



# INFLUÊNCIA DA TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO NA QUALIDADE E SEGURANÇA DE PRODUTOS DE SALSICHARIA TRADICIONAL

*Ana Maria Cardoso Lourenço Gomes*

Tese apresentada à Universidade de Évora  
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias

ORIENTADORES:

*Doutora Luísa Cristina Pereira Roseiro*

*Professor Doutor Miguel Nuno Geraldo Viegas Santos Elias*

ÉVORA, ABRIL 2017





Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através da atribuição de uma bolsa individual de doutoramento com a referência SFRH/BD/44255/2008.



RESUMO.....	VI
INFLUENCE OF PRODUCTION TECHNOLOGY IN THE QUALITY AND SAFETY OF TRADITIONAL SAUSAGES.....	VII
AGRADECIMENTOS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	XVII
ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS.....	XVIII
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
1.1. Produtos de salsicharia tradicional.....	20
1.2. Tecnologia de processamento de produtos de salsicharia.....	24
1.3. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos produtos de salsicharia.....	35
1.4. Aminas biogénicas nos produtos de salsicharia.....	47
1.5. Compostos benéficos presentes naturalmente na carne e nos produtos de salsicharia.....	65
<b>2. INCIDÊNCIA DE PAH EM PRODUTOS DE SALSICHARIA TRADICIONAL PORTUGUESA.....</b>	<b>72</b>
2.1. Introdução.....	73
2.2. Materiais e métodos.....	74
2.3. Resultados.....	78
2.4. Discussão.....	91
2.5. Conclusão.....	96
<b>3. EFEITO DO TEOR DE GORDURA, TIPO DE TRIPA E REGIME DE FUMAGEM NO TEOR EM PAH EM PRODUTOS DE SALSICHARIA.....</b>	<b>97</b>
3.1. Introdução.....	98
3.2. Materiais e métodos.....	99
3.3. Resultados.....	103
3.4. Discussão.....	119
3.4. Conclusão.....	123
<b>4. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PAH EM CONDENSADOS DE FUMO GERADOS ATRAVÉS DA COMBUSTÃO DE DIFERENTES MADEIRAS E ESTUDO DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE AROMA DE FUMO EM PRODUTOS DE SALSICHARIA.....</b>	<b>125</b>
4.1. Introdução.....	126
4.2. Materiais e métodos.....	127
4.3. Resultados.....	132
4.4. Discussão.....	151
4.5. Conclusão.....	156
<b>5. INCIDÊNCIA DE AMINAS BIOGÉNICAS EM PRODUTOS DE SALSICHARIA TRADICIONAL PORTUGUESA.....</b>	<b>158</b>
5.1. Introdução.....	159
5.2. Materiais e métodos.....	160
5.3. Resultados.....	164
5.4. Discussão.....	177
5.5. Conclusão.....	184
<b>6. EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE AROMA DE FUMO LÍQUIDO NO PERFIL DE AMINOÁCIDOS, AMINAS BIOGÉNICAS E COMPOSTOS BIOACTIVOS EM PRODUTOS DE SALSICHARIA.....</b>	<b>186</b>
6.1. Introdução.....	187
6.2. Materiais e métodos.....	188
6.3. Resultados.....	193
6.4. Discussão.....	217
6.5. Conclusão.....	228
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>230</b>
7.1. Conclusões gerais.....	231
7.2. Perspectivas de desenvolvimentos futuros.....	235
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>236</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>269</b>

Os trabalhos desenvolvidos consistiram numa investigação abrangente acerca da presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e aminas biogénicas (AB) em produtos de salsicharia portuguesa. Primeiramente foi desenvolvido um estudo de incidência compreendendo produtos fabricados em salsicharias tradicionais do Alentejo e Trás-os-Montes. Com o objectivo de minimizar a presença de PAH, realizaram-se 2 ensaios-piloto testando tecnologias alternativas para a produção de chouriço de carne. Este estudo compreendeu ainda a análise de aminoácidos livres, carnosina, anserina e creatina no chouriço de carne produzido. Complementarmente foram produzidos (a 400 °C e 600 °C) e analisados os condensados de fumo de 5 tipos de madeira mais comumente utilizados pelos produtores destas regiões geográficas.

Os produtos Transmontanos destacaram-se pelos maiores níveis de contaminação com PAH, (particularmente o benz[*a*]antraceno e criseno, ambos carcinogénicos) ultrapassando repetidamente os limites legais previstos. Contudo, a remoção da tripa antes do seu consumo permite a redução do teor em PAH em cerca de 40%. A tripa de colagénio e a adição de aromas de fumo revelaram-se determinantes na redução dos PAH em particular dos pesados, minimizando o risco de exposição. Os PAH pesados não foram detectados naqueles enchidos produzidos com recurso a aromas de fumo. Já a análise dos condensados de fumo demonstrou que o sobre foi globalmente o tipo de madeira que gerava a emissão de menores quantidades de PAH, especialmente quando a combustão se processou a 600 °C.

As AB estiveram em maior quantidade nos produtos Alentejanos, frequentemente com níveis considerados assinaláveis de histamina e de aminas vasoactivas, que são susceptíveis de provