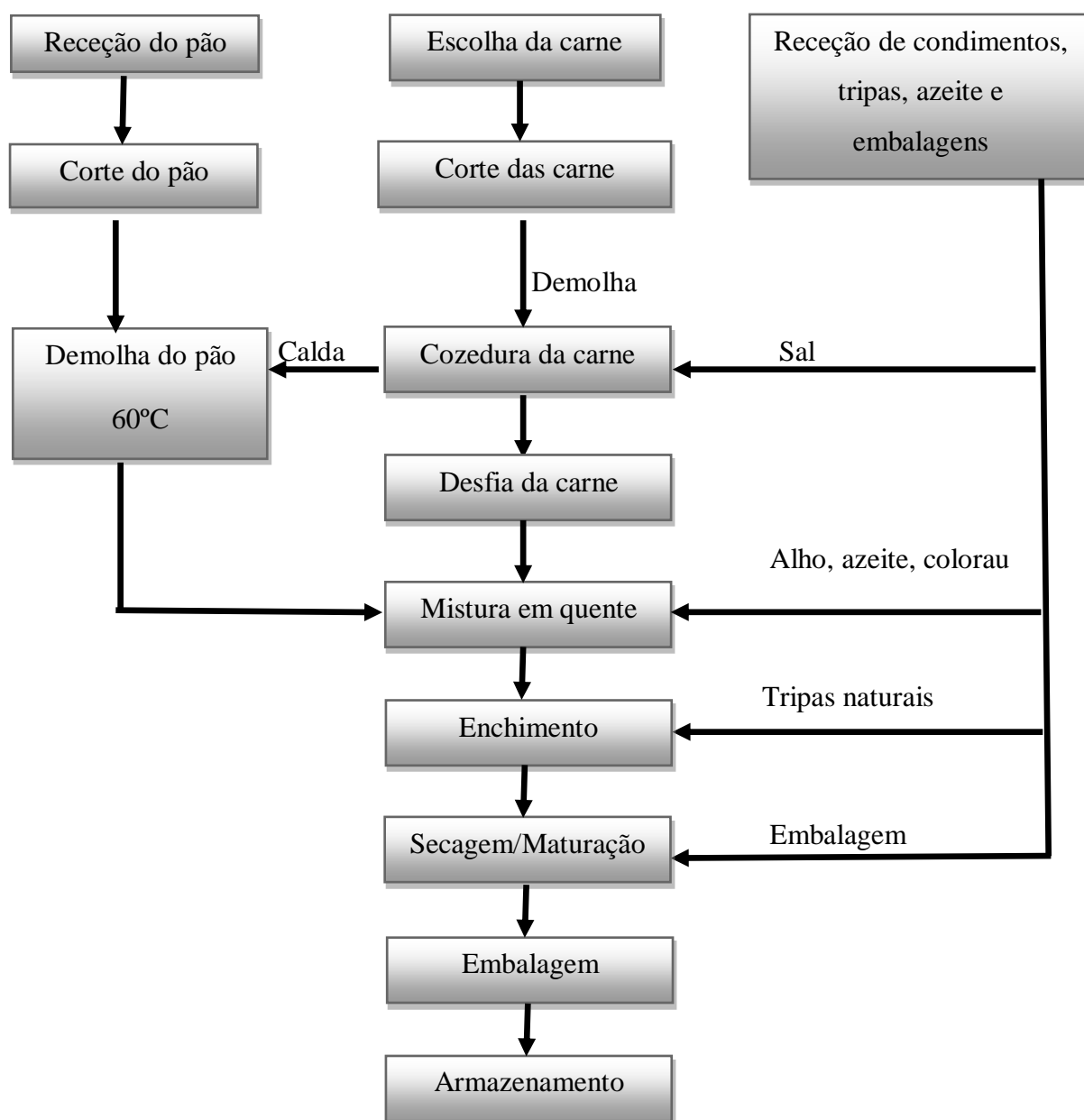


Figura 2.3: Diagrama do processo de produção da alheira. Fonte de elaboração: Associação Comercial e Industrial de Mirandela (2015); Vinhais (2005)

Cozedura das carnes: As carnes já cortadas e os restantes ingredientes utilizados são juntos cozidos em água e sal numa panela. A duração da cozedura depende das dimensões e do tipo de recipiente utilizado e das características do lume (Associação Comercial e Industrial de Mirandela, 2015; Vinhais, 2005). Do ponto de vista microbiológico, a cozedura é uma etapa muito importante uma vez que pode destruir a

maioria dos microrganismos eventualmente presentes na carne. Deve contemplar uma temperatura de aproximadamente 100°C durante um período de 30 minutos (Noronha, 2008). Do ponto de vista tecnológico, a adição de água tem uma função importante em produtos à base de carne cozidos, uma vez que, a água atua como um solvente em conjunto com fosfatos e sal na proteína muscular da carne, tornando os produtos mais suculentos (Feiner, 2006).

Preparação da massa: A preparação da massa compreende as fases de corte do pão e o seu amolecimento em calda quente de carne cozida. O pão regional é cortado em fatias finas, com côdea (Vinhais, 2005). Esta operação é da maior importância para as características finais do produto. A temperatura e a gordura da calda permitem que o pão absorva os aromas das diferentes carnes existentes no caldo e adquira a consistência ideal para que, ao ser misturado com os restantes ingredientes, origine uma massa com as características necessárias à obtenção de um produto diferenciado específico (Associação Comercial e Industrial de Mirandela, 2015). Esta mistura é feita a quente, ou seja, a uma temperatura superior a 60°C (Noronha, 2008).

Mistura dos ingredientes: Ao pão amolecido junta-se aos restantes condimentos (alho, colorau e azeite de oliva) e a carne de porco desfiada (Vinhais, 2005). A massa formada pela mistura de todos os ingredientes é homogeneizada, de forma manual ou mecânica. A forma como é feita esta mistura é determinante para a qualidade final do produto e para o aspeto final das alheiras, em que se apercebem as carnes desfiadas (Associação Comercial e Industrial de Mirandela, 2015).

Enchimento: Após o acerto da condimentação, é feito o enchimento imediato na tripa de porco. O enchimento, manual ou mecânico, é feito com cuidado para não rasgar a tripa. Em cada extremidade do enchido é feito o fecho, com o mesmo segmento de fio de algodão, pelo que o enchido adquire o formato de ferradura (Associação Comercial e Industrial de Mirandela, 2015).

Processo de fumagem/secagem: O processo de preservação pelo fumo envolve a combinação de dois efeitos: por um lado, a secagem que reduz a atividade da água, e por outro lado, a condensação das partículas do fumo à superfície do produto e a migração para o seu interior. Os compostos fenólicos produzidos pelo fumo de madeira têm um efeito bactericida e antioxidante, sendo eficaz na prevenção da oxidação lipídica em produtos à base de carne como a alheira (Mediç, 2017; Walker, 2011), contribuindo dessa forma para impedir o crescimento de microrganismos por um lado, e contribuindo para a proteção da superfície do produto do crescimento de fungos e do desenvolvimento de ranço, por outro lado (Mediç, 2017). A fumagem é feita com fogo brando a cerca de 15 cm de comprimento e tem uma duração curta variável (Ferreira et al., 2006a), dependendo do tipo de alheira em específico e é realizada em câmaras próprias. A temperatura a que os enchidos são submetidos varia muito em função da atividade do fogo e da distância a que dele se situam, mas pode afirmar-se que o processo artesanal se caracteriza por períodos de fumagem pouco intensa, a temperaturas entre 60 a 70°C (Almeida, 2009). Geralmente o fumo é obtido a partir da combustão direta de lenha de oliveira ou carvalho, por serem estas as espécies que apresentam um fumo de características mais densas, o qual confere às alheiras características sápidas e textura específicas (Associação Comercial e Industrial de Mirandela, 2015).

Embalagem: Dentre as principais mudanças que podem limitar a vida útil dos produtos a base de carne, como a alheira, incluem-se: a descoloração, oxidação lipídica, reidratação, desidratação e deterioração microbiana, portanto, para além da seleção de materiais de embalagem adequados, devem ser aplicados sistemas de embalagem apropriados para retardar ou impedir essas mudanças desfavoráveis na qualidade durante o armazenamento e a distribuição (Ahn & Min, 2008). Dos vários sistemas de embalagem disponíveis na indústria alimentar, a embalagem a vácuo é a mais utilizada nas alheiras. A embalagem a vácuo prolonga a sua vida útil porque inibe o crescimento de microrganismos aeróbicos de deterioração e reduz a taxa de deterioração oxidativa (Athavale, 2018; Gorris & Peppelenbos, 2007). No entanto, no caso das alheiras artesanais, é muito comum serem comercializadas avulso, sem embalagem.

Armazenamento: O produto acabado deve ser armazenado em ambiente refrigerado (4°C) para controlar o desenvolvimento de microrganismos. Especialmente no caso de produto não embalado, é muito importante a higiene dos recipientes utilizados (Noronha, 2008). Contudo, as alheiras de produção artesanal são por vezes armazenadas a temperatura ambiente.

2.7.Fatores que Influenciam na Estabilidade das Alheiras

A estabilidade dos produtos alimentares é influenciada por diferentes fatores tais como: intrínsecos, extrínsecos e implícitos (Adams & Moss, 2008; Brown, 2000; Fellows, 2018). Os fatores intrínsecos estão relacionados às características do produto, que em produtos à base de carne incluem a disponibilidade de nutrientes (por exemplo, fontes de carbono e nitrogénio e quaisquer nutrientes específicos para microrganismos particulares), pH (geralmente de 4,3 a 7,0), a_w (>0,60-0,999) e o tipo de “humectante” (por exemplo, sal, açúcar ou glicerol), a presença de conservantes (por exemplo, nitrito, sulfito, sorbato, benzoato ou parabenos) ou ingredientes com propriedades antimicrobianas, como especiarias e constituintes do fumo (Brown, 2000; Fellows, 2018).

Os fatores extrínsecos estão relacionados com as características externas ao produto, isto é, condições de processo e armazenamento (temperaturas de refrigeração ou de esterilização), ambiente gasoso, por exemplo, embalagens a vácuo com altas concentrações de CO₂ e baixas de O₂ e humidade relativa (Brown, 2000). Já os fatores implícitos estão relacionados às propriedades e interações dos microrganismos presentes no alimento, como por exemplo, a taxa de crescimento específico, mutualismo, antagonismo, comensalismo, etc., (Adams & Moss, 2008). No que diz respeito a estabilidade das alheiras, os principais fatores que a condicionam são a atividade da água, o pH, o teor de humidade, a temperatura de conservação e o tipo de embalagem (Borgi, 2019).

2.7.1. Atividade da água (a_w)

A a_w é um dos critérios utilizados para estudar a estabilidade dos alimentos (Park, 2008) e determina o limite mínimo da água que está disponível no alimento para participar no metabolismo microbiano, na atividade enzimática e também nas reações químicas (Fellows, 2018; Herrington & Vernier, 2012). Existe um limite de a_w abaixo do qual nenhum microrganismo pode crescer. Para a maioria dos alimentos está na faixa de 0,6 a 0,7 (Adams & Moss, 2008; Fellows, 2018). A maioria dos fungos é inibida abaixo de $a_w = 0,7$, as leveduras são inibidas abaixo de $a_w = 0,8$ e a maioria das bactérias é inibida abaixo de $a_w = 0,9$ (Fellows, 2018).

Tomando como exemplo a carne fresca, esta apresenta a_w de cerca de 0,98, o que significa que cerca de 98% da água total na carne está livre para reagir com qualquer tipo de microrganismo. Os produtos cárneos apresentam valores de a_w diferentes dependendo do tipo de produto. Por exemplo, os produtos secos ao ar normalmente apresentam valores de a_w baixos, entre 0,90 a 0,82; em contrapartida, os enchidos cozidos, uma vez que durante o processo de produção é adicionada água, apresentam valores de a_w altos de cerca de 0,97-0,98 (Feiner, 2006). Atendendo ao valor de a_w , os alimentos podem ser classificados em humidade elevada, intermédia e reduzida (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Classificação de Alimentos e medidas de controlo com base na atividade da água

Atividade da água (a_w)	Classificação	Medidas de controlo do crescimento microbiano
Valores > 0,85	Humidade elevada	Refrigeração
Entre 0,60 e 0,85	Humidade intermédia	Não requer refrigeração, prazo de validade limitado devido à deterioração por leveduras e bolores
Valores < 0,60	Humidade reduzida	Prazo de validade longa, mesmo sem refrigeração

Fonte de elaboração: FDA (2016).

Assim sendo, alimentos com elevada humidade ($a_w > 0,85$) são considerados perecíveis e, portanto, necessitam de refrigeração ou outra barreira para controlar o desenvolvimento de microrganismos; enquanto os alimentos com humidade intermédia ($0,60 < a_w < 0,85$) não precisam de refrigeração para controlar patógenos. Contudo, podem

ter um prazo de validade limitado devido à deterioração, principalmente por leveduras e bolores. Já os alimentos com humidade reduzida ($a_w < 0,60$) são considerados estáveis do ponto de vista microbiológico, têm uma vida útil prolongada, mesmo sem refrigeração (FDA, 2016). Conforme os valores de a_w da Tabela 4, a alheira pode ser considerada como um alimento de humidade elevada, e desse modo, para evitar o crescimento microbiano é necessário que seja conservada sob refrigeração.

2.7.2. pH

O pH assim como a a_w é um dos parâmetros fundamentais para a estabilidade da carne e dos produtos cárneos (Feiner, 2006). Para conseguir essa estabilidade, é necessário que o pH seja reduzido por forma a inibir o crescimento da maioria dos microrganismos (Russell & Gould, 2012). A inibição pode ser conseguida aumentando a acidez (reduzindo o pH) pela adição de ácidos orgânicos ou através da fermentação láctica, embora, algumas bactérias patogénicas, em particular, a *E. coli* O157:H7, podem sobreviver em condições ácidas por longos períodos de tempo, mesmo que seu crescimento seja inibido (FDA, 2016; Russell & Gould, 2012). A carne fresca tem um pH em torno de 5,8 - 6,0; contudo, durante o processo da fermentação, nos produtos à base da carne, este pH tende a reduzir até níveis entre 4,2 e 5,5, dependendo do tipo de produto (Ockerman & Basu, 2014).

Relativamente a alheira, vários estudos foram efetuados por diferentes autores que obtiveram valores médios de pH entre 3,90 e 5,60 (Tabela 3). Assim, a alheira pode ser considerada um alimento de acidez reduzida, no entanto em alguns casos pode apresentar acidez elevada. Do ponto de vista microbiológico, a alheira pode ser considerada um alimento suscetível à maioria de patógenos tendo em conta que, o pH mínimo para o crescimento da maioria destes ronda em torno de 4,0 (exemplo, *Staphylococcus aureus*) a 5,8 (ex. *Clostridium perfringens*) (FDA, 2016). Portanto, durante o processo de fabrico, os produtores de alheira devem assegurar-se não somente de manter as boas práticas de higiene, se não também de obter uma rápida queda de pH, para inibir os microrganismos patogénicos se estiverem presentes.

2.7.3. Temperatura de conservação

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o crescimento microbiano (Fellows, 2018). O crescimento bacteriano pode ser classificado de acordo com a temperatura máxima (Tabela 2.5). Os hipertermófilos são capazes de crescer a temperaturas altas, relativamente acima de 100°C, enquanto os termófilos conseguem crescer a temperaturas de 55°C. Já os mesófilos crescem a temperatura ambiente ou próximo, e os psicrófilos temperaturas de refrigeração ou próximas. Os psicotróficos são capazes de crescer a temperaturas de refrigeração, contudo, a sua temperatura ótima de crescimento está na faixa mesofílica (Fellows, 2018; FDA, 2016). A temperaturas inferiores a 12°C as *Salmonella* spp. é inibida, mas em contrapartida, a *Listeria monocytogenes* pode crescer de 1° a 20°C. O armazenamento dos alimentos a baixas temperaturas tem como principal objetivo minimizar as reações de degradação dos produtos e limitar o desenvolvimento microbiano (Salavessa, 2009), contudo, o armazenamento refrigerado prolongado pode permitir o crescimento de *L. monocytogenes* em produtos à base de carne (Brown, 2000).

Tabela 2.5: Tipos de microrganismos em função à temperatura de crescimento

Grupo	Temperatura (°C)		
	Mínimo	Ótimo	Máximo
Psicrófilos	(-10) - 5	12 - 18	15 - 20
Psicotróficos	(-5) - 5	20 - 30	30 - 35
Mesofilos	5 - 15	30 - 45	35 - 47
Termófilos	40 - 45	55 - 75	60 - 90
Hipertermófilos	80	90 - 100	100 - 120

Fonte de elaboração: Fellows (2018) e FDA (2016)

2.8. Microbiologia Associada à Produção de Alheiras

Os produtos cárneos são alimentos ricos em nutrientes e, portanto, constituem meios de cultura ótimos para o desenvolvimento de microrganismos (Adams & Moss, 2008; Forsythe, 2010). Os microrganismos responsáveis pela deterioração incluem

Pseudomonas spp., *Shewanella* spp., *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido-lácticas (LAB), psicotróficos, leveduras e bolores (ICMSF, 2005). Dentre os principais microrganismos patogênicos que podem constituir um risco para produtos à base de carne incluem: *Trichinella spiralis*, *Escherichia coli* O157:7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, entre outros. Alguns patógenos como as *Salmonellas*, são invasivos e podem atravessar a parede intestinal até a corrente sanguínea e causar infecções generalizadas. Outros como *E. coli* O157:H7 produzem toxinas nos alimentos podendo chegar a causar graves danos em órgãos, como por exemplo, nos rins (Forsythe, 2010) .

O relatório da União Europeia de 2017 (EFSA & ECDC, 2018) indica que os principais microrganismos causadores de doenças de origem alimentar são: *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter*, e toxinas bacterianas, entre outros. Contudo, a *Salmonella* tem sido frequentemente apontada como sendo o patógeno causador da grande maioria dos surtos. Mais ainda, a análise de surtos de doenças de origem alimentar realizada a nível da União Europeia em 2017, indica que 60% dos casos registados devem-se a produtos de origem alimentar, onde a carne e produtos cárneos aparecem em primeiro lugar (EFSA & ECDC, 2018).

Os autores Borgi (2019), Ferreira et al. (2007) e Magalhães et al. (2011) foram unânimes ao afirmar que, as alheiras estão associadas a presença ocasional de patógenos provenientes das matérias-primas e de falhas na aplicação das boas práticas de higiene durante o processo de fabrico. Cabe ressaltar que a alheira é um produto sujeito a elevada manipulação ao longo da sua produção.

2.8.1. Bactérias mesófilas

Os mesófilos são microrganismos que crescem a temperaturas moderadas entre 20 e 45°C, com um ótimo na faixa de 30 a 39°C (Bradley & Bush, 2019; Schiraldi & De Rosa, 2016). A presença de microrganismos mesófilos nos alimentos reflete a qualidade sanitária dos produtos analisados, indicando, além das condições higiénicas da matéria-prima, a maneira como foram manuseadas durante a sua preparação (Anderson & Calderón y Pascual, 2010). Dentro do grupo das bactérias patogênicas mesófilicas

encontram-se, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* entre outros (Bradley & Bush, 2019; Schiraldi & De Rosa, 2016).

2.8.2. *Coliformes totais e fecais*

Os coliformes totais são um grupo de bactérias Gram-negativas, sem formação de esporos, em forma de bastonete que fermentam a lactose a 35°C em 24 a 48 h (Andrews, 1992; Feng et al., 2019). O grupo de coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*, podem ser encontrados distribuídos na natureza assim como no intestino do homem e outros animais de sangue quente (Silva et al., 2017). Embora em grande parte estas bactérias sejam inofensivas, a sua presença ou detecção é de extrema importância uma vez que, é um indicativo de uma possível falha de sanitização no processo de fabrico ou contaminação dos produtos alimentares no ambiente de processamento (Feng et al., 2019; Silva et al., 2017).

Os coliformes termotolerantes (fecais) são um bom exemplo de coliformes totais. É um subgrupo que pode ser encontrado no intestino e nas fezes de animais de sangue quente. Estes, ao contrário dos coliformes totais, fermentam a lactose a 44,5-45,5°C com produção de gás (Silva et al., 2017). Um exemplo de coliformes fecais é *E. coli*, mas alguns outros entéricos, como *Klebsiella*, podem fermentar a lactose nessas temperaturas e, portanto, serem considerados coliformes fecais (Feng et al., 2019).

2.8.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, móvel por flagelos peritricos e não possui esporos. Pertence à família das *Enterobacteriaceae* e fermenta a glicose com produção de ácido e gás (Adams & Moss, 2008; Willshaw et al., 2000). Está incluído tanto no grupo dos coliformes totais quanto no dos coliformes fecais (Silva et al., 2017). As estirpes de *E. coli* conseguem crescer numa ampla faixa de temperaturas entre 7-10°C a 50°C, com um ótimo em torno de 37°C. Pode resistir ao aquecimento a temperaturas de 55°C durante 60 minutos e até 60°C durante 15 minutos, e pode sobreviver ao congelamento por longos períodos (Adams & Moss, 2008; Willshaw et al., 2000). Um pH quase neutro é ideal para o seu crescimento, mas é

possível diminuir o crescimento para pH 4,4 sob condições ótimas. A a_w mínima para o seu crescimento é de 0,95 (Adams & Moss, 2008).

O habitat natural da *E. coli* é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais. Sua detecção em alimentos serve como um índice de contaminação fecal dos mesmos (Feng et al., 2019; Anderson & Calderón, 2010; Silva et al., 2017). Vários estudos têm mostrado que por se tratar de um organismo hospedeiro do intestino de animais, *E. coli* pode ser encontrado em carnes e diferentes produtos cárneos (Gordillo et al., 2011; Kegode et al., 2008), e em particular nas alheiras (Ferreira et al., 2006, 2007; Silva et al., 2019). Os autores apontaram que a causa da contaminação provavelmente provenha da falta de higiene ou controlo durante o processo de produção.

2.8.4. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria esférica anaeróbica gram-positiva e facultativa não móvel, catalase positiva, que não forma esporos. O seu crescimento pode ocorrer a uma faixa de temperaturas entre 7° a 48,5°C com um ótimo entre 30 a 37°C. *S. aureus* cresce melhor a valores de pH entre 4 a 10, sendo ótimo entre pH 6 a 7,5 (Ed-Dra et al., 2018). *S. aureus* é uma bactéria reconhecida pela sua elevada osmotolerância o que lhe permite crescer em ambientes com uma a_w superior a 0,86 e com uma concentração de NaCl entre 5 e 7% (algumas estirpes crescem a concentrações de NaCl de 20%). A produção de enterotoxina ocorre em ambientes em que as concentrações de NaCl se situam entre 0-20% e em que os valores de a_w são superiores a 0,87. Em alimentos armazenados a temperaturas inferiores que 20 °C o seu crescimento é inibido a 15% de NaCl. Sobrevive bem ao congelamento e a -18 °C em carnes e aves por pelo menos 6 meses com pouca ou nenhuma alteração no número de células (Baird-Parker, 2000).

É um microrganismo que ocorre principalmente na maioria das mucosas e na pele dos animais de sangue quente (Salavessa, 2009), e portanto, pode ser encontrado nas mãos dos operadores na indústria alimentar. É tolerante à seca e é capaz de sobreviver em ambientes estressantes, podendo instalar-se em equipamentos, em especial em zonas de difícil acesso (Kadariya et al., 2014; Salavessa, 2009). É uma espécie muito sensível a ação do calor e aos desinfetantes, portanto, a sua presença ou

das suas toxinas nos alimentos pode ser visto como sinónimo da falta de higiene (Anderson & Calderón y Pascual, 2010).

S. aureus é um patógeno oportunista que pode causar amplo espectro de infeções, desde infeções superficiais da pele a doenças invasivas graves e potencialmente fatais (Kadariya et al., 2014). É uma das bactérias causadoras de doenças de origem alimentar mais tolerantes à baixa atividade de água, podendo crescer a níveis bem abaixo dos de outras bactérias patogénicas de origem alimentar (Baird-Parker, 2000).

A nível mundial, é considerado o terceiro patógeno comum que causa intoxicação alimentar (Ed-Dra et al., 2018). Vários casos de intoxicações por *S. aureus* foram associados a produtos de origem animal, entre os quais, o queijo, ovos, carne e produtos cárneos. A causa mais frequente desses incidentes foi a preparação de alimentos cozidos bem antes do consumo, seguida de manuseio e armazenamento inadequados (Baird-Parker, 2000; EFSA & ECDC, 2018). Este patógeno tem sido encontrado nas alheiras (Ferreira et al., 2007; Silva et al., 2019), provavelmente como resultado da contaminação cruzada devido a manipulação inadequada.

2.8.5. *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é uma bactéria patogénica da família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativa e facultativa anaeróbica, em forma de bastonete, não forma esporos, geralmente move-se por flagelos peritricos. Fermenta a glucose com formação de gás e reduz nitratos a nitritos (Anderson & Calderón, 2010; USDA & FSIS, 2012). A *Salmonella* é sensível ao calor, e, portanto, facilmente destruída com os tratamentos térmicos suaves (aquecimento a 63 °C). Cresce a temperaturas entre 5 a 47°C, a valores de pH em torno de 4,2 e a valores de a_w superiores a 0,94 (USDA & FSIS, 2012). Como é um microrganismo entérico associado ao trato gastro intestinal da maioria de animais domésticos, a *Salmonella* spp. está potencialmente presente na maioria das carnes cruas e seus produtos (Anderson & Calderón y Pascual, 2010).

A potencial sobrevivência de *Salmonella* sob condições ambientais extremas é uma grande preocupação de saúde pública. É que, para além de poder sobreviver em ambientes de baixo pH, também podem sobreviver em alimentos naturalmente ácidos e fermentados, o que é particularmente preocupante, uma vez que, em algumas

circunstâncias, a dose infecciosa para humanos pode ser baixa (D'Aoust, 2000). A *Salmonella* spp. é considerada uma das principais causas de doenças bacterianas transmitidas por alimentos na União Europeia. Existem vários relatos de surtos de *Salmonella* cujo consumo de produtos de origem animal tem sido considerado o principal veículo de transmissão (D'Aoust, 2000; EFSA & ECDC, 2018).

A sua presença em produtos cárneos fumados e de salsicharia portuguesa incluindo a alheira foi relatada por Almeida et al. (1999). Nesse estudo, 462 amostras foram submetidas à análise, tendo detetado a presença de *Salmonella* em 2,2% do total das amostras analisadas dos quais 2/3 correspondiam as alheiras. Contudo, os autores concluíram que a percentagem era baixa comparativamente a encontrada em outros produtos de origem animal. Noutro estudo, Ferreira et al., (2007) detetaram a presença de *Salmonella* spp. em 2 lotes de um total de 38 lotes de amostras de alheiras provenientes de diferentes produtores industriais.

Num estudo mais recente, Borgi (2019) isolou *Salmonella* spp. em 10 amostras de alheiras de um total de 52 amostras (incidência de 19.2%; IC 95%: 10.8 – 31.9%), e encontrou que os serotipos mais comuns pertencem a Typhimurium (60.6%) e a Enteritidis (9.1%), o qual indica que a contaminação muito provavelmente provenha da carne de porco e de frango por contaminação cruzada e más práticas dos operários.

2.8.6. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica, formadora de esporos, encapsulada, não móvel e em forma de bastonete (Adams & Moss, 2008; Hayes, 2013; Labbé, 2000). O seu crescimento ocorre na faixa de temperaturas de 12 a 50°C, embora, seja muito lento abaixo de cerca de 20°C. Na temperatura ideal, 43 - 47°C, o crescimento é extremamente rápido, com um tempo de geração de apenas 7,1 min a 41°C (Adams & Moss, 2008). *C. perfringens* cresce a uma faixa de pH entre 5,0 a 9,0, com o ótimo a níveis de pH entre 6,0 e 7,0. Relativamente a a_w , comparado com *S. aureus*, o *C. perfringens* não é tolerante a baixos níveis de a_w . O limite mínimo para o seu crescimento ocorre entre 0,95 e 0,97 dependendo do “humectante”. São necessárias concentrações de 7% a 8% de NaCl para inibir o crescimento da maioria das estirpes de *C. perfringens*, embora ocorra alguma inibição a 5% a 6% de NaCl (Labbé, 2000).

A espécie é classificada por 5 tipos de estirpes A, B, C, D e E. As estirpes do tipo A fazem parte da microflora do solo e do trato gastro intestinal (Adams & Moss, 2008; Hayes, 2013) e são responsáveis por intoxicações alimentares. A maioria das estirpes produz uma toxina (lecitinase, fosfolipase C). Os alimentos proteicos crus de origem animal são muito mais propensos a conter células vegetativas ou esporos do organismo do que os alimentos processados. Já foi isolado em diferentes carcaças de carne; contudo, a sua capacidade de sobreviver ao cozimento é o principal fator que contribui para o seu envolvimento em doenças transmitidas por alimentos (Labbé, 2000; USDA & FSIS, 2012).

A intoxicação por *C. perfringens* é normalmente causada pelo consumo de alimentos cozinhados e que após o tratamento térmico foram arrefecidos e conservados de forma inadequada (Salavessa, 2009). Quando os alimentos são arrefecidos os esporos germinam e multiplicam-se, e se o alimento for ingerido sem reaquecimento adequado, o *C. perfringens* entra no intestino delgado e sintetiza as enterotoxinas (USDA & FSIS, 2012).

3. METODOLOGIA

O trabalho experimental decorreu nos Laboratórios de Bromatologia e de Bacteriologia do Centro de Investigação de Montanha (CIMO) do Instituto Politécnico de Bragança (IPB). O trabalho experimental foi desenvolvido através da realização de dois estudos. No Estudo 1, foram avaliadas as características físico-químicas e microbiológicas de alheiras artesanais ao longo do processo de fabrico de dois produtores locais. Assim, neste estudo as alheiras foram produzidas nas duas empresas que acederam a colaborar neste projeto de investigação. No Estudo 2, foi efetuado um mapa de qualidade composicional e microbiológico de um conjunto de alheiras produzidas e comercializadas na região de Trás-os-Montes, pelo que recorreremos à aquisição de amostras de alheiras em diversas lojas da região.

3.1. Amostragem das Alheiras

3.1.1. Estudo 1: Características ao longo do processo do fabrico

No estudo 1 a amostragem foi efetuada em duas cozinhas regionais de produção de alheiras da Terra Fria Transmontana, uma no concelho de Vinhais e outra no concelho de Bragança (Tabela 3.1). Na Cozinha de Vinhais, foram amostradas 45 alheiras de 3 lotes produzidos de 9 de Dezembro de 2019 a 11 de Março de 2020. De cada um dos lotes foram recolhidas 15 alheiras em três tempos do processo de fabrico. A primeira amostragem (T0, 5 alheiras) foi efetuada imediatamente após o enchimento, a segunda amostragem (T1, 5 alheiras) foi efetuada no meio do processo de fabrico, correspondente ao sétimo dia de maturação, e a terceira amostragem (T2, 5 alheiras) foi efetuada no final do processo de fabrico, correspondente ao décimo-quarto dia. Na Cozinha de Bragança, foram amostradas apenas 30 alheiras, em virtude da paragem forçada decorrente do surto de COVID-19, procedente de 2 lotes produzidos de 14 de Fevereiro a 12 de Março de 2020. Tal como na Cozinha de Vinhais, de cada um dos lotes foram recolhidas 15 alheiras em três tempos do processo de fabrico. A primeira

amostragem (T0, 5 alheiras) foi efetuada imediatamente após o enchimento, a segunda amostragem (T1, 5 alheiras) foi efetuada no meio do processo de fabrico, correspondente ao quarto dia de maturação, e a terceira amostragem (T2, 5 alheiras) foi efetuada no final do processo de fabrico, correspondente ao sétimo dia. Em ambas as cozinhas, no dia de fabrico (T0) foram também recolhidas amostras de tripas lavadas, pimentão, e carne de porco e carne de frango imediatamente antes da mistura dos ingredientes. Isto foi efetuado para cada um dos lotes.

Tabela 3.1: Descrição da amostragem das alheiras nas Cozinhas de Vinhais e de Bragança

LOTE	Cozinha				
	VINHAIS			BRAGANÇA	
	Etapa do processo	n*	Data da colheita	n*	Data da colheita
1	Massa	5	9/12/2019	5	14/02/2020
	Meio da maturação	5	13/12/2019	5	19/02/2020
	Produto final	5	19/12/2019	5	26/02/2020
2	Massa	5	21/01/2020	5	06/03/2020
	Meio da maturação	5	27/01/2020	5	11/03/2020
	Produto final	5	04/02/2020	5	12/03/2020
3	Massa	5	27/02/2020	-	-
	Meio da maturação	5	03/03/2020	-	-
	Produto final	5	11/03/2020	-	-
	TOTAL	45		30	

(*)Número de amostras de alheiras

3.1.2. Estudo 2: Mapa de qualidade composicional e microbiológica

O Estudo 2 teve como objetivo elaborar um mapa de qualidade composicional e microbiológico de um conjunto de alheiras produzidas e comercializadas na região de Trás-os-Montes. Para tal efeito, foram adquiridas 5 alheiras de um mesmo lote de produção, de 15 produtores regionais. Todavia, apenas podemos apresentar os resultados de 6 produtores, uma vez que tivemos de interromper as análises laboratoriais em virtude da pandemia COVID-19. Os concelhos de procedência das alheiras artesanais e as datas de análise mostram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Descrição das amostras de alheiras recolhidas nos mercados locais

Produtor	Concelho	Data da análise	n*
1	Vinhais 1	17/02/2020	5
2	Chaves	17/02/2020	5
3	Vimioso	02/03/2020	5
4	Mirandela	09/03/2020	5
5	Mogadouro	12/05/2020	5
6	Vinhais 2	12/05/2020	5
Total			30

(*)Número de amostras de alheiras

3.2. Análises Microbiológicas

3.2.1. Preparação da amostra

Todos os instrumentos e utensílios utilizados nas análises microbiológicas foram esterilizados antes da sua utilização e todas as análises foram efetuadas em condições de assepsia. De cada alheira, foi recolhida uma amostra de 25 gramas que foi colocada em bolsa estéril, a qual se adicionou 225 ml de água peptonada (BPW, 611014, Liofilchem, Itália) e foi homogeneizada num *stomacher* (BagMixer 400, França). Diluições decimais em BPW foram feitas até 10^{-6} .

3.2.2. Contagem total de aeróbios mesófilos

Os microrganismos aeróbios mesófilos foram determinados utilizando o ágar Plate Count Agar (PCA, 610040, Liofilchem, Itália). Efetuou-se a inoculação de 1 mL de cada diluição decimal nas placas petri e incorporou-se o PCA mantido em 45°C. Depois de o ágar solidificar, as placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 1 h. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g) da amostra analisada (Horwitz & Latimer, 2016); e cada amostra foi analisada em duplicado. A Figura 3.1 exemplifica as colónias típicas que cresceram em ágar PCA. Teve-se cuidado em não contar colónias com morfologia de leveduras.

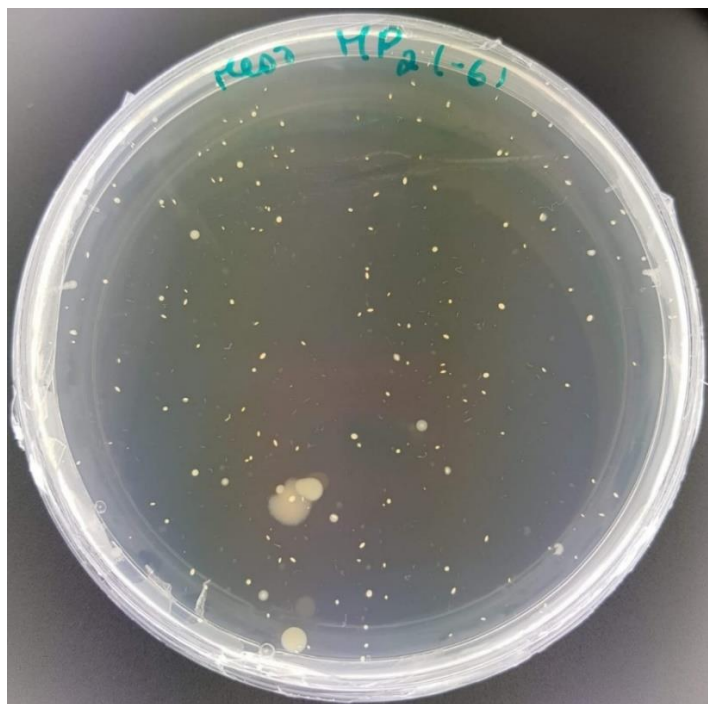


Figura 3.1: Exemplo de colónias típicas de microrganismos mesófilos em Ágar Plate Count. Fotografia tirada pela autora.

3.2.3. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

Alíquotas de 1 ml do homogeneizado foram inoculadas em placas petrifilm (Petrifilm™ Coliform Count Plates, 3M™, USA) e incubadas a 35 °C por 24 h. As colónias de coliformes totais foram contadas como colónias vermelhas acompanhadas de borbulhas de gás, enquanto as de *E. coli* como colónias azuis. Os resultados foram expressos em ufc/g da amostra analisada; e cada amostra foi analisada em duplicado.

3.2.4. Pesquisa de *Salmonella spp*

A pesquisa de *Salmonella spp.* foi efetuada seguindo o método BAM/FDA:2016. Após a homogeneização, o homogeneizado deixou-se repousar durante 60 minutos a temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se ao pré-enriquecimento por incubação a 35°C durante 24±1 h. Para o enriquecimento, a tubos contendo os caldos Tetrionato (TT, 610183, Liofilchem, Itália) e Rappaport-Vassiliadis (RV, 610175, Liofilchem, Itália) adicionaram-se 1 ml e 0,1 ml da amostra pré-enriquecida, e incubaram-se durante 24 h a 35 °C e 42 °C, respectivamente. Passadas as 24 horas de incubação, agitaram-se os tubos em vórtex e com uma alça

procedeu-se ao estriamento em placas previamente preparadas com ágar Entérico de Hektoen (HE, 610021, Liofilchem, Itália), ágar bismuto sulfito (BS, 610301, Liofilchem, Itália) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, DSHB3011, ALLANCE BIO EXPERTISE, França). Posteriormente, as placas invertidas foram incubadas a 35°C durante 24 h. As colónias típicas foram confirmadas após purificação utilizando o kit serológico *Salmonella* Latex kit (SLK, 96151, Liofilchem, Itália) (Andrews et al., 2020). A análise de *Salmonella* spp. foi realizada em duplicado.

3.2.5. Contagem de *Staphylococcus aureus*

A partir do homogeneizado, efetuou-se o plaqueamento em superfície de 0,1 ml de cada diluição nas placas com ágar Baird-Parker (BP, 610004, Liofilchem, Itália), previamente preparadas com o suplemento Egg Yolk Tellurite (EYT, 80122, Liofilchem, Itália) conforme a norma ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003. As placas foram incubadas invertidas a 35±1 °C durante 48±2 h. As colónias típicas de *S. aureus* foram contadas e o resultado expresso em ufc/g; e cada amostra foi analisada em duplicado. A Figura 3.2 mostra as colónias típicas com halo que desenvolveram em ágar BP.

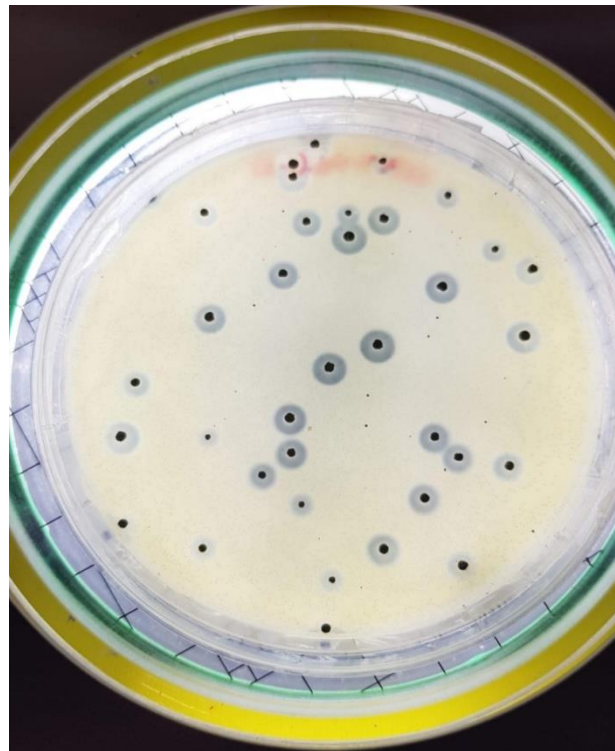


Figura 3.2: Exemplo de colónias típicas de *S. aureus* com halo que desenvolveram em ágar BP. Fotografia tirada pela autora.

3.2.6. Contagem de *Clostridium perfringens*

A contagem de *Clostridium perfringens* foi realizada de acordo com o método APHA 33.72:2015. Um mL das diluições decimais foram semeadas em profundidade em placas de Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC, DSHB3042, ALLIANCE BIO EXPERTISE, França) enriquecidas com suplemento de gema de ovo (EY, 80019 ou 80219, Liofilchem, Itália). Após solidificar, as placas foram incubadas, sem inverter, a 35-37 °C durante 18-24 h em atmosfera anaeróbica. As colônias presuntivas de *C. perfringens* (Figura 3.3) foram contadas e o resultado expresso em ufc/g da amostra. Cada amostra de alheira foi analisada em duplicado.

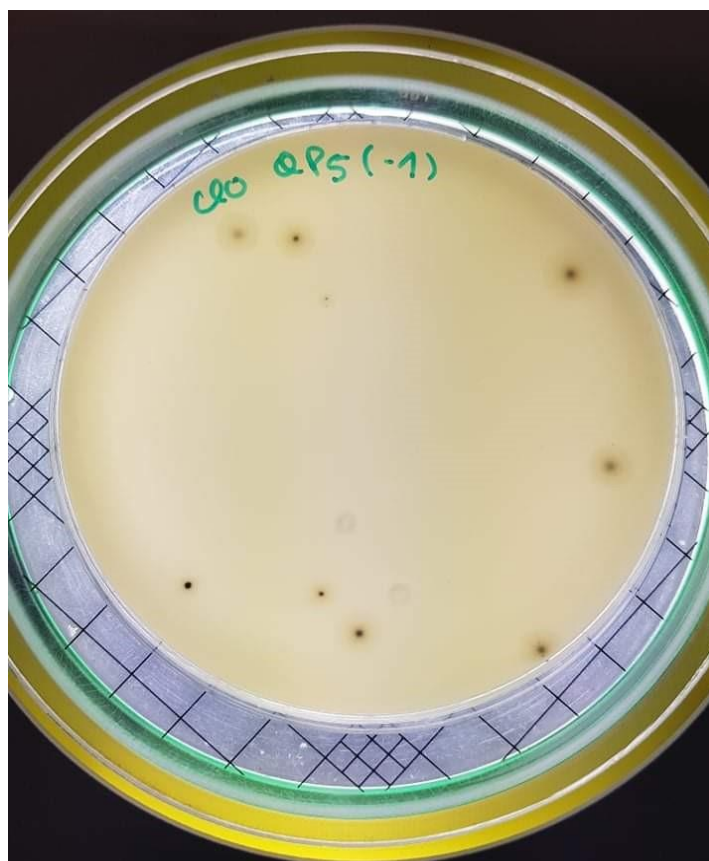


Figura 3.3: Exemplo das colônias presuntivas de *C. perfringens*. Fotografia tirada pela autora.

3.3. Análises Físico-Químicas

3.3.1. Preparação da amostra

Imediatamente após a receção das amostras no laboratório de Bromatologia do CIMO, retiraram-se as tripas de cada alheira e procedeu-se a homogeneização individual numa trituradora até formação duma pasta. Obtida a pasta da alheira, procedeu-se a análise das características intrínsecas (pH e a_w). Após a leitura do pH e a_w , cada amostra foi separada em dois sacos de congelação, pesada e congelada. A amostra congelada foi submetida à liofilização. Depois de liofilizada, a amostra foi pesada e por diferença obteve-se o teor de humidade da alheira, (equação (i) na Subsecção 3.3.4). Por fim, a amostra foi triturada para obtenção de pó e conservada em frascos bem identificados para posterior análise da composição química dos parâmetros (matéria seca, cinzas, proteína bruta e gordura bruta), como mostra a Figura 3.

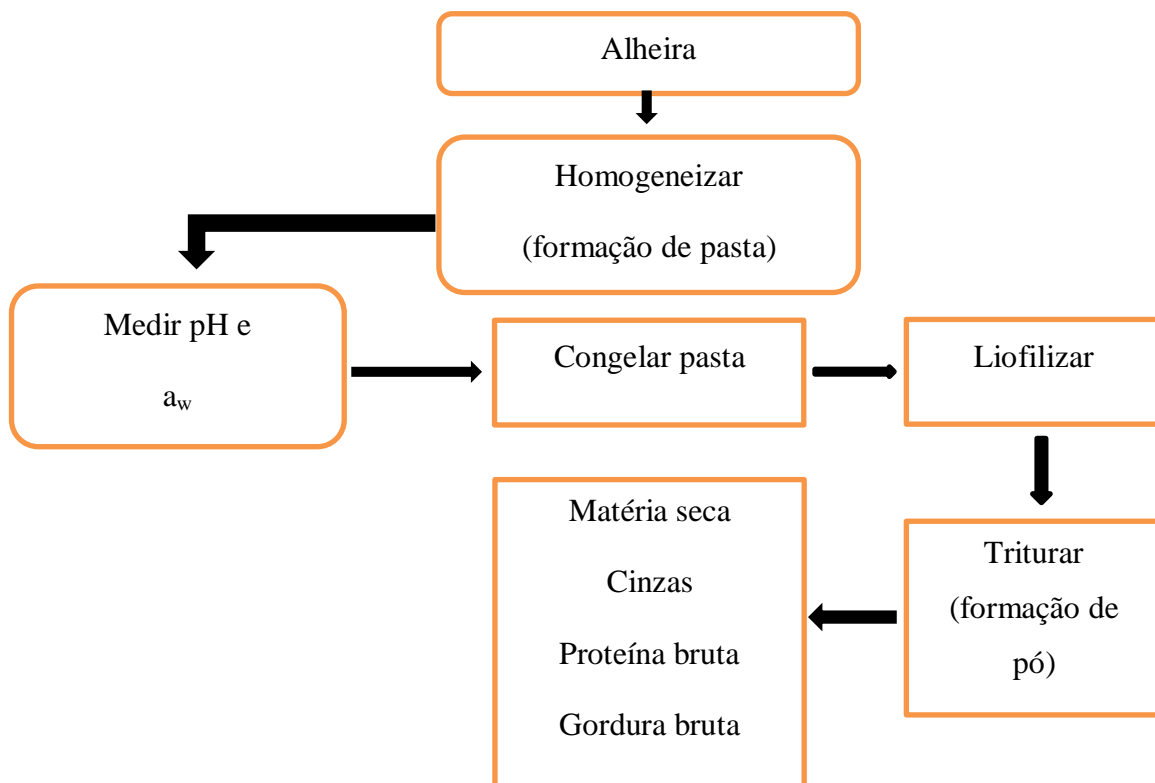


Figura 3.4. Esquema da preparação das amostras para análises físico-químicas

3.3.2. Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada recorrendo-se a um potenciômetro portátil (HANNA Instruments, HI5522, USA) contendo o eletrodo HI1131 (Figura 3.5). A análise foi realizada por introdução direta do eletrodo na pasta da alheira bem homogeneizada. O valor do pH foi obtido da média aritmética de três determinações.

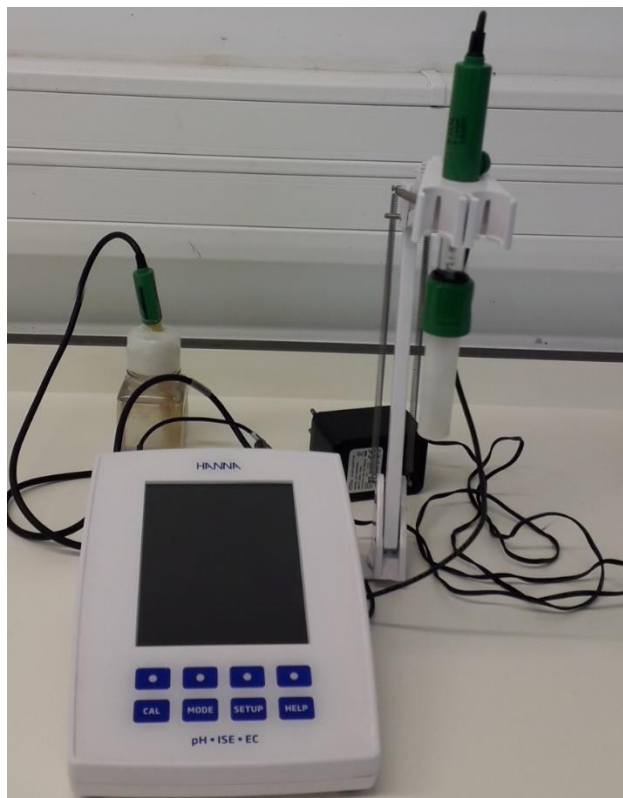


Figura 3.5: Potenciômetro (HANNA Instruments, HI5522) utilizado para medir o pH.

3.3.3. Determinação da atividade de água (a_w)

A determinação da a_w foi efetuada através de um higrômetro (Aqualab 4TE Decagon, USA) (Figura 3.6). Uma hora antes de dar início à análise o aparelho foi ligado para permitir a sua estabilização, posteriormente, foi efetuada a sua calibração com água destilada a temperatura ambiente. Após a confirmação da calibração, a amostra homogeneizada, foi colocada no medidor próprio de polietileno e em seguida introduzida no aparelho para posterior leitura da a_w . As determinações foram realizadas em triplicado.

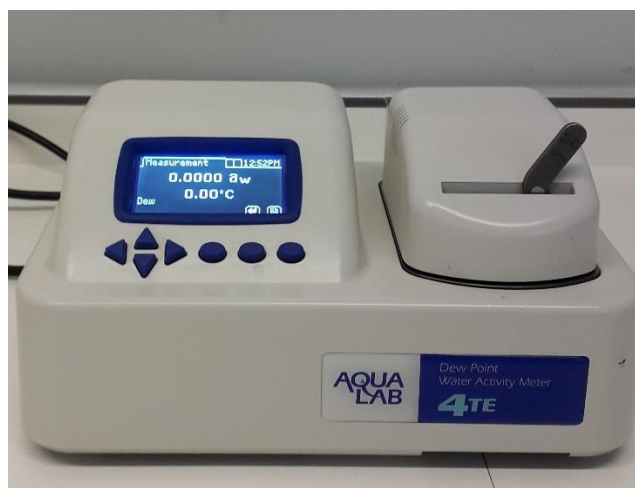


Figura 3.6: Medidor de a_w (Aqualab 4TE Decagon, USA) utilizado.

3.3.4. *Determinação do teor de humidade da alheira*

Para determinar o teor de humidade, considerou-se o total do peso da amostra de alheira homogeneizada (pasta) antes e depois da sua liofilização. Os resultados foram expressos em percentagem de massa, de acordo com:

$$\%Humidade = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100 \quad (i)$$

onde: P_0 é o peso fresco da alheira antes da liofilização; e P_1 é o peso seco da amostra após liofilização.

3.3.5. *Determinação da matéria seca da alheira liofilizada*

A determinação do teor de matéria seca da amostra liofilizada foi efetuada em estufa conforme descrito no método AOAC (2016). Pesaram-se cerca de 2,0 g da amostra de alheira liofilizada em cadinhos de porcelana, previamente secos em estufa e arrefecidos no exsiccador. A amostra foi submetida ao processo de aquecimento direto na estufa (IVYMEN, Furnace N-8L, França) regulada a $105 \pm 5^\circ\text{C}$ para a remoção da água. Esta análise foi realizada em duplicado, e os resultados foram expressos em percentagem, de acordo com:

$$\%Matéria\ Seca = \frac{(P_1 - P_{cv})}{(P_0)} \times 100 \quad (ii)$$

onde: P_{cv} é o peso da cápsula vazia; P_1 é o peso da cápsula mais amostra após secagem; e P_0 é o peso da amostra inicial.

3.3.6. Determinação do teor de cinzas

A determinação das cinzas foi efetuada por gravimetria conforme descrito no método AOAC 923.03. O resíduo obtido após a obtenção da matéria seca, foi submetido ao processo de incineração em mufla marca (IVYMEN, Furnace N-8L, França, Figura 3.7) regulada à temperatura $550 \pm 15^\circ\text{C}$ durante 5 horas. A análise foi realizada em duplicado e os resultados expressos em percentagem de massa seca.



Figura 3.7: Mufla utilizada para determinação da matéria seca e cinzas.

3.3.7. Determinação do teor de gordura bruta

O teor de gordura foi determinado pelo método Soxhlet descrito no AOAC 920.85. Cerca de 1,5 g da amostra foi pesada em cartuchos de papel e com o solvente

éter de petróleo procedeu-se a extração da gordura bruta da alheira (Figura 3.8). O teor de gordura foi obtido pela razão da massa da gordura na amostra pela massa da amostra seca. Os resultados foram expressos em percentagem de massa seca, segundo a equação:

$$\text{Gordura} = \frac{(m_1 - m_0)}{m_a} \times 100 \quad (\text{iii})$$

onde: m_0 é o peso do tubo vazio; m_1 é o peso do tubo com amostra após a extração da gordura; e m_a é o peso da amostra.



Figura 3.8: Sistema Soxhlet utilizado para determinação da gordura bruta

3.3.8. Determinação do teor de proteína bruta

A determinação do teor de proteína bruta (Figura 3.9) foi realizada conforme descrito no método AOAC 978.04, utilizando o equipamento macro-Kjeldahl modelo (Pro-Nitro-A, JP Selecta, Espanha), que consiste de uma unidade de destilação e titulação automática. Para a digestão da amostra, pesaram-se cerca de 250 mg da amostra para os tubos de digestão, adicionaram-se 75 ml de H_2SO_4 concentrado e duas pastilhas (catalisador com 9% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Mineralizou-se a 200 °C durante 70

minutos. Após a completa digestão, adicionaram-se 25 ml de água destilada. O H_2SO_4 foi neutralizado pela adição de NaOH a 40%, seguida de destilação do amoníaco pela solução de H_3BO_3 a 10% contendo os indicadores azul de metileno e vermelho de metilo. Por fim, o anião de ácido bórico formado foi titulado pela solução de HCl padronizada numa concentração de 0,5 N. A proteína bruta total foi calculada por multiplicação do valor de azoto total obtido pelo fator de conversão 6,25. A análise foi efetuada em duplicado e os resultados foram expressos em percentagem de massa seca.

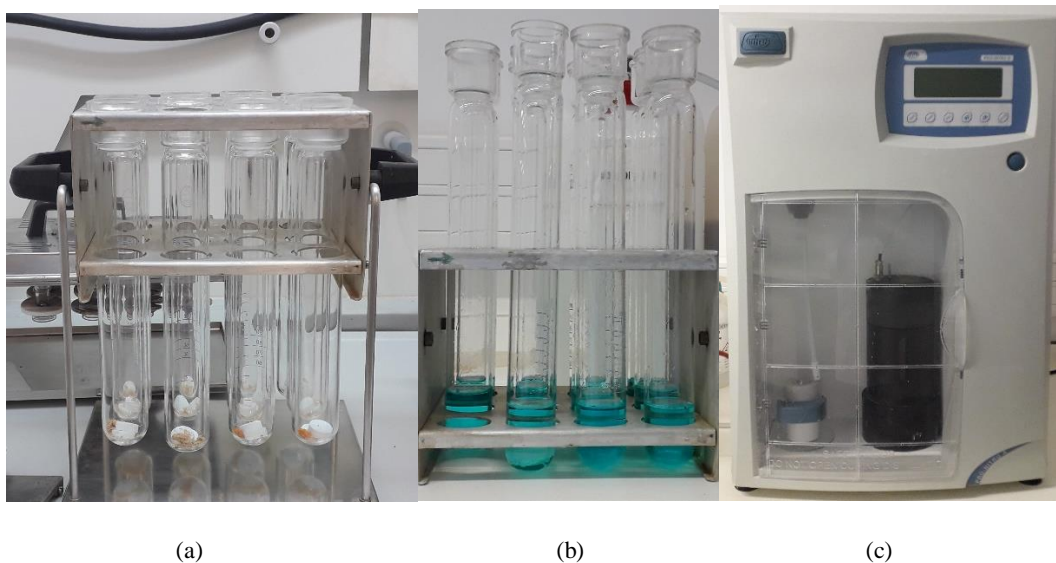


Figura 3.9: Mostra antes e após a digestão (a, b); Macro-Kjeldahl utilizado para determinação de proteína bruta (c)

3.4. Análise Estatística dos Dados

Os dados foram analisados com o software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2020). No Estudo 1, os efeitos do produtor i e da etapa de fabrico j das alheiras sobre os atributos físico-químicos e microbiológicos Y foram avaliados pelo modelo linear:

$$Y_{ij} = Produtor_i + Produtor_i(Etapa_j) + e_{ij} \quad (iv)$$

onde $Produtor_i(Etapa_j)$ representa o efeito de cada etapa j aninhada dentro do produtor i , e e_{ij} representa os erros que se distribuem como uma normal com média zero. Este modelo foi ajustado para cada um dos atributos físico-químicos e microbiológicos quantificados em alheiras (exceto para presença de *Salmonella* spp.) utilizando a função **lm()**. As médias ajustadas pelo método de mínimos quadrados (LSM) foram calculadas usando a livreria **emmeans**, as LSM foram comparadas par a par com a função **contrast()** e pelo teste de Tukey (Tukey's Honestly Significant Difference test). Para melhor perceber a interação entre os dois fatores em estudo, Produtor e Etapa, foram elaborados gráficos *boxplot* usando a livreria **ggplot2**. Estes gráficos condensam a informação relativa às estatísticas de localização (média e mediana) e estatísticas de dispersão (intervalos interquartis), bem como permite a detecção de pontos extremos (*outliers*). No caso da incidência de *Salmonella* spp. nas alheiras, os efeitos do produtor e das etapas de processo dentro de cada produtor foram avaliados separadamente mediante testes de chi-quadrado. As médias LSM dos grupos microbianos quantificados em cada um dos insumos (tripa, carnes e pimentão) foram comparadas pelo teste de Tukey para determinar diferenças significativas entre os produtores de Bragança e Vinhais.

No estudo 2, os atributos físico-químicos e microbiológicos das alheiras dos diferentes produtores foram comparados através de uma análise de variância com um só fator de variação (produtor). As médias LSM de cada atributo físico-químico e microbiológico (exceto presença de *Salmonella* spp.) foram submetidas a contraste múltipla utilizando a função **contrast()** para determinar diferenças significativas entre produtores. Com a finalidade de sumarizar a informação fornecida pelo conjunto de variáveis (atributos físico-químicos e microbiológicos) e entender tendências e associações entre as mesmas, os dados foram submetidos a uma análise de componentes principais usando a função **prcomp()** e a livreria **factoextra**. A partir desta análise multivariada, foi criado um mapa bi-dimensional da qualidade composicional e microbiológica das alheiras artesanais comercializadas em Trás-os-Montes. Tanto para o estudo 1 como para o estudo 2, o nível de significância α utilizado em todas análises foi 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Evolução das Propriedades Intrínsecas das Alheiras Artesanais ao Longo do Processo de Fabrico

Na Tabela 4.1 são apresentados os resultados (médias e intervalos de confiança ao 95%) das propriedades intrínsecas (pH, a_w e humidade) das alheiras ao longo do processo de fabrico dos dois produtores artesanais selecionados.

Tabela 4.1. Propriedades intrínsecas (pH, atividade da água a_w e humidade) das alheiras elaboradas em produtores artesanais de Bragança e Vinhais, por produtor e por etapa do processo dentro de cada produtor. Médias e intervalos de confiança ao 95%.

Procedência*		pH	a_w	Humidade (%)
Produtor	Bragança	5,42 ^a [5,32 – 5,53]	0,991 ^a [0,989 – 0,993]	51,9 ^a [51,1 – 52,6]
	Vinhais	5,54 ^b [5,46 – 5,63]	0,985 ^b [0,983 – 0,987]	48,9 ^b [48,3 – 49,5]
Produtor de Bragança	Massa	5,94 ^a [5,76 – 6,13]	0,992 ^a [0,989 – 0,995]	60,1 ^a [58,9 – 61,4]
	Meio processo	5,31 ^b [5,13 – 5,50]	0,990 ^a [0,987 – 0,993]	49,8 ^b [48,5 – 51,0]
	Produto final	5,01 ^b [4,83 – 5,19]	0,989 ^a [0,986 – 0,993]	45,7 ^c [44,4 – 46,9]
Produtor de Vinhais	Massa	5,98 ^a [5,83 – 6,13]	0,989 ^a [0,987 – 0,992]	57,0 ^a [56,0 – 58,0]
	Meio processo	5,51 ^b [5,36 – 5,66]	0,987 ^a [0,984 – 0,989]	48,9 ^b [47,9 – 50,0]
	Produto final	5,14 ^c [4,99 – 5,29]	0,978 ^b [0,975 – 0,981]	40,7 ^c [39,6 – 41,7]

^{a,b,c} Diferentes letras numa coluna dentro de um mesmo bloco indicam diferenças significativas ($\alpha=0,05$)

Da análise da Tabela 4.1. verifica-se que as alheiras do produtor de BRAGANÇA apresentaram menor ($p<0,05$) valor de pH (5,42 versus 5,54) e maiores ($p<0,05$) valores de a_w (0,991 versus 0,985) e humidade (51,9% versus 48,9%) que as alheiras do produtor de VINHAIS. Os valores de pH encontrados no presente estudo são superiores às médias obtidas por Patarata et al. (2008) e, mais recentemente, por Borgi (2019), 4,92 e 4,83, respectivamente. Porém, são próximos dos valores encontrados por Silva et al. (2019) em alheiras elaboradas com carne de leitão, os quais variaram entre 5,34 e 5,21. Já Pereira et al. (2012) obtiveram um valor de 6,07, portanto superior aos

resultados obtidos neste estudo. Sabendo que o pH ótimo para o crescimento da maioria dos microrganismos, associados aos alimentos, está na faixa de 6,5 a 7,5, e que alguns microrganismos patogênicos (por exemplo: *S. aureus*) podem desenvolver-se em condições ácidas (pH <4; FDA, 2016), constata-se que os valores de pH encontrados no presente estudo são ligeiramente elevados, pelo que podem permitir o crescimento da maioria dos microrganismos.

No que diz respeito a a_w , Silva et al. (2019) observaram nas alheiras elaboradas com diferentes tipos de carne, valores que variaram entre 0,968 e 0,998. Já os resultados encontrados no presente estudo corroboram os obtidos por Albano et al. (2009), os quais encontraram valores entre 0,982 e 0,987. Contudo, são superiores às médias reportadas por Patarata et al. (2008) e Esteves et al. (2008), de 0,960 e 0,930, respectivamente. Assim, os valores de a_w encontrados neste estudo são suficientemente elevados para permitir o desenvolvimento da maioria dos microrganismos saprófitos, bem como os patogênicos, uma vez que o desenvolvimento das bactérias é inibido com a_w abaixo de 0,90 (Fellows, 2018).

Relativamente ao teor de humidade, o valor médio encontrado nas alheiras do produtor de VINHAIS corrobora o valor (cerca de 49,0%) observado por Patarata et al. (2008). Por outro lado, vários autores têm reportado teor de humidade superior ao observado no presente estudo, a saber: 52,3% (Ferreira et al., 2006), entre 52,0 e 54,3% (Albano et al., 2009) e entre 56,06 e 56,84% (Barros et al., 2018).

No que concerne à evolução das características intrínsecas ao longo do processo de fabrico, os valores reportados na Tabela 4.1 e nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, evidenciam uma grande variabilidade e uma tendência de diminuição do pH, da a_w e do teor de humidade ao longo do processo de fabrico. Contudo, no produtor de BRAGANÇA observou-se que o pH diminuiu ($p < 0,05$) da massa até ao meio do processo 0,63 vezes e do meio do processo até ao fim do processo 0,30 vezes. Já no produtor de VINHAIS, o pH diminuiu ($p < 0,05$) 0,47 vezes da massa até o meio de processo e de 0,37 vezes do meio do processo até ao fim do processo. Em geral, a queda de pH entre o início da fermentação e o fim da maturação foi muito similar para os dois produtores, porém, mais expressiva nas alheiras do produtor de BRAGANÇA. Adicionalmente, as alheiras do produtor de BRAGANÇA apresentaram maior variabilidade em pH do que as alheiras do produtor de VINHAIS, as quais em acidez foram mais homogêneas (Figura 4.1).

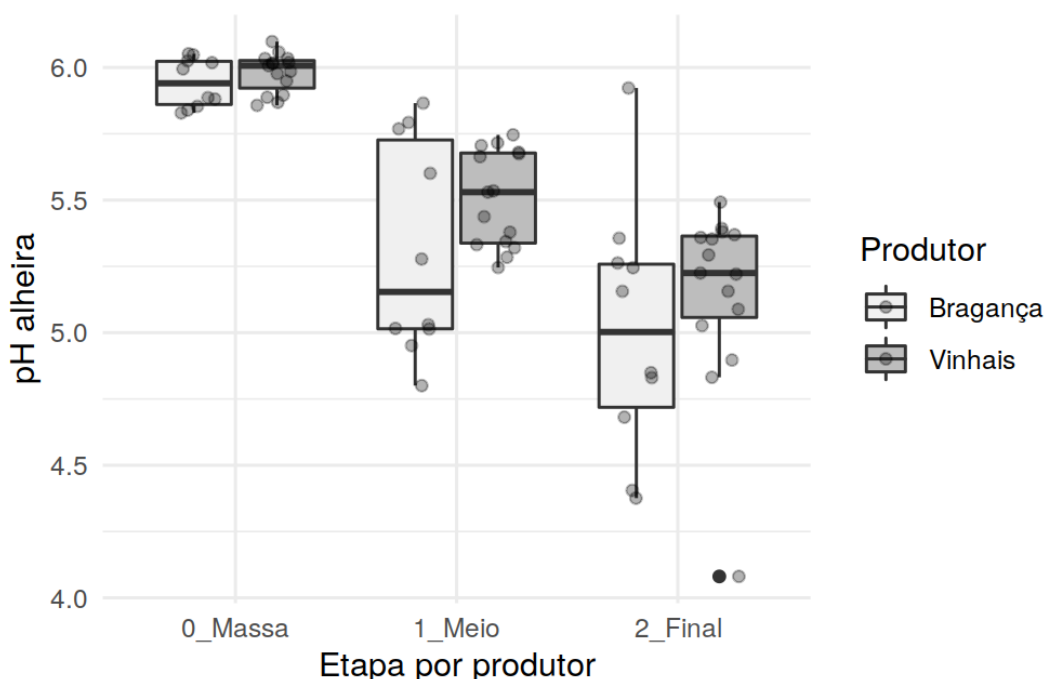


Figura 4.1: Evolução do pH das alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais. Massa: mistura imediatamente após enchimento; Meio: alheira na metade da maturação; Final: alheira terminada

Relativamente à evolução da a_w ao longo do processo de fabrico, na Figura 4.2 podemos observar que no produtor de VINHAIS a variação foi elevada nos três tempos de amostragem. Em contrapartida, no produtor de BRAGANÇA observou-se menor variabilidade na a_w nos três tempos de amostragem. Por esta razão, as alheiras do produtor de BRAGANÇA não apresentaram diferenças significativas na a_w entre as etapas de maturação (Tabela 4.1). Já para o produtor de VINHAIS, o produto final teve uma média (0,978) significativamente mais baixa que no meio do processo (0,987), a mesma que não diferiu significativamente da massa (0,989) (Tabela 4.1).

A variabilidade encontrada na a_w das alheiras entre os dois produtores deve-se em primeiro lugar à heterogeneidade da matéria-prima, podendo encontrar-se em alguns pontos proporções diferentes dos ingredientes e consequentemente causar essas diferenças. Outra possível causa pode ser encontrada no tempo de fabrico dos dois produtores, de facto o produtor de BRAGANÇA fabrica as alheiras em 7 dias, metade do tempo do produtor de VINHAIS (14 dias). Assim, as alheiras finais do produtor de VINHAIS tiveram uma a_w significativamente mais baixa que aquelas de BRAGANÇA (Figura 4.2).

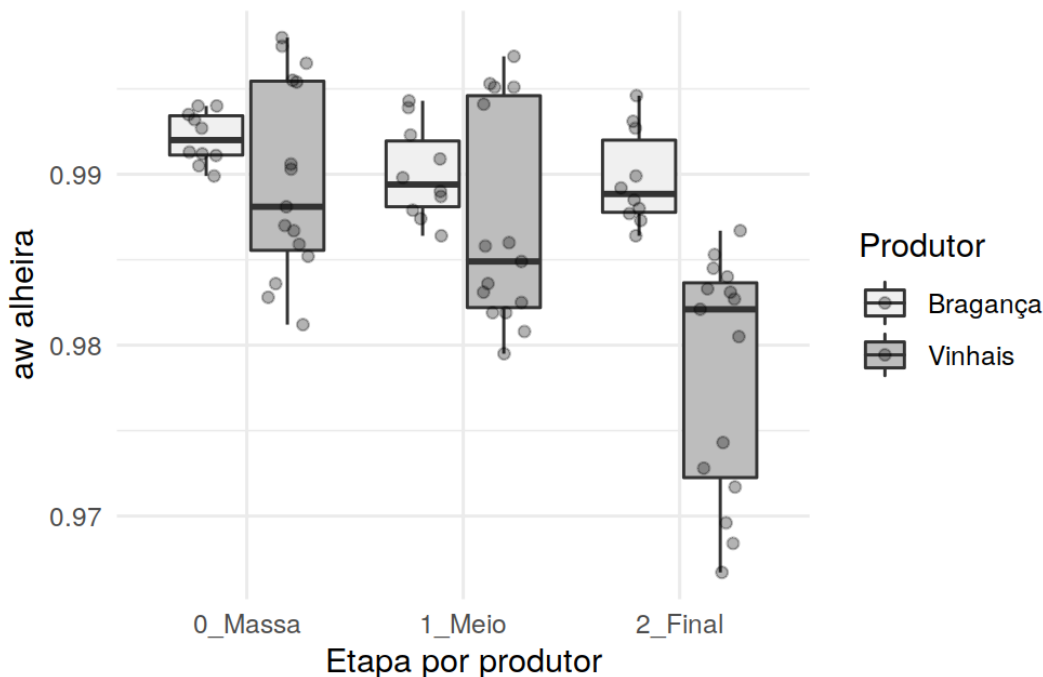


Figura 4.2: Evolução da atividade da água das alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais. Massa: mistura imediatamente após enchimento; Meio: alheira na metade da maturação; Final: alheira terminada

No que diz respeito ao teor de humidade, na Tabela 4.1 observa-se que a evolução ao longo do processo de fabrico nos dois produtores, diminuiu ($p < 0,05$) entre a massa e o meio do processo com uma variação de 10 unidades percentuais no produtor de BRAGANÇA e 8 de unidades percentuais no produtor de VINHAIS; e desde o meio do processo até o produto final com uma variação de 4 unidades percentuais no produtor de BRAGANÇA e 8 unidades percentuais no produtor de VINHAIS. Em geral, as alheiras do produtor de BRAGANÇA perderam menos água (menos 5%) durante o período de maturação. Esta diferença pode ser explicada primeiro pelo tempo de fabrico como descrito anteriormente, e pela localização das fábricas. A fábrica de VINHAIS se localizada numa zona mais fria e assim, permite a desidratação contínua e progressiva das alheiras durante os 14 dias de maturação (observa-se a tendência quase linear na Figura 4.3). Por outro lado, o produtor de BRAGANÇA desidrata as alheiras através da utilização de fogo, pelo que o processo de desidratação foi mais acelerado entre a massa e o meio do processo em comparação ao do produtor de VINHAIS (Figura 4.3).

Por último, atendendo ao pressuposto de que uma das barreiras para conseguir a estabilidade microbiológica das alheiras é garantindo o abaixamento do pH, da a_w e da humidade (Park, 2008; Patarata et al., 2008); com base nos resultados obtidos no presente estudo podemos afirmar que a segurança destas alheiras não pode ser assegurada. Apesar de se observar uma diminuição dos valores, esta não foi suficiente, uma vez que se encontraram alheiras com os valores de pH e a_w superiores a 5,0 e 0,90, respectivamente. Contudo, se compararmos os valores encontrados nos dois produtores podemos dizer que as alheiras do produtor de VINHAIS serão mais estáveis microbiologicamente do que as do produtor de BRAGANÇA.

4.2. Variabilidade da composição proximal das alheiras ao longo do processo de fabrico

Na Tabela 4.2 apresentamos os resultados da análise proximal (média e intervalos de confiança ao 95%) em base húmida (%BH) e em base seca (%BS) das alheiras produzidas por dois produtores artesanais.

Quando avaliadas na base húmida (BH), as alheiras do produtor de BRAGANÇA apresentam maiores ($p < 0,05$) teores de proteína bruta (9,82 versus 9,40) e de cinzas (1,47 versus 1,40) e menor ($p < 0,05$) teor de hidratos de carbono (14,2 versus 17,8) do que as alheiras do produtor de VINHAIS. Os teores em proteína bruta encontrados no nosso estudo corroboram os resultados obtidos por Pereira et al. (2012), que encontraram teor médio de 9,94% em alheiras antes do tratamento térmico. Por outro lado, diversos autores encontraram nas alheiras provenientes de diferentes produtores e recolhidas em diferentes estabelecimentos teor de proteína bruta superior ao do nosso trabalho, a saber: 13,0% (Campos et al., 2013), 11,4% (Ferreira et al., 2006) e 10,12% (Patarata et al., 2008).

No que diz respeito ao teor de gordura bruta, as alheiras dos dois produtores apresentaram valores (22,7% produtor de BRAGANÇA e 22,5% produtor de VINHAIS) muito próximos ($p < 0,05$). Os teores em gordura bruta encontrados neste estudo são superiores aos valores reportados por Campos et al. (2013) 15,6%, Ferreira et al. (2006) 18,4%, e Patarata et al. (2008) 19,46%.

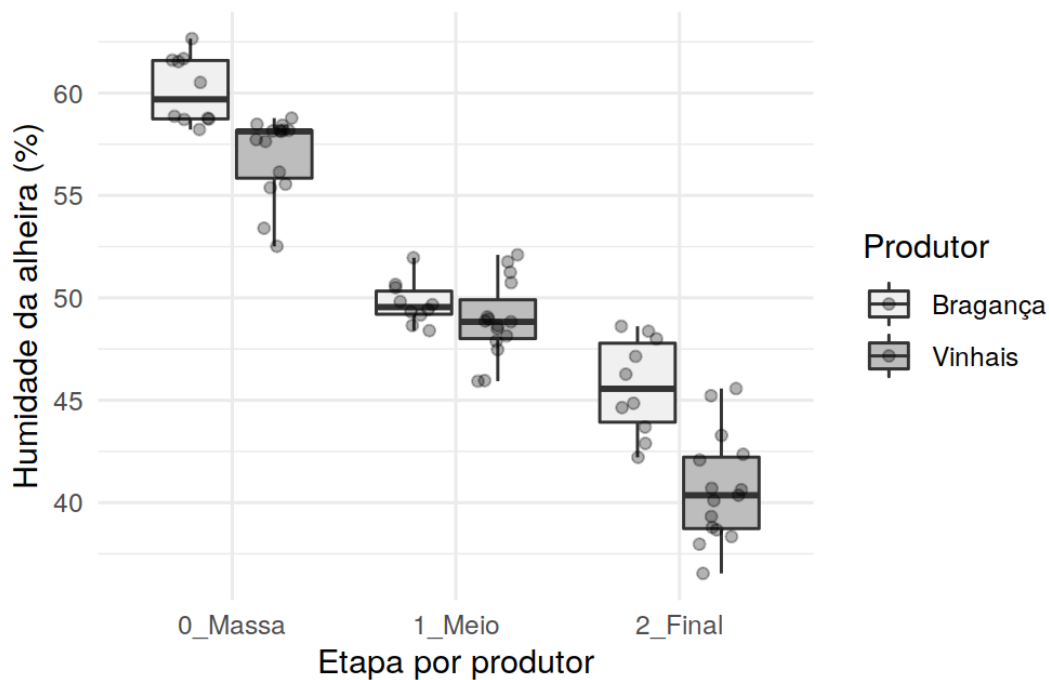


Figura 4.3: Evolução da humidade das alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais. Massa: mistura imediatamente após enchimento; Meio: alheira na metade da maturação; Final: alheira terminada

Relativamente ao teor de hidratos de carbono, os resultados do presente estudo são superiores aos obtidos por Campos et al. (2013) 13,2%, porém, são inferiores aos obtidos por Patarata et al. (2008) 19,24%. Por outro lado, os nossos resultados são muito próximos dos reportados por Ferreira et al. (2006) 15,2%. No que concerne aos teores de cinzas, Patarata et al. (2008) reportaram valores de 2,21%, teor superior aos valores obtidos no presente estudo. Já Pereira et al. (2012) obtiveram cerca de 1,14%, teor próximo aos observados no presente estudo.

No que diz respeito à variabilidade da composição química ao longo do processo de fabrico, como esperado, observou-se uma tendência geral para um aumento dos teores de proteína bruta, de gordura bruta, de hidratos de carbono e de cinzas. Todavia, no produtor de BRAGANÇA, cujo tempo de fabrico é metade (7 dias) do tempo de fabrico do produtor de VINHAIS, a evolução foi significativa ($p < 0,05$) entre a massa e o meio do processo. Já no produtor de VINHAIS, a evolução da composição química foi significativa ($p < 0,05$) em todas as etapas do processo de fabrico.

Tabela 4.2: Análise proximal em base húmida (% bh) e base seca (% bs) das alheiras elaboradas em produtores artesanais de Bragança e Vinhais, por produtor e por etapa do processo dentro de cada produtor. Médias e intervalos de confiança ao 95% são apresentados

Procedência		Proteína bruta (% bh)	Gordura bruta (% bh)	Hidrato de carbono (% bh)	Cinzas (% bh)
Produtor					
	Bragança	9,82 ^a [9,59 – 10,1]	22,7 ^a [22,1 – 23,4]	14,2 ^a [13,5 – 14,8]	1,47 ^a [1,43 – 1,51]
	Vinhais	9,40 ^b [9,21 – 9,59]	22,5 ^a [22,0 – 23,0]	17,8 ^b [17,3 – 18,3]	1,40 ^b [1,36 – 1,43]
Produtor Bragança					
	Massa	8,02 ^a [7,61 – 8,42]	18,9 ^a [17,8 – 20,0]	11,7 ^a [10,7 – 12,8]	1,21 ^a [1,14 – 1,28]
	Meio processo	10,42 ^b [10,01 – 10,83]	23,8 ^b [22,6 – 24,9]	14,7 ^b [13,6 – 15,7]	1,55 ^b [1,48 – 1,62]
	Produto final	11,03 ^b [10,62 – 11,44]	25,6 ^b [24,5 – 26,7]	16,1 ^b [15,0 – 17,1]	1,64 ^b [1,57 – 1,71]
Produtor Vinhais					
	Massa	7,91 ^a [7,58 – 8,25]	20,8 ^a [19,9 – 21,7]	13,2 ^a [12,3 – 14,0]	1,11 ^a [1,05 – 1,17]
	Meio processo	9,70 ^b [9,37 – 10,03]	22,6 ^b [21,7 – 23,5]	17,4 ^b [16,5 – 18,2]	1,42 ^b [1,36 – 1,48]
	Produto final	10,59 ^c [10,26 – 10,93]	24,1 ^b [23,2 – 25,0]	23,0 ^c [22,1 – 23,9]	1,66 ^c [1,60 – 1,72]
Procedência		Proteína bruta (% bs)	Gordura bruta (% bs)	Hidrato de carbono (% bs)	Cinzas (% bs)
Produtor					
	Bragança	20,4 ^a [19,9 – 20,9]	47,2 ^a [46,2 – 48,2]	29,4 ^a [28,5 – 30,3]	3,04 ^a [2,97 – 3,11]
	Vinhais	18,4 ^b [18,0 – 18,9]	44,4 ^b [43,6 – 45,2]	34,4 ^b [33,7 – 35,2]	2,72 ^b [2,67 – 2,78]
Produtor Bragança					
	Massa	20,1 ^a [19,2 – 21,1]	47,4 ^a [45,7 – 49,1]	29,5 ^a [27,9 – 31,1]	3,02 ^a [2,91 – 3,14]
	Meio processo	20,8 ^a [19,8 – 21,7]	47,2 ^a [45,5 – 48,9]	29,2 ^a [27,6 – 30,8]	3,08 ^a [2,96 – 3,20]
	Produto final	20,3 ^a [19,4 – 21,2]	47,1 ^a [45,4 – 48,8]	29,6 ^a [28,0 – 31,2]	3,01 ^a [2,90 – 3,13]
Produtor Vinhais					
	Massa	18,4 ^a [17,7 – 19,2]	48,3 ^a [46,9 – 49,7]	30,7 ^a [29,4 – 32,0]	2,59 ^a [2,49 – 2,68]
	Meio processo	19,0 ^a [18,3 – 19,8]	44,2 ^b [42,8 – 45,6]	34,0 ^b [32,7 – 35,3]	2,79 ^b [2,69 – 2,88]
	Produto final	17,9 ^a [17,1 – 18,6]	40,7 ^c [39,3 – 42,1]	38,6 ^c [37,3 – 39,9]	2,80 ^b [2,70 – 2,90]

^{a,b,c} Diferentes letras numa coluna dentro de um mesmo bloco indicam diferenças significativas ($\alpha=0,05$).

Ao longo do processo, os teores de gordura, hidratos de carbono, proteína e cinzas, quando expressas em BH, tendem a aumentar porque as alheiras perdem humidade por desidratação ao longo da maturação. Por esta razão, os resultados da análise proximal também foram expressos em base seca.

Avaliando a composição proximal na BS (Tabela 4.2), verifica-se que as alheiras do produtor de BRAGANÇA apresentaram maiores ($p < 0,05$) teores de gordura bruta (47,2 versus 44,4), proteína bruta (20,4 versus 18,4) e de cinzas (3,04 versus 2,72) e menor ($p < 0,05$) teor de hidratos de carbono (29,4 versus 34,4) que as alheiras do produtor de VINHAIS. A diferença na composição química entre as alheiras produzidas pelos dois produtores era esperada, uma vez que, para além do tempo de fabrico adotado pelos produtores ser diferente (7 versus 14 dias), as características e as proporções das matérias-primas utilizadas na elaboração das alheiras como é o caso das carnes, do pão, do azeite e da gordura de porco foram diferentes (Ruiz & Pérez-Palacios, 2014).

Os teores obtidos no presente estudo relativamente a gordura bruta e a proteína bruta na BS são inferiores aos reportados por Campos et al. (2013), que encontraram valores de 57,3% e 21,2%, respectivamente. Já em relação ao teor de hidratos de carbono, estes autores obtiveram um valor de 21,5%, o qual é inferior ao obtido no presente estudo.

Relativamente à evolução ao longo do processo de fabrico da composição proximal, espera-se que os teores de proteína, gordura, hidratos de carbono e cinzas, quando expressos em BS, tenham só uma baixa oscilação. Isto verificou-se nas alheiras do produtor de BRAGANÇA, cuja composição proximal em BS não atingiu significância estatística ($p > 0,05$) entre as etapas de fabrico. Em contrapartida, a composição proximal em BS das alheiras do produtor de VINHAIS apresentou mudanças significativas ($p < 0,05$) para a gordura bruta (a qual diminuiu desde 48,3 até 40,7%) e o teor de hidratos de carbono e cinzas (os quais aumentaram desde 30,7 até 38,6%, e desde 2,59 até 2,80%, respetivamente) ao longo da maturação. Isto poderá ter acontecido pela variabilidade inerente entre as alheiras elaboradas por esta cozinha regional inclusive dentro de um mesmo lote de produção. Duas possíveis causas desta variabilidade na composição proximal da massa de alheiras de um mesmo lote podem ser a insuficiente mistura dos ingredientes, e a presença de grandes troços de gordura e carne.

4.3. Qualidade microbiológica dos insumos e das alheiras artesanais ao longo do processo de fabrico

A Tabela 4.3 apresenta os resultados (médias e intervalos de confiança ao 95%) da qualidade microbiológica de alguns insumos utilizados pelos produtores de BRAGANÇA e VINHAIS na elaboração das alheiras.

Tabela 4.3: Qualidade microbiológica de alguns insumos utilizados na elaboração das alheiras por produtor artesanal. Médias e intervalos de confiança ao 95% são apresentados em log ufc/g

Grupo microbiano		Bragança	Vinhais
Mesófilos	Tripa	5,53 ^a [4,51 – 6,54]	4,91 ^a [4,08 – 5,74]
	Carnes	2,72 ^a [1,70 – 3,73]	3,84 ^b [3,01 – 4,67]
	Pimentão	6,04 ^a [5,02 – 7,06]	4,92 ^b [4,09 – 5,75]
Coliformes	Tripa	2,53 ^a [0,53 – 4,53]	2,56 ^a [0,56 – 4,56]
	Carnes	2,44 ^a [0,44 – 4,44]	2,13 ^a [0,13 – 4,14]
	Pimentão	3,63 ^a [0,63 – 6,64]	2,97 ^a [0,00 – 5,98]
<i>E. coli</i>	Tripa	<0,70	0,88 [<0,70 – 1,23]
	Carnes	<0,70	<0,70
	Pimentão	<0,70	<0,70
<i>S. aureus</i>	Tripa	4,50 ^a [2,80 – 6,19]	3,67 ^a [2,29 – 5,06]
	Carnes	2,37 ^a [0,68 – 4,06]	4,03 ^b [2,65 – 5,41]
	Pimentão	1,70 ^a [0,01 – 3,39]	3,55 ^b [2,16 – 4,93]
<i>C. perfringens</i>	Tripa	5,59 ^a [1,77 – 5,42]	3,19 ^a [1,70 – 4,69]
	Carnes	<0,70	<0,70
	Pimentão	1,35 ^a [-0,48 – 3,18]	1,41 ^a [-0,08 – 2,90]
<i>Salmonella</i> spp.*	Tripa	1/2 ^a	0/3 ^b
	Carnes	0/2 ^a	0/3 ^a
	Pimentão	0/2 ^a	0/3 ^a

^{a,b}Diferentes letras numa fila indicam diferenças significativas ($\alpha=0,10$)

*s/n representa número de amostras positivas s do total de amostras n

A partir da análise da Tabela 4.3 observa-se que os insumos utilizados pelo produtor de BRAGANÇA apresentaram maiores ($p<0,10$) contagens de aeróbios mesófilos (5,53 versus 4,91 log ufc/g) nas tripas e no pimentão (6,04 versus 4,92 log ufc/g) e menores ($p<0,10$) contagens (2,72 versus 3,84 log ufc/g) nas carnes do que aqueles do produtor de VINHAIS. Elias et al. (2007) analisaram amostras de matérias primas utilizadas na elaboração de paio de porco Alentejano, entre os quais as tripas

(intestino grosso de porco, natural, salgado e com as camadas muscular e serosa) e a massa do pimentão recolhidas em duas fábricas diferentes, tendo observado nas tripas contagens de mesófilos totais que variaram entre $4,51 \pm 0,75$ e $5,31 \pm 1,16$ log ufc/g e na massa do pimentão entre $4,25 \pm 0,07$ e $4,86 \pm 0,46$ log ufc/g.

Relativamente aos coliformes, os insumos utilizados pelo produtor de BRAGANÇA revelaram menor ($p < 0,10$) contagem ($2,53$ versus $2,56$ log ufc/g) nas tripas e maiores ($p < 0,10$) contagens ($2,44$ versus $2,13$ log ufc/g) nas carnes e no pimentão ($3,63$ versus $2,97$ log ufc/g). Menores níveis de contaminação foram reportados por Elias et al. (2007), com contagens de coliformes de $1,00$ log ufc/g na massa de pimentão e entre $1,17 \pm 0,40$ e $1,33 \pm 0,51$ log ufc/g nas tripas.

No que diz respeito a *E. coli*, verifica-se que em todos os insumos, exceto nas tripas, as contagens estiveram abaixo do limite de quantificação ($< 0,70$ log ufc/g). As tripas do produtor de VINHAIS apresentaram também um valor médio baixo de $0,88$ log ufc/g. Relativamente a *S. aureus*, os insumos utilizados pelo produtor de BRAGANÇA apresentaram maior ($p < 0,10$) carga microbiológica ($4,50$ versus $3,67$ log ufc/g) nas tripas e menores ($p < 0,10$) nas carnes ($2,37$ versus $4,03$ log ufc/g) e no pimentão ($1,70$ versus $3,55$ log ufc/g) em comparação com os insumos do produtor de VINHAIS.

No que concerne a *C. perfringens* verifica-se que as tripas utilizadas pelo produtor de BRAGANÇA apresentaram maior ($p < 0,10$) concentração ($5,59$ versus $3,19$ log ufc/g) e menor ($p < 0,10$) concentração ($1,35$ versus $1,41$ log ufc/g) no pimentão. Já nas carnes não foi detectada a presença de *C. perfringens* nos dois produtores. Elias et al. (2007) encontraram contagens de esporos de clostrídios sulfito-redutores que variaram entre $1,00 \pm 0,00$ e $1,17 \pm 0,41$ log ufc/g na massa de pimentão e entre $2,33 \pm 1,37$ e $2,67 \pm 1,03$ log ufc/g nas tripas.

A presença de *Salmonella* spp. foi detectada em uma das duas tripas analisadas pertencentes ao produtor de BRAGANÇA. Nas carnes e pimentão não foi detectada a sua presença nos dois produtores. No estudo de rastreamento de *Salmonella* em fábricas de processamento de alheiras, realizado por Esteves et al. (2006a), também detetaram a presença de *Salmonella* nas tripas, na carne de porco e na carne de galinha, embora maior quantidade de amostras foram analisadas naquele estudo. Assim, de uma forma geral, os insumos utilizados pelo produtor de BRAGANÇA apresentaram carga

microbiológica mais elevada em termos de indicadores de higiene e de segurança comparativamente ao produtor de VINHAIS.

Na Tabela 4.4 e nas Figuras 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 apresentam-se os resultados (médias e intervalos de confiança ao 95%) dos grupos microbianos quantificados e a sua evolução ao longo do processo de fabrico em alheiras elaboradas pelos produtores de BRAGANÇA e VINHAIS.

Tabela 4.4: Grupos microbianos quantificados em alheiras elaboradas em produtores artesanais de Bragança e Vinhais, por produtor e por etapa do processo dentro de cada produtor. Médias e intervalos de confiança ao 95% são apresentados em log ufc/g

Procedência		Mesófilos	Coliformes	<i>E. coli</i>
Produtor	Bragança	6,69 ^a [6,42 – 6,95]	1,53 ^a [0,78 – 2,29]	0,70 ^a [0,40 – 1,00]
	Vinhais	5,45 ^b [5,24 – 5,67]	2,41 ^a [1,88 – 2,94]	0,82 ^a [0,61 – 1,04]
Produtor de Bragança	Massa	4,33 ^a [3,87 – 4,79]	0,94 ^a [-0,37 – 2,25]	0,70 ^a [0,18 – 1,22]
	Meio processo	7,06 ^b [6,60 – 7,51]	0,82 ^a [-0,49 – 2,13]	0,70 ^a [0,18 – 1,22]
	Produto final	8,68 ^c [8,22 – 9,14]	2,84 ^a [1,53 – 4,15]	0,70 ^a [0,18 – 1,22]
Produtor de Vinhais	Massa	3,47 ^a [3,10 – 3,85]	1,14 ^a [0,21 – 2,06]	0,70 ^a [0,33 – 1,06]
	Meio processo	5,61 ^b [5,24 – 5,99]	2,77 ^a [1,84 – 3,69]	0,70 ^a [0,33 – 1,06]
	Produto final	7,28 ^c [6,90 – 7,65]	3,32 ^b [2,39 – 4,24]	1,08 ^a [0,71 – 1,44]
Procedência		<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>Salmonella</i> spp.*
Produtor	Bragança	3,34 ^a [3,07 – 3,62]	0,92 ^a [0,74 – 1,09]	4/30 ^a
	Vinhais	2,90 ^b [2,68 – 3,12]	1,11 ^a [0,96 – 1,25]	0/45 ^b
Produtor de Bragança	Massa	2,91 ^a [2,43 – 3,39]	0,70 ^a [0,39 – 1,01]	1/10 ^a
	Meio processo	3,81 ^b [3,33 – 4,28]	1,00 ^a [0,69 – 1,30]	0/10 ^a
	Produto final	3,31 ^b [2,84 – 3,79]	1,05 ^a [0,74 – 1,36]	3/10 ^b
Produtor de Vinhais	Massa	2,91 ^a [2,53 – 3,30]	0,99 ^a [0,74 – 1,24]	0/15 ^a
	Meio processo	2,79 ^a [2,40 – 3,18]	1,08 ^a [0,83 – 1,34]	0/15 ^a
	Produto final	3,00 ^a [2,61 – 3,39]	1,25 ^a [1,00 – 1,50]	0/15 ^a

^{a,b,c} Diferentes letras numa coluna dentro de um mesmo bloco indicam diferenças significativas ($\alpha=0,05$)

*s/n representa número de amostras positivas s do total de amostras n

O Regulamento (CE) N° 1441/2007 relativo aos critérios microbiológicos não inclui as alheiras na categoria dos alimentos, portanto, para avaliar o nível de contaminação microbiológica nas alheiras em estudo utilizamos como base os critérios de mesófilos e *Salmonella* spp. para “carne picada” e para “produtos a base de carne”.

Após análise dos resultados, verificou-se que as alheiras do produtor de BRAGANÇA apresentaram maior ($p < 0,05$) carga de mesófilos (6,69 versus 5,45 log ufc/g) e de *S. aureus* (3,34 versus 2,90 log ufc/g) e menor ($p < 0,05$) carga de coliformes (1,53 versus 2,41 log ufc/g), de *E. coli* (0,70 versus 0,82 log ufc/g) e de *C. perfringens* (0,92 versus 1,11 log ufc/g) do que as alheiras elaboradas pelo produtor de VINHAIS. Já a presença de *Salmonella* foi detectada em 4 das 30 amostras pertencentes ao produtor de BRAGANÇA, das quais, uma foi detectada nas primeiras 10 amostras analisadas no início do processo de fabrico e as restantes 3 amostras foram detetadas nas 10 amostras analisadas no fim do processo de fabrico. Este resultado é crítico porque indica que esta cozinha regional, pelo menos nos lotes analisados, não cumpre o critério microbiológico de ausência de *Salmonella* em 25 g em produtos colocados no mercado.

Tendo em conta as contagens de mesófilos obtidas no presente estudo podemos declarar como satisfatórias as alheiras do produtor de VINHAIS segundo critério de higiene de 5,5 log ufc/g como limite mínimo aceitável. Já as alheiras do produtor de BRAGANÇA podem ser declaradas insatisfatórias segundo o critério de 6,5 log ufc/g como limite máximo aceitável.

Contagens elevadas de mesófilos foram também observadas por Magalhães et al. (2011) em alheiras provenientes de três cozinhas regionais e adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais. Estes autores obtiveram contagens de até 8,5 log ufc/g. De acordo com os mesmos autores, essas contagens elevadas são um indicativo da baixa qualidade microbiológica dos produtos.

Relativamente à evolução da carga de mesófilos ao longo do tempo durante o processo de fabrico, como se pode observar na Tabela 4.4 e na Figura 4.4, há uma tendência para um aumento ($p < 0,05$) nas alheiras dos dois produtores. O aumento da contagem de mesófilos observado ao longo do processo indica que a massa da alheira está menos contaminada comparativamente ao produto final. Assim, podemos considerar que esse desenvolvimento microbiano deve-se principalmente à contaminação das matérias-primas utilizadas na elaboração das alheiras (carnes, pimentão) e das tripas, como descrito anteriormente, assim como também pode-se dever a uma manipulação deficiente (Anderson & Calderón y Pascual, 2010). Por isso, tendo em conta que a maioria de microrganismos mesófilos são patogénicos é de extrema importância a sua análise nos produtos alimentares (Bradley & Bush, 2019).

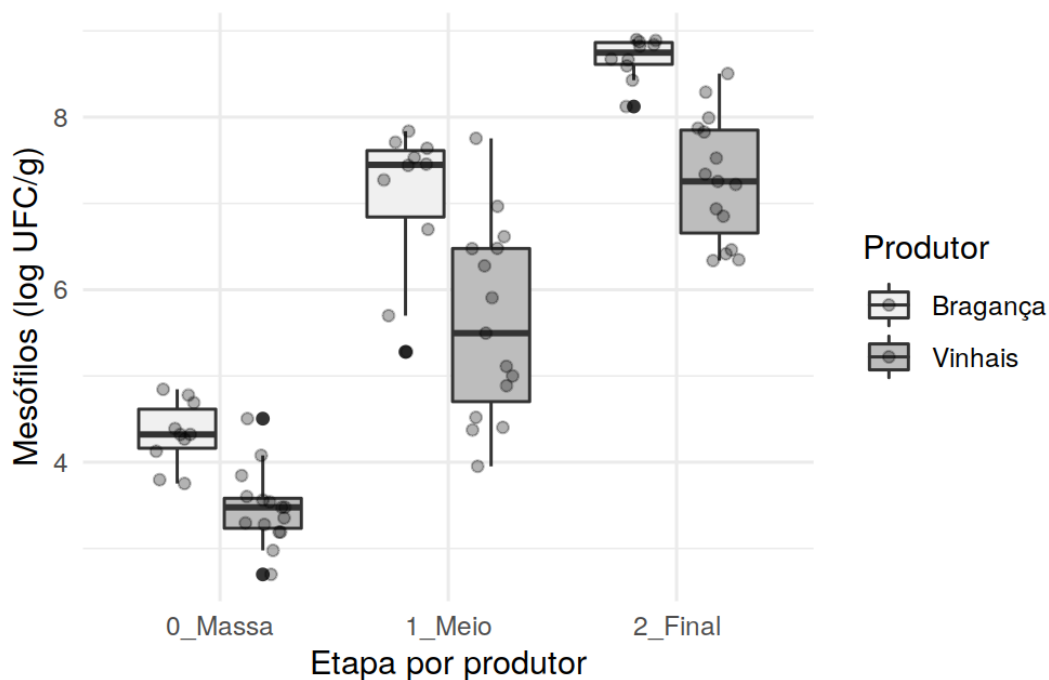


Figura 4.4: Evolução das contagens de mesófilos totais nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais. Massa: mistura imediatamente após enchimento; Meio: alheira na metade da maturação; Final: alheira terminada

Relativamente aos coliformes, as contagens obtidas no presente estudo são inferiores que 3 log ufc/g, limite máximo considerado satisfatório pela ANVISA (2001), em produtos cárneos ou não, embutidos ou não (mortadela, salsicha, presunto, fiambre, morcela e outros) e produtos a base de sangue e derivados, processados.

No que diz respeito à evolução da carga de coliformes nas alheiras ao longo do tempo durante o processo de fabrico (Tabela 4.4 e Figura 4.5), como observado nas contagens de mesófilos, observou-se uma tendência de aumento das contagens de coliformes. Contudo, nas alheiras do produtor de BRAGANÇA, a evolução foi não significativa ($p > 0,05$) em todas as etapas do processo de fabrico; enquanto para o produtor de VINHAIS a evolução foi significativa ($p < 0,05$) entre o meio do processo e o produto final. A Figura 4.5 evidencia que os níveis de coliformes nas alheiras do produtor de VINHAIS apresentam uma grande variabilidade nas três etapas de maturação, a diferença das alheiras do produtor de BRAGANÇA, cujas contagens de coliformes foram sempre mais baixas em cada etapa.

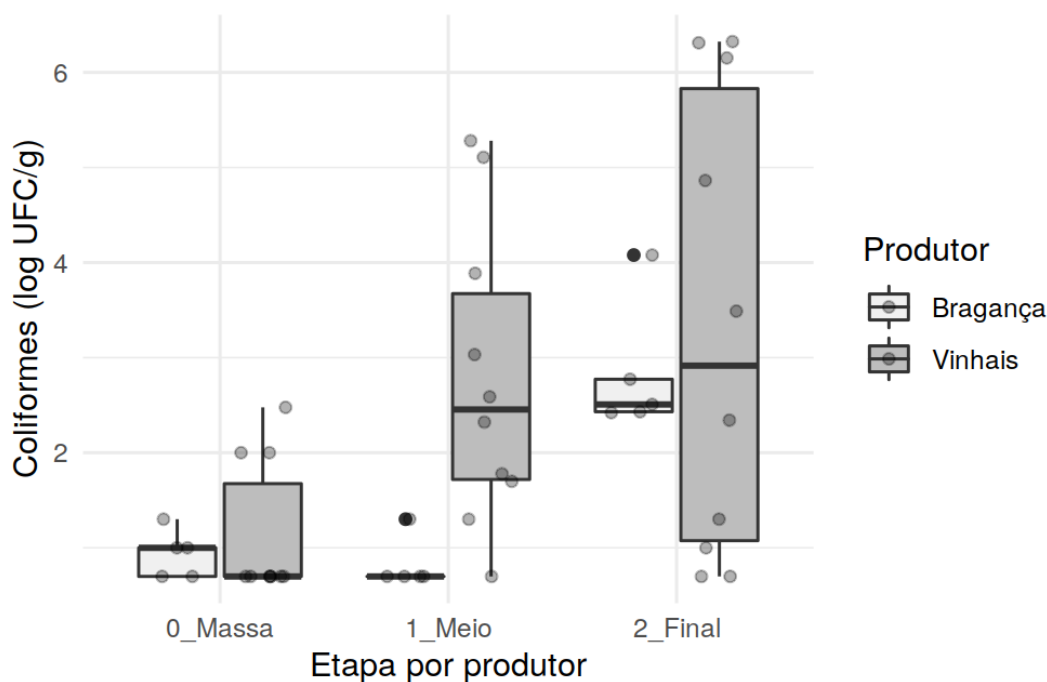


Figura 4.5. Evolução das contagens de coliformes totais nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais. Massa: mistura imediatamente após enchimento; Meio: alheira na metade da maturação; Final: alheira terminada

Relativamente a *E. coli* as contagens obtidas no presente estudo foram inferiores a 1 log ufc/g, limite considerado satisfatório pelo INSA (2019). Diversos autores encontraram contagens médias de *E. coli* superiores às obtidas no presente estudo, a saber: 1,1 log ufc/g (Magalhães et al, 2011), entre 2,5 a 6,3 log ufc/g (Ferreira et al., 2007) e 2,3 log ufc/g (Silva et al., 2019). Estes autores foram unânimes em afirmar que consideravam a presença de *E. coli* nas alheiras como um indicativo de contaminação fecal que podia provir da falha da higiene durante o processo de fabrico.

No que diz respeito à evolução da carga de *E. coli* nas alheiras ao longo do processo de fabrico (Tabela 4.4 e Figura 4.6) verificou-se que não foi significativa ($p > 0,05$) em todas as etapas de fabrico para os dois produtores. Praticamente, em todas as amostras não se detetaram níveis contáveis de *E. coli*, a exceção de duas amostras (Figura 4.6), as quais apresentaram concentrações maiores a 4.0 log ufc/g.

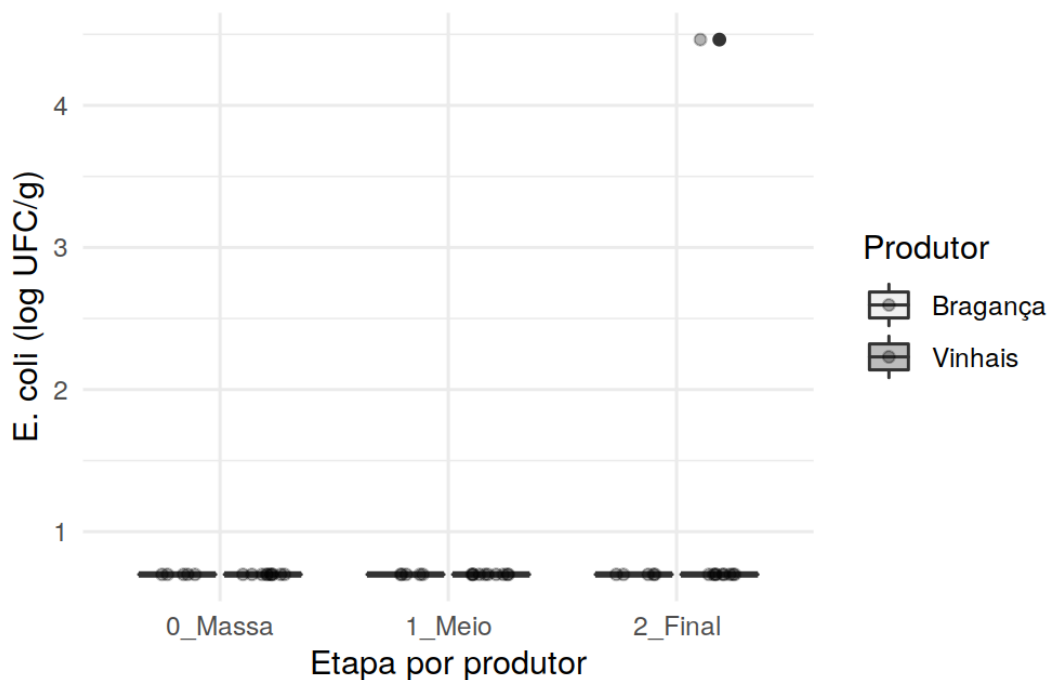


Figura 4.6: Evolução das contagens de *E. coli* nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais. Massa: mistura após enchimento; Meio: alheira na metade da maturação; Final: alheira terminada

Em relação a contaminação por *S. aureus*, ambos produtores apresentaram níveis relativamente baixos de 2,90 log ufc/g para VINHAIS e 3,34 log ufc/g para BRAGANÇA, muito por debaixo dos níveis críticos para a produção de toxina estafilocócica entre 6,0 e 7,0 log ufc/g (Ferreira et al., 2007). Os resultados encontrados no presente estudo corroboram os reportados por outros autores. Num estudo de caracterização microbiológica das alheiras, realizado por Ferreira et al. (2007), encontraram contagens de *S. aureus* que variaram entre 2,5 e 5,5 log ufc/g em alheiras provenientes de produtores industriais e ~5,5 log ufc/g de cozinhas regionais de fumeiro.

Num outro estudo realizado por Silva et al. (2019), onde os autores fizeram uma caracterização microbiológica de diferentes formulações de alheiras provenientes de cinco produtores diferentes e recolhidas em diversos estabelecimentos de venda, reportaram contagens de *S. aureus* que variaram entre 1,06 a 4,41 log ufc/g.

Relativamente à evolução ao longo do processo de fabrico (Tabela 4.4 e Figura 4.7) verificou-se uma tendência de aumento da carga microbiológica para os dois produtores. Contudo, a evolução de *S. aureus* para o produtor de BRAGANÇA é

significativa ($p < 0,05$) entre a massa e o meio do processo. Enquanto que, para o produtor de VINHAIS a evolução de *S. aureus* não foi significativa ($p > 0,05$) em todo o processo de fabrico. Todavia, verifica-se uma maior variabilidade em níveis de *S. aureus* nas alheiras do produtor de BRAGANÇA comparada com as alheiras do produtor de VINHAIS.

A presença de *S. aureus* nas alheiras pode ser causada por contaminação cruzada, proveniente dos insumos: das tripas, das carnes e do pimentão utilizados, uma vez que, foram encontrados valores elevados deste microrganismo nestes insumos. Também pode-se suspeitar de contaminação proveniente dos manipuladores.

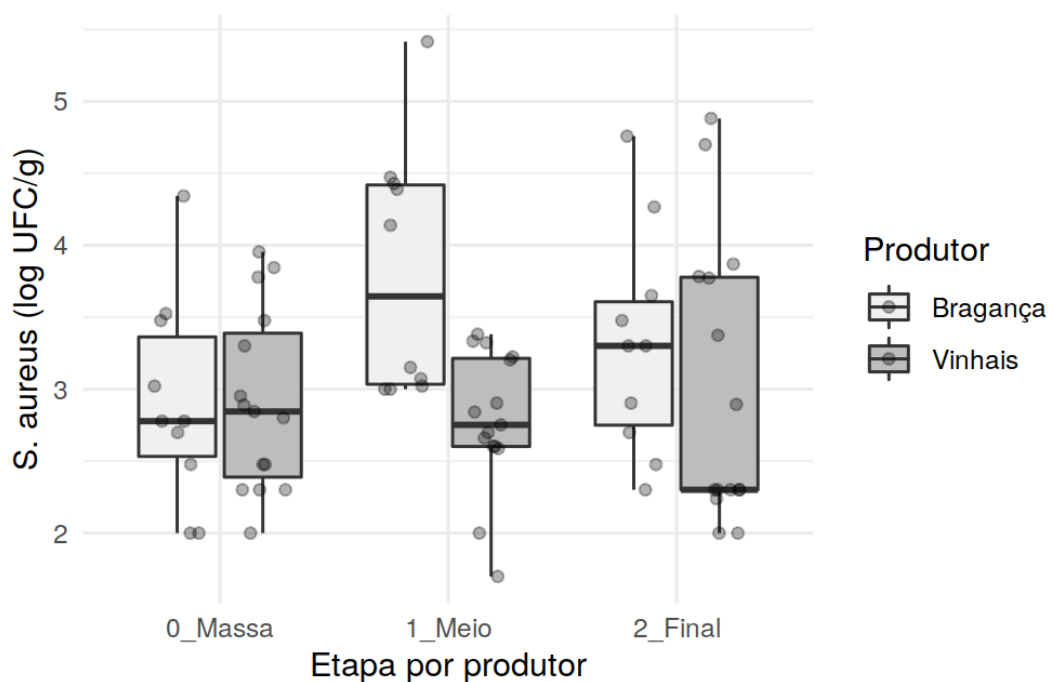


Figura 4.7: Evolução das contagens de *Staphylococcus aureus* nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais. Massa: mistura imediatamente após enchimento; Meio: alheira na metade da maturação; Final: alheira terminada

As contagens de *C. perfringens* encontradas nas alheiras do produtor de BRAGANÇA (0,92 ufc/g) e de VINHAIS (1,11 ufc/g) não foram significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$), embora os níveis deste patógeno foram bastante variáveis, como mostra a Figura 4.8. Contudo, as médias no presente estudo são inferiores aos

observados por Ferreira et al. (2007). Estes autores encontraram contagens entre 2,4 e 3,1 log ufc/g nas alheiras analisadas, tendo referido que, embora a *C. perfringens* estivesse presente em algumas amostras analisadas não se encontrava em níveis de preocupação à saúde pública. Segundo a teoria de Esteves (2005), a ocorrência de *C. perfringens* nas alheiras parece ser determinada pela ocorrência do microrganismo nas tripas utilizadas no seu enchimento e no pimentão. De facto, no presente estudo também foi detetado este microrganismo nas tripas e no pimentão utilizados para a elaboração das alheiras.

Relativamente à evolução da contaminação das alheiras por *C. perfringens* ao longo do tempo, verificou-se uma clara tendência de aumento da carga microbiológica em todo o processo de fabrico para os dois produtores (Figura 4.8). No entanto, apesar do aumento verificado, a evolução não foi significativa ($p>0,05$), como se pode observar na Tabela 4.4. Contudo, as alheiras do produtor de VINHAIS tiveram uma maior variabilidade na concentração de *C. perfringens* do que as alheiras do produtor de BRAGANÇA (Figura 4.8).

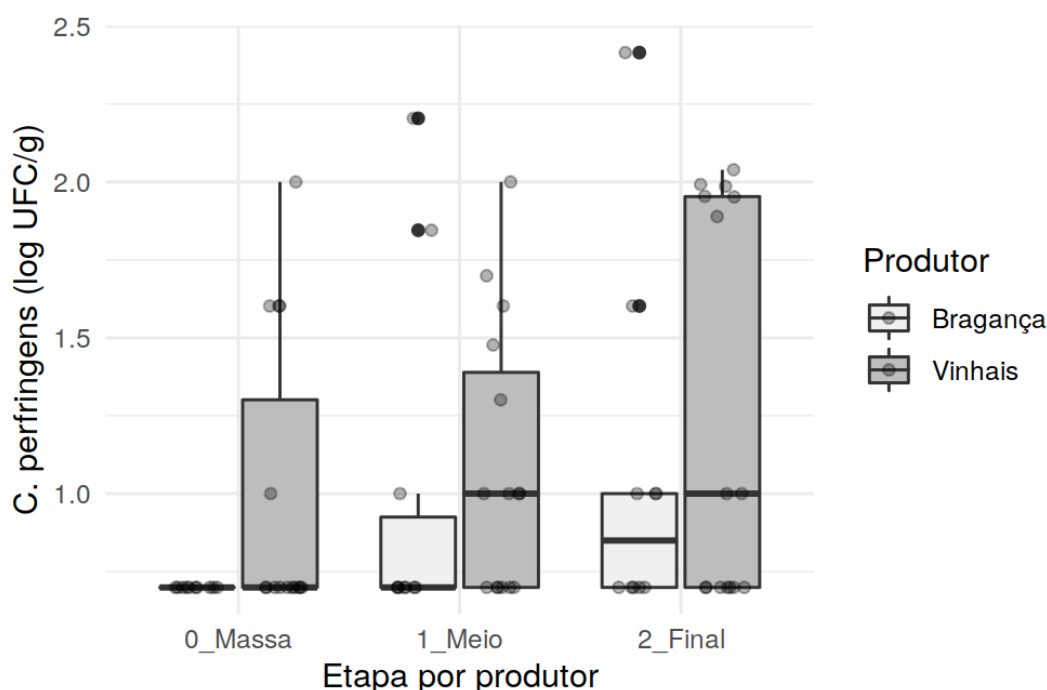


Figura 4.8: Evolução das contagens de *Clostridium perfringens* nas alheiras ao longo do fabrico mostrando variabilidade dentro e entre produtores artesanais. Massa: mistura imediatamente após enchimento; Meio: alheira na metade da maturação; Final: alheira terminada

Relativamente à presença de *Salmonella* spp., quatro das 30 amostras de alheira do produtor de BRAGANÇA deram positivo; enquanto nenhuma das alheiras de um total de 45 do produtor de VINHAIS rendeu positivo. Este patogénico também foi detetado por Ferreira et al. (2007) em dois lotes de dois diferentes produtores de alheiras. Outros autores também observaram a presença de *Salmonella* em 5/64 e 2/32 das alheiras analisadas (Esteves et al., 2006a; Esteves et al., 2006b). Segundo os mesmos autores, a presença de *Salmonella* spp. em alheira pode resultar do uso de tripas contaminadas, bem como da contaminação cruzada causada por superfícies contaminadas. Num universo de 422 amostras de produtos de salsicharia portuguesa analisadas por Almeida et al. (1999) observaram a presença de *Salmonella* em 10 amostras onde as alheiras estão incluídas em 2/3.

De acordo com o Regulamento (CE) N° 1441/2007 espera-se ausência de *Salmonella* em 25 g de produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil. Portanto, a sua presença em alheira é de grande preocupação para a saúde pública, embora, Esteves et al. (2006b) referiram que a sua presença em produtos que irão sofrer um tratamento térmico antes do consumo, como é o caso das alheiras, pode não constituir um perigo eminente para os consumidores já que este microrganismo é facilmente destruído nessas temperaturas.

A presença de *Salmonella* spp. nas alheiras do produtor de BRAGANÇA pode provir das tripas utilizadas para o enchimento, uma vez que, apenas nas tripas utilizadas por este produtor foi encontrada a presença deste microrganismo. Esteves (2005) usou técnicas de identificação molecular para avaliar a proveniência da *Salmonella* spp., tendo confirmado a sua origem na utilização de tripas contaminadas. Deste modo, sugere-se que a presença deste microrganismo no produto final seja resultante da utilização de tripas contaminadas, dado que, as carnes que entram na composição das alheiras são submetidas a um processamento térmico prévio, e, portanto, a *Salmonella* pré-existente nas carnes não teria oportunidade de sobreviver.

Duma forma geral, considerando todos os grupos microbianos estudados as alheiras do produtor de BRAGANÇA apresentaram qualidade microbiológica inferior às alheiras do produtor de VINHAIS.

5. MAPA DE QUALIDADE COMPOSICIONAL E MICROBIOLÓGICA DE ALHEIRAS COMERCIALIZADAS EM TRÁS-OS-MONTES

Os resultados (médias e intervalos de confiança ao 95%) das propriedades intrínsecas das alheiras comercializadas por seis produtores artesanais são apresentados na Tabela 5.1. Pela análise dos resultados podemos observar grandes variações ($p < 0,05$) nos parâmetros estudados entre as alheiras dos diferentes produtores.

Tabela 5.1: Propriedades intrínsecas (pH, atividade da água e humidade) das alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes. Médias e intervalos de confiança ao 95% são apresentados

Procedência	pH	a_w	Humidade (%)
CHAVES	3,67 ^b [3,57 – 3,76]	0,974 ^a [0,969 – 0,979]	54,4 ^c [52,9 – 55,8]
MIRANDELA	4,56 ^d [4,48 – 4,64]	0,974 ^a [0,969 – 0,979]	44,2 ^a [42,8 – 45,5]
MOGADOURO	4,62 ^d [4,53 – 4,70]	0,990 ^c [0,986 – 0,994]	46,9 ^b [45,6 – 48,2]
VIMIOSO	4,24 ^c [4,16 – 4,33]	0,991 ^c [0,987 – 0,995]	55,2 ^c [53,9 – 56,6]
VINHAIS 1	3,39 ^a [3,31 – 3,47]	0,982 ^b [0,978 – 0,986]	46,0 ^{ab} [44,7 – 47,3]
VINHAIS 2	4,31 ^c [4,23 – 4,39]	0,975 ^a [0,971 – 0,979]	45,6 ^{ab} [44,3 – 46,9]

^{a,b,c,d} Diferentes letras numa coluna indicam diferenças significativas ($\alpha=0,05$)

Relativamente às propriedades intrínsecas, observou-se que os valores de pH se situaram entre 3,39 a 4,62, muito mais baixos do que os encontrados no Capítulo 4 da presente tese. As alheiras do produtor de VINHAIS 1 apresentaram menor ($p < 0,05$) valor de pH e as alheiras do produtor de MOGADOURO apresentaram o pH mais elevado. Em relação aos valores de a_w , observou-se um valor menor ($p < 0,05$) nas alheiras dos produtores de CHAVES e de MIRANDELA (0,974) e maior ($p < 0,05$) nas alheiras do produtor de VIMIOSO (0,991). No que diz respeito ao teor de humidade, as alheiras apresentaram valores entre 44,2 e 55,2%, sendo o produtor de MIRANDELA que apresentou menor

($p < 0,05$) valor e as alheiras do produtor de VIMIOSO apresentaram o maior ($p < 0,05$) valor. Os resultados de pH e a_w encontrados no presente estudo corroboram os obtidos por Esteves et al. (2006b) que observaram nas alheiras valores médios de pH 4,89 e de a_w 0,94.

De uma forma geral, e tendo em conta os resultados das características intrínsecas encontrados neste estudo, podemos dizer que as alheiras conseguiriam ser estáveis desde o ponto de vista microbiológico, já que a maioria apresenta valores de a_w reduzidos (inferiores que 0,990), pH abaixo de 5,0 e humidade abaixo de 60%, e podem ser armazenados sem recurso ao frio. No entanto, é preciso contrastar estes resultados com os microbiológicos.

A Tabela 5.2 apresenta os resultados da composição proximal (média e intervalos de confiança de 95%) na base seca (BS) e na base húmida (BH) das alheiras elaboradas pelos 6 produtores artesanais. Numa análise geral dos resultados, observaram-se diferenças ($p < 0,05$) entre as fábricas amostradas em todos os parâmetros de composição proximal analisados.

Na avaliação em BH, verificou-se que o teor de proteína bruta variou entre 6,78 e 13,98%, sendo as alheiras dos produtores de VINHAIS 1 e de MOGADOURO aquelas que apresentaram menor ($p < 0,05$) e maior ($p < 0,05$) teor de proteína bruta, respectivamente. Porém, o menor teor em proteína bruta das alheiras do produtor de VINHAIS 1 foi compensado pelo maior ($p < 0,05$) teor de gordura bruta (25,6 versus 12,3). Já, o teor de hidratos de carbono variou entre 16,0 e 23,7%. O menor ($p < 0,05$) e o maior ($p < 0,05$) teores ocorreram nas alheiras dos produtores de VIMIOSO e de MIRANDELA, respectivamente. Relativamente ao teor de cinzas, o menor ($p < 0,05$) teor foi apresentado pelas alheiras do produtor de VIMIOSO e o maior ($p < 0,05$) teor pelas alheiras do produtor de CHAVES (1,24 versus 2,66%). É provável que este último produtor utilizasse uma maior proporção de cloreto de sódio na formulação, embora o teor de sal não foi analisado.

Tabela 5.2: Análise proximal em base húmida (% bh) e base seca (% bs) das alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes. Médias e intervalos de confiança ao 95% são apresentados

Procedência	Proteína bruta (% bh)	Gordura bruta (% bh)	Hidrato de carbono (% bh)	Cinzas (% bh)
Produtor				
Chaves	11,39 ^b [10,65 – 12,13]	12,3 ^a [11,6 – 13,1]	19,5 ^{bc} [18,5 – 20,4]	2,66 ^d [2,56 – 2,77]
Mirandela	12,15 ^b [11,49 – 12,81]	17,7 ^c [17,0 – 18,4]	23,7 ^d [22,8 – 24,6]	2,28 ^c [2,18 – 2,37]
Mogadouro	13,98 ^c [13,32 – 14,64]	18,8 ^c [18,1 – 19,5]	18,4 ^b [17,5 – 19,3]	1,90 ^b [1,80 – 1,99]
Vimioso	11,92 ^b [11,26 – 12,59]	15,6 ^b [14,9 – 16,3]	16,0 ^a [15,1 – 16,9]	1,24 ^a [1,14 – 1,33]
Vinhais 1	6,78 ^a [6,12 – 7,45]	25,6 ^d [24,9 – 26,2]	20,3 ^c [19,5 – 21,2]	1,32 ^a [1,22 – 1,41]
Vinhais 2	12,98 ^b [12,31 – 13,64]	17,1 ^c [16,4 – 17,8]	22,2 ^d [21,3 – 23,0]	2,16 ^c [2,06 – 2,25]
Procedência	Proteína bruta (% bs)	Gordura bruta (% bs)	Hidrato de carbono (% bs)	Cinzas (% bs)
Produtor				
Chaves	24,9 ^{bc} [23,7 – 26,2]	27,0 ^a [26,0 – 28,0]	42,6 ^c [41,2 – 44,0]	5,83 ^d [5,62 – 6,04]
Mirandela	21,8 ^b [20,6 – 22,9]	31,7 ^b [30,8 – 32,6]	42,4 ^c [41,2 – 43,7]	4,08 ^c [3,89 – 4,28]
Mogadouro	26,4 ^c [25,2 – 27,5]	35,4 ^c [34,5 – 36,3]	34,6 ^a [33,4 – 35,9]	3,58 ^b [3,39 – 3,77]
Vimioso	26,6 ^c [25,5 – 27,7]	34,8 ^c [34,0 – 35,7]	35,8 ^{ab} [34,5 – 37,0]	2,76 ^a [2,57 – 2,95]
Vinhais 1	12,6 ^a [11,4 – 13,7]	47,3 ^d [46,4 – 48,2]	37,7 ^b [36,4 – 38,9]	2,44 ^a [2,25 – 2,64]
Vinhais 2	23,9 ^b [22,7 – 25,0]	31,4 ^b [30,5 – 32,3]	40,7 ^c [39,5 – 42,0]	3,97 ^c [3,78 – 4,16]

^{a,b,c,d} Diferentes letras numa coluna indicam diferenças significativas ($\alpha=0,05$)

Relativamente à composição proximal na BS, as alheiras que apresentaram maiores ou menores teores foram os mesmos encontrados na base húmida para a proteína bruta e a gordura bruta. Para os hidratos de carbono, as alheiras dos produtores de MOGADOURO e de CHAVES apresentaram menor ($p<0,05$) e maior ($p<0,05$) teor (34,6 versus 42,6). No que diz respeito às cinzas, as alheiras do produtor de VINHAIS 1 apresentaram o menor teor (2,44%, $p<0,05$) e as alheiras do produtor de CHAVES apresentaram o maior teor (5,83%, $p<0,05$).

Duma forma geral, tal como explicado no primeiro estudo deste trabalho, a grande variabilidade da composição química das alheiras analisadas é esperada e é determinada por diversos fatores, nomeadamente pela composição dos ingredientes utilizados para a sua elaboração que é específica, assim como pelos processos de fabrico adotados por cada produtor (Ruiz & Pérez-Palacios, 2014).

Na Tabela 5.3 apresentamos os resultados (médias e intervalos de confiança ao 95%) dos grupos microbianos quantificados nas alheiras comercializadas pelos 6 produtores artesanais. Pela análise dos dados podemos observar que os resultados não diferem ($p>0,05$) entre os produtores, com a exceção do produtor de MIRANDELA, cujas alheiras apresentam maiores ($p<0,05$) contagens de *S. aureus* e *C. perfringens*.

Relativamente às contagens de mesófilos, as alheiras de todos os produtores apresentaram carga superior a 6,5 log ufc/g, que é o limite máximo para contagem de aeróbios mesófilos em carne picada estabelecido pelo Regulamento (CE) N^o 1441 (2007).

Contagens elevadas de mesófilos também foram observadas por Esteves (2005) que encontrou 8,28 log ufc/g na análise de 96 amostras de alheiras provenientes de quatro diferentes produtores industriais. As contagens elevadas encontradas no presente estudo indicam que as alheiras, em geral, apresentariam qualidade microbiológica insatisfatória, uma vez que não cumprem o critério de higiene estabelecido. Desta forma, é imperioso reverter esta situação através da melhoria das condições de higiene durante o processo de fabrico, bem como, na seleção das matérias-primas.

Tabela 5.3: Grupos microbianos quantificados em alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes. Médias e intervalos de confiança ao 95% são apresentados em log ufc/g

Procedência	Mesófilos	<i>S. aureus</i>
Chaves	9,12 ^a [8,53 – 9,71]	2,70 ^a [2,01 – 3,39]
Mirandela	8,59 ^a [8,07 – 9,12]	5,68 ^b [5,06 – 6,30]
Mogadouro	8,30 ^a [7,77 – 8,83]	1,94 ^a [1,32 – 2,56]
Vimioso	9,06 ^a [8,54 – 9,59]	2,62 ^a [2,00 – 3,23]
Vinhais 1	8,20 ^a [7,67 – 8,72]	1,82 ^a [1,20 – 2,44]
Vinhais 2	8,81 ^a [8,29 – 9,34]	2,00 ^a [1,38 – 2,62]
Procedência	<i>C. perfringens</i>	<i>Salmonella spp.*</i>
Chaves	0,70 ^a [0,03 – 1,37]	0/5
Mirandela	2,24 ^b [1,64 – 2,84]	1/5
Mogadouro	0,70 ^a [0,10 – 1,30]	0/5
Vimioso	0,70 ^a [0,10 – 1,30]	1/5
Vinhais 1	0,92 ^a [0,31 – 1,52]	0/5
Vinhais 2	0,70 ^a [0,10 – 1,30]	0/5

^{a,b,c,d} Diferentes letras numa coluna indicam diferenças significativas ($\alpha=0,05$)

*s/n representa número de amostras positivas s do total de amostras n

No que respeita a *S. aureus* e *C. perfringens* as alheiras do produtor de MIRANDELA apresentaram uma carga microbiológica superior ($p<0,05$) às das alheiras dos outros produtores, com médias de 5,68 e 2,24 log ufc/g, respectivamente. Da mesma forma, Esteves (2005) também encontrou teores elevados destes microrganismos no estudo por si realizado. A elevada carga microbiológica encontrada neste estudo pode provir da matéria-prima, em especial das tripas utilizadas para o enchimento e da deficiente manipulação pelos operadores durante o processo de fabrico (Esteves, 2005). De facto, o principal habitat de *S. aureus* é a pele e as vias respiratórias do homem e animais de sangue quente; estima-se que entre 30 a 50% dos indivíduos saudáveis são portadores deste microrganismo (Esteves et al., 2006b).

Relativamente à presença de *Salmonella spp.*, nas alheiras dos produtores de MIRANDELA e de VIMIOSO, este microrganismo foi confirmado em 1 das 5 alheiras analisadas. Contudo, como discutido anteriormente, a presença deste microrganismo na alheira pode provir das tripas utilizadas para o enchimento do produto.

As Figuras 5.1. e 5.2 mostram os mapas bidimensionais das características físico-químicas e microbiológicas, das alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais, obtidos por análise de componentes principais após rotação varimax.

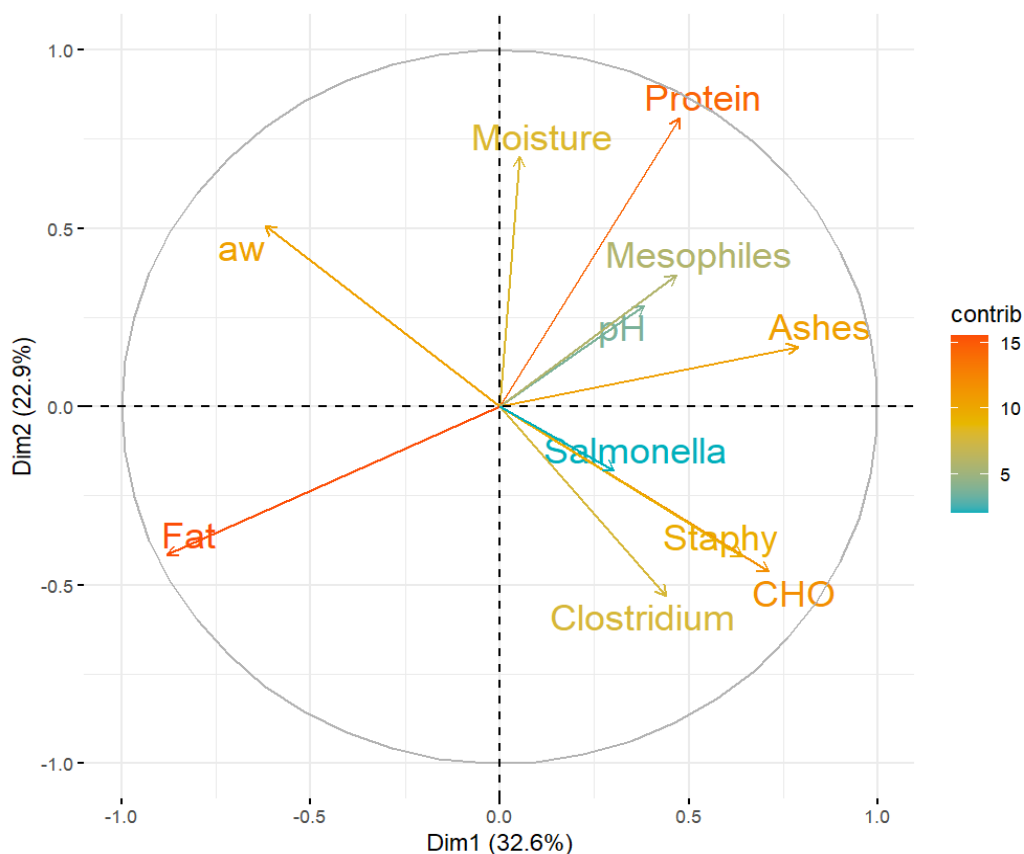


Figura 5.1: Mapa bi-dimensional das características composicionais e microbiológicas das alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes. Moisture: Humidade; Protein: Proteína; Fat: Gordura; Ashes: Cinzas; CHO: Hidratos de carbono; Mesophiles: Mesófilos; Staphy: *S. aureus*

A contribuição das variáveis originais para cada uma das componentes principais pode ser avaliada pela sua correlação com as componentes principais extraídas. A análise de componentes principais foi capaz de identificar duas componentes que explicaram

55,5% da variação nas 11 variáveis originais. A primeira componente caracterizou-se pelas correlações altas e positivas com o teor de hidratos de carbono ($r=0,71$) e cinzas ($r=0,79$), e a contagem de *S. aureus* ($r=0,64$), e pelas correlações altas e negativas com a a_w ($r=-0,62$) e o teor de gordura ($r=-0,88$). Esta componente foi responsável por 32,6% da variação nas 11 variáveis originais.

A segunda componente principal foi responsável pela explicação de uma variação adicional de 22,9% nas variáveis originais. Esta componente apresentou correlações altas e positivas com os teores de humidade ($r=0,70$) e de proteína ($r=0,81$), e correlação moderada e negativa com a contagem de *C. perfringens* ($r=-0,53$).

Cabe destacar que os três patogênicos analisados, *Salmonella*, *S. aureus* e *C. perfringens* resultaram estar positivamente correlacionados entre si, o qual indica que as más condições de higiene e as pobres práticas de fabrico são responsáveis pelas altas contagens ou incidências destes microrganismos patogênicos. Por sua vez, estes patogênicos estão correlacionados com os maiores níveis de hidrato de carbono nas amostras. A correlação elevada entre as variáveis *Salmonella*, *S. aureus*, *C. perfringens* e hidratos de carbono evidencia uma baixa contribuição do conteúdo de carne e uma elevada contribuição do conteúdo de pão à qualidade microbiológica destas alheiras.

Por outro lado, a proteína, o pH, e a contagem de mesófilos estão positivamente correlacionados entre si e negativamente correlacionados com a gordura. Espera-se que em alheiras com maior valor de pH ocorra maior desenvolvimento de microrganismos mesófilos totais; e que com maior conteúdo de carne na formulação (maior teor de proteína) exista uma tendência para obter uma menor acidez no produto. Um maior teor de gordura está também associado a um desenvolvimento mais lento dos microrganismos, entre os quais se encontram os mesófilos totais.

Através da análise da Figura 5.2 podemos observar a distribuição das características físico-químicas e microbiológicas dos seis produtores dentro de um mapa de qualidade. Este mapa mostra as diferenças e as semelhanças em qualidade entre as alheiras dos diversos produtores.

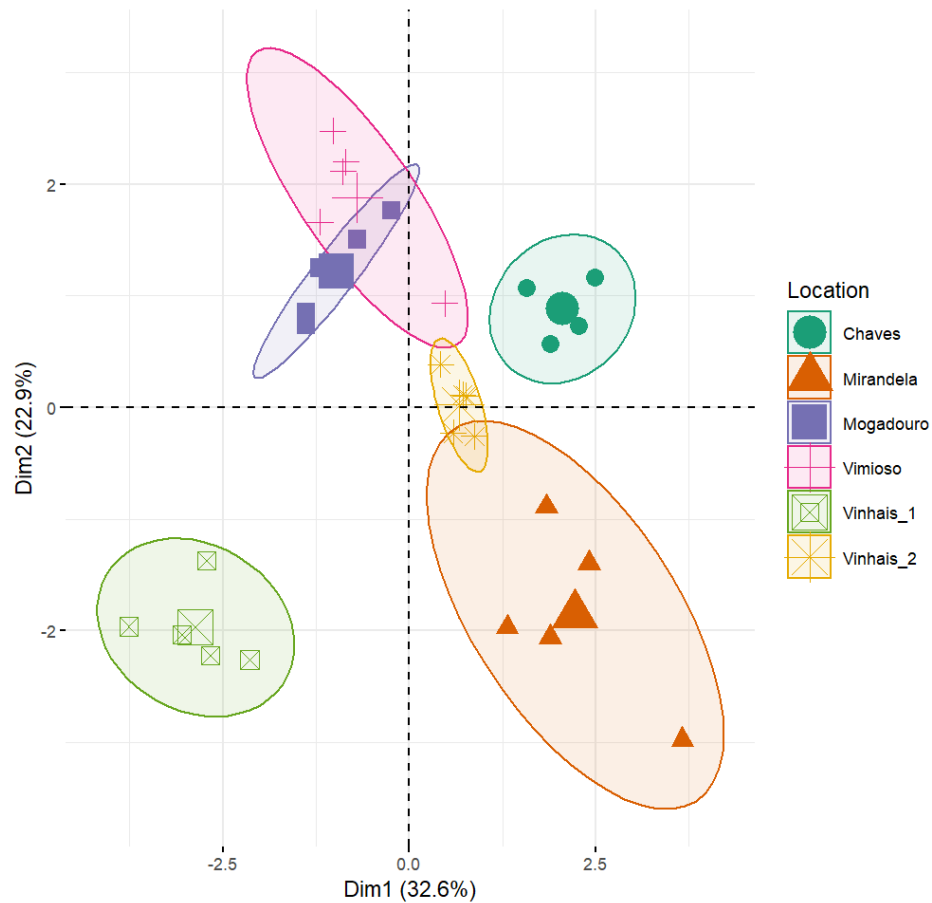


Figura 5.2: Mapa da qualidade composicional e microbiológica das alheiras comercializadas por 6 produtores artesanais de Trás-Os-Montes. Elipses foram sobrepostas a um $\alpha=0,95$

Conforme este mapa de qualidade, as alheiras elaboradas pelo produtor de MIRANDELA contêm maior quantidade de pão (i.e., maior teor de hidratos de carbono) e menor quantidade de carne (i.e., menor teor de proteína) na formulação. Além do mais, são alheiras com baixa qualidade microbiológica. Por outro lado, as alheiras elaboradas pelo produtor de CHAVES contêm maior quantidade de carne e elevada carga de microrganismos mesófilos. Já, a alheira elaborada pelo produtor de VINHAIS 1 contém muita gordura e pouca proteína, contudo, com boa qualidade microbiológica. A alheira elaborada pelo produtor de VINHAIS 2 apresenta uma qualidade intermédia dentre todos os

produtores. Já as alheiras do produtor de VIMIOSO caracterizam-se por possuir um teor de humidade elevado e pouca acidez. Do ponto de vista microbiológico, estas alheiras apresentam qualidade razoavelmente boa. As alheiras do produtor de MOGADOURO caracterizam-se por possuir elevada atividade de água, contudo, de boa qualidade microbiológica.

Em jeito de conclusão, em termos de segurança para o consumidor, as alheiras elaboradas pelos produtores de VINHAIS 1 e MOGADOURO apresentam boa qualidade microbiológica, embora, em termos nutricionais as de VINHAIS 1 contenham elevado teor de gordura. Já as alheiras produzidas pelo produtor de MIRANDELA são as de menor qualidade microbiológica.

6. CONCLUSÕES

A evolução das características intrínsecas das alheiras ao longo do processo de fabrico é diferente nas cozinhas regionais, o que se pode atribuir à duração do processo e às condições ambientais dos dois locais de fabrico. De facto, o controlo ambiental é efetuado através do fogo e da ventilação da cozinha regional, pelo que as variações ambientais contribuem de forma acentuada para a variação das características físico-químicas e microbiológicas das alheiras.

Este trabalho evidencia grandes variações nos processos de fabrico e, como tal, nas características físico-químicas e microbiológicas entre os produtores incluídos neste trabalho. Por outro lado, a variabilidade entre lotes, dentro do mesmo produtor, mostra que os produtores têm dificuldade na definição de um processo de fabrico estável, bem como na padronização das matérias-primas utilizadas para o fabrico das alheiras.

A utilização de matérias-primas com carga microbiológica elevada está associada a contagens superiores de microrganismos patogénicos, nomeadamente de *S. aureus*, *C. perfringens* e *Salmonella* spp., pelo que se recomenda o controlo da qualidade microbiológica das matérias-primas. É, também, de salientar que as elevadas contagens de microrganismos pode constituir perigo para a saúde dos consumidores, pelo que se recomenda a otimização dos processos de fabrico para obter alheiras mais estáveis desde o ponto de vista microbiológico.

A análise de componentes principais mostrou-se uma técnica eficaz para definir um mapa de qualidade das alheiras tradicionais de Trás-os-Montes, evidenciando as principais semelhanças e diferenças nas características físico-químicas e microbiológicas das alheiras dos diferentes produtores. Por outro lado, foi possível identificar uma associação entre as contagens de microrganismos patogénicos e o teor de hidratos de carbono (pão) das alheiras. Tal como observado no Estudo 1, as alheiras tradicionais apresentam uma elevada variabilidade nas características físico-químicas e microbiológicas, pelo que os produtores

devem conhecer os seus processos e ajustá-los para que possam estabilizar as características das suas alheiras. Este aspeto é de primordial importância na estabilidade microbiológica das alheiras, pois a dimensão da segurança microbiológica é fundamental para a valorização destes produtos típicos.

Por fim, salientamos a necessidade de os produtores artesanais de alheiras apostarem no controlo de qualidade dos seus produtos, uma vez que é essencial garantir a qualidade esperada pelos consumidores. A melhoria do processo de fabrico e o seguimento das boas práticas de higiene, em cada etapa do processo de fabrico, são essenciais para reduzir a contagem de microrganismos nas alheiras. Especial atenção deve ser dada às tripas utilizadas para o enchimento, uma vez que são veículos de microrganismos patogénicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology*. (3ª edição). Royal Society of Chemistry. Cambridge. ISBN 9780854042845. 20-62, 182-269 pp.
- Ahn, D. U., & Min, B. (2008). Packaging and Storage. Em “Handbook of Fermented Meat and Poultry”. Editado por: Toldrá, F., Hui, Y. H., Astiasarán, I., Nip, W.-K., Sebranek, J. G., Silveira, E.-T. F., Stahnke, L. H., & Talon, R. John Wiley & Sons, Ltd. 289–300 pp.
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Carneiro, L., Magalhães, R., Hogg, T., & Teixeira, P. (2009). Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for Alheira, a fermented meat sausage. *Food Control*, 20(8), 764–770.
- Albert, P. C., & Muñoz, A. C. G. y. (1996). Productos típicos, territorio y competitividad. *Agricultura y sociedad*, 80, 57–82 pp.
- Almeida. (2009). Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protetoras. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa.
- Almeida, G., Mena, C., & Carneiro, L. (1999). Pesquisa de *Salmonella* spp em produtos cárneos fumados e de salsicharia. <https://repositorio.ucp.pt/handle/10400.14/5613>.
- Anderson, M. del R. P., & Calderón y Pascual, V. (2010). *Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas* (2ª edição). Díaz de Santos. Espanha. 13-215 pp.
- Andrews, W. (1992). *Manual of food quality control. Microbiological Analysis in the food control laboratory*. Capítulo 3. 13-24 pp.
- Andrews, W. H., Wang, H., Jacobson, A., & Hammack, T. (2020). *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Capítulo 5: Salmonella*. FDA. Acedido a 21 de Fevereiro de 2020, disponível em: <http://www.fda.gov>.

- ANVISA, 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001, Anexo I - “Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos”. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil;
- AOAC. (2016). Official methods of analysis of AOAC International (20th Edition). Rockville, MD, USA: The Association of Official Analytical Chemists International.
- Associação Comercial e Industrial de Mirandela. (2015). Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela – IGP. 1–19 pp.
- Associação dos Produtores de Fumeiro da Terra Fria Barrosã. (sem data). Caderno de especificações alheira de Barroso - Montalegre - Indicação Geográfica Protegida.
- Athavale, S. P. (2018). Handbook of Printing, Packaging and Lamination: Packaging Technology. Capítulo 3. Notion Press. ISBN 9781644292518.
- Baird-Parker, T. C. (2010). *Staphylococcus aureus*. Em “The Microbiological Safety and Quality of Food. Volume II. Editado por: Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. Aspen Publishers. Maryland, USA. 1317-1330 pp.
- Barros, D. B., Cristina Sobrosa, Rita Pinheiro, Susana Fonseca, & Manuela Vaz-Velho. (2018). Effect of addition of a starter cultures on physicochemical and sensory properties of “alheira”, a smoked sausage-like product. *Millenium*, 7, 39–48.
- Bradley, K., & Bush, J. (2019). Reproduction in Bacteria. Capítulo 7. Scientific e-Resources. ISBN 978-1-83947-356-2. 213-293 pp.
- Borgi, H. (2019). Prevalence and molecular characterisation of *Salmonella* spp. isolated from alheira, a traditional Portuguese meat product. Tese de Mestrado. Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.
- Brown, M. H. (2000). Processed Meat Products. Em “The Microbiological Safety and Quality of Food. Volume II. Editado por: Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. Aspen Publishers. Maryland, USA. 389-409 pp.
- Campos, S. D., Alves, R. C., Mendes, E., Costa, A. S. G., Casal, S., & Oliveira, M. B. P. P. (2013). Nutritional value and influence of the thermal processing on a traditional Portuguese fermented sausage (alheira). *Meat Science*, 93(4), 914–918.

- Carvalho, M. I. P., Albano, H. C. P., & Teixeira, P. C. M. (2019). Influence of Oregano Essential Oil on the Inhibition of Selected Pathogens in “Alheira” During Storage. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 18(1), 13–23.
- Chi, S. P., & Wu, Y. C. (2014). Spices and Seasonings. Em “Handbook of Fermented Meat and Poultry”. Editado por: Toldrá, F. John Wiley & Sons, Ltd. 79–88pp.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2003). General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969. Acedido a 6/04/2020. Disponível em: <http://www.fao.org>.
- Codex Alimentarius Commission, & Joint FAO WHO Food Standards Programme. (2009). Food hygiene: Basic texts; Codex Alimentarius (4. ed). FAO.
- D’Aoust, J. Y. (2000). Salmonella. Em “The Microbiological Safety and Quality of Food. Volume II. Editado por: Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. Aspen Publishers. Maryland, USA. 1233-1276 pp.
- Despacho Normativo Nº 9 de 11 de Junho. (2015). Diário da República 2ª Série Nº 112. Ministério da Agricultura e do Mar. Diário da República Eletrónico. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://dre.pt>
- DGADR. (sem data). Produtos Tradicionais Portugueses. Produtos de Salsicharia e Fumados. Produtos Tradicionais Portugueses. Acedido a 15 de Maio de 2020, disponível em: <https://tradicional.dgadr.gov.pt>.
- DGADR. (2018). Produtos Tradicionais e DOP/IGP/ETG - Inquérito aos Agrupamentos de produtores de produtos com DOP/IGP/ETG-2017. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.dgadr.gov.pt/sustentavel/dop-igp-etg>.
- Ed-Dra, A., Filali, F. R., Bouymajane, A., Benhallam, F., Allaoui, A. El, Chaiba, A., & Giarratana, F. (2018). Antibiotic susceptibility profile of Staphylococcus aureus isolated from sausages in Meknes, Morocco. *Veterinary World*, 11(10), 1459–1465.
- EFSA & ECDC. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12).
- Elias, M., Santos, A. C., & Raposo, B. (2007). Caracterização de matérias-primas subsidiárias usadas no fabrico de paio de porco alentejano. *Revista de Ciências Agrárias*, 30(1), 424–438.

- Esteves, A. S. M. F. (2005). Perigos microbiológicos em alheira: Principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. Tese de Doutoramento. Universidade de Trás os Montes e Alto Douro.
- Esteves, A., Aymerich, T., Garriga, M., Patarata, L., Fontes, M. C., & Martins, C. (2006a). Tracing *Salmonella* in Alheira processing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 1–10.
- Esteves, A., Saraiva, C., Fontes, M. C., & Martins, C. (2006b). Qualidade higiénica e segurança de produtos de salsicharia transmontana provenientes de produtores particulares. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101, 109–114.
- Esteves, A., Patarata, L., Saraiva, C., & Martins, C. (2008). Assessment of the microbiological characteristics of industrially produced alheira, with particular reference to foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*, 28(1), 88–102.
- Feiner, G. (2006). *Meat Products Handbook: Practical Science and Technology*. Elsevier. 72-83, 89-139, 239-285 pp.
- Fellows, P. J. (2018). *Tecnologia do Processamento de Alimentos - 4.ed.: Princípios e Prática*. Artmed Editora. São Paulo. ISBN 9780081019078. 34- 42, 58-69 pp.
- Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A., & Burkhardt, W. (2019). *Bacteriological Analytical Manual*. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Capítulo 4. U.S. Food & Drug Administration. Acedido a 22 de Abril de 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory>.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., Monteiro, M. J., Hogg, T., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2006). Chemical and microbiological characterization of alheira: A typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Science*, 73(4), 570–575.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Felício, M. T., Mena, C., Hogg, T., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2007). Characterisation of alheiras, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. *Food Control*, 18(5), 436–440.

- Food and Drug Administration (FDA). (2016). Hazard Analysis and Risk-Based Preventive Controls for Human Food: Draft Guidance for Industry—Chapter 4: Preventive controls. 4(August), 1–42.
- Forsythe, S. J. (2010). *The Microbiology of Safe Food*. John Wiley & Sons. ISBN: 978-1-4051-4005-8.
- Gomes, A. M. C. L. (2017). *Influência da Tecnologia de Produção na Qualidade e Salsicharia Tradicional—Tese de Doutoramento*. Universidade de Évora.
- Gordillo, R., Córdoba, J. J., Andrade, M. J., Luque, M. I., & Rodríguez, M. (2011). Development of PCR assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat products. *Meat Science*, 88(4), 767–773.
- Gorris, L. G. M., & Peppelenbos, H. W. (2007). Modified-Atmosphere Packaging of Produce. Em “*Handbook of Food Preservation*”. Editado por: Rahman, S. CRC Press. 316-329 pp.
- Hayes, R. (2013). *Food Microbiology and Hygiene*. Capítulo 2. Springer Science & Business Media. ISBN 9781461535461. 26-97 pp.
- Herrington, T. M., & Vernier, F. C. (2012). Vapour pressure and water activity. Em “*Physico-Chemical Aspects of Food Processing*”. Editado por: Beckett, S. T. Springer Science & Business Media. ISBN 978-1-4613-1227-7. 1–16 pp.
- Horwitz, W., & Latimer, G. W. (2016). Aerobic Count Plate, Dry Rehydratable Film, Petrifilm™ Method-Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th edition, Gaithersburg, Maryland. <http://eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=46762>
- (ICMSF). (2005). *Microbial ecology of food commodities 6*. 2ª edição. Capítulo 1. Kluwer Academic. Nova York, USA. 1 – 88 pp.
- INE. (2001). *Estatísticas Agrícolas 2000*. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>.
- INE. (2006). *Estatísticas Agrícolas 2005*. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>
- INE. (2011). *Estatísticas Agrícolas 2010*. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>

- INE. (2012). Estatísticas Agrícolas 2011. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>
- INE. (2013). Estatísticas Agrícolas 2012. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>
- INE. (2014). Estatísticas Agrícolas 2013. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>
- INE. (2015). Estatísticas Agrícolas 2014. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>
- INE. (2016). Estatísticas Agrícolas 2015. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>
- INE. (2017). Estatísticas Agrícolas 2016. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>
- INE. (2018). Estatísticas Agrícolas 2017. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>
- INE. (2019). Estatísticas Agrícolas 2018. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://www.ine.pt>
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2019). Interpretação de Resultados de Ensaios Microbiológicos em Alimentos Prontos para Consumo e em Superfícies do Ambiente de Preparação e Distribuição Alimentar. Acedido a 28/06/2020. Disponível em: <http://www2.insa.pt/>
- ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003. (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) -Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.
- Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. BioMed Research International. <https://doi.org/10.1155/2014/827965>.
- Kegode, R. b., Doetkott, D. k., Khaita, M. l. & Wesley, I. v. (2008). Occurrence of Campylobacter species, Salmonella species and generic Escherichia coli in meat

- products from retail outlets in the Fargo metropolitan area. *Journal of Food Safety*, 28(1), 111–125.
- Labbé, R. G. (2000). *Clostridium perfringens*. Em “The Microbiological Safety and Quality of Food. Volume II. Editado por: Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. Aspen Publishers. Maryland, USA. 1110-1127 pp.
- Magalhães, A. L., Ramalhosa, E., & Pereira, E. L. (2011). Microbiological characterization of alheira, a typical Portuguese fermented sausage, and its relation with hygienic conditions of the processing environments-INTERNATIONAL FOOD CONGRESS Novel Approaches in Food Industry.
- Medić, H. (2017). Technology of fermented Meat Products. Em “Fermented Meat Products: Health Aspects”. Capítulo 3. Editado por Zdolec, N. CRC Press Taylor & Francis Group. USA. ISBN9781315369846.
- Noronha, J. (2008). Segurança alimentar: Produção de alheiras - Segurança Alimentar de Produtos Cárneos Tradicionais. Acedido a 5 de Maio de 2020. Disponível em: <http://www.esac.pt>.
- Ockerman H. W; Basu, L. (2014). Production and Consumption of Fermented Meat Products. Em “Handbook of Fermented Meat and Poultry”. Capítulo II. Editado por Toldrá, F., Hui, Y. H., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J. G., Silveira, E. F., Stahnke, L. H. Talon, R John Wiley & Sons, Ltd. USA. 60-64 pp.
- Ockerman H. W; Basu, L. (2017). Current Status of Fermented Meat Production. Em “Fermented Meat Products: Health Aspects”. Capítulo II. Editado por Zdolec, N. CRC Press Taylor & Francis Group. USA.
- Park Y. W. (2008). Moisture and Water Activity. Em “Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis”. Editado por: Nollet, L. M. L., & Toldra, F. capítulo 3. CRC Press. 36-65 pp.
- Patarata, L., Judas, I., Silva, J. a., Esteves, A., & Martins, C. (2008). A comparison of the physicochemical and sensory characteristics of alheira samples from different-sized producers. *Meat Science*, 79(1), 131–138.

- Pereira, E., Fontes, M., Pereira, E., Teixeira, A., & Ramalhosa, E. (2012). Efeito do tratamento térmico no perfil de ácidos gordos de alheiras do Nordeste Transmontano. 11º Encontro de Química dos Alimentos.
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Acedido a 8 de Julho de 2020. Disponível em: <http://www.r-project.org/>
- Ray, B., & Bhunia, A. (2007). Fundamental Food Microbiology. CRC Press. pp
- Regulamento (CE) Nº 852. (2004). Do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril. Relativo à higiene dos géneros alimentícios -Jornal oficial L 139.
- Regulamento (CE) Nº 853. (2004). do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril. Que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal- Jornal Oficial L 139.
- Regulamento (CE) Nº 1151. (2012). do parlamento Europeu e do concelho de 21 de novembro de 2012. Relativo aos regimes de qualidade dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios.
- Regulamento (CE) Nº 1441. (2007). da comissão de 5 de Dezembro que altera o Regulamento (CE) Nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, Jornal Oficial L 322.
- Ruiz, J., & Pérez-Palacios, T. (2014). Ingredients. Em “Handbook of Fermented Meat and Poultry”. Editado por Toldrá, F., Hui, Y. H., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J. G., Silveira, E. F., Stahnke, L. H. Talon, R. John Wiley & Sons, Ltd. USA 55-67 pp.
- Russell, N. J., & Gould, G. W. (2012). Food Preservatives. Capítulo 2. Springer Science & Business Media. ISBN 978-0-387-30042-9. 14-24 pp.
- Salavessa, J. J. S. M. (2009). Salsicharia tradicional da zona do Pinhal: Caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos. Dissertação de Doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa.
- Schiraldi, C., & De Rosa, M. (2016). Mesophilic Organisms. Em “Encyclopedia of Membranes”. Editado por: Drioli & E. Giorno, L. Springer. 1–2 pp.

- Serviço Nacional de Saúde (SNS). Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2019). Tabela da Composição de Alimentos. Acedido a 13 de Abril de 2020. Disponível em: <http://www2.insa.pt>
- Silva, N. da, Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. de A., Taniwaki, M. H., Gomes, R. A. R., & Okazaki, M. M. (2017). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. Editora Blucher. Capítulo 9. 117-137 pp.
- Silva, J., Barbosa, J., Albano, H., Sequeira, M., Pinto, A., Bonito, C. C., Saraiva, M., & Teixeira, P. (2019). Microbiological characterization of different formulations of alheiras (fermented sausages). *AIMS Agriculture and Food*, 4(2), 399–413pp.
- Soeiro, A. (2014). Critérios para qualificação de produtos tradicionais. Acedido a 15 de Maio de 2020. Disponível em: <https://qualificaportugal.pt/>.
- Strong, M. (2006). Nutritional Contribution of red Meat in the diet- the state of art. Em “52nd International Congress of Meat Science and Technology: Harnessing and exploiting global opportunities”. Editado por Kerry, J., Troy, D., Pearce, R., Byrne, B. 41-54 pp.
- Territórios em Rede. (2011). Os produtos locais e a cooperação. Acedido a 15 de Maio de 2020, disponível em: Disponível em: <http://www.adril.pt/pdf/encarte>.
- Tibério, L., Cristóvão, A., & Abreu, S. (2008). Microproduções agrícolas e desenvolvimento sustentável em regiões periféricas. Num:17. Acedido a 14 de Maio de 2020. Disponível em: <https://digitalis-dsp.uc.pt>.
- (USDA & FSIS). (2012). Introduction to the Microbiology of Food Processing. 1–21.
- Vinhais, A. de. (2005). Caderno de Especificações da Alheira de Vinhais- Indicação Geográfica Protegida 1–56pp.
- Walker, K. (2011). Practical Food Smoking. Neil Wilson Publishing. ISBN 9781906476540. 1-128 pp.
- Whittemore, C. T., & Kyriazakis, I. (2008). Whittemore’s Science and Practice of Pig Production. (3ª edição). Capítulo 3, Blackwell Publishing. USA. 65-100 pp.

- Willshaw, G. A., Cheasty, T., & Smith, H. R. (2000). Escherichia Coli. Em “The Microbiological Safety and quality of food”. Editado por: Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. Aspen Publishers. Maryland, USA. 1136–116 pp.
- Xavier, C., Cadavez, V., Paula, V. B., Estevinho, L. M., & Gonzales-Barron, U. (2014). Meta-analysis of the incidence of foodborne pathogens in Portuguese meats and their products. *Food Research International*, 55, 311–323.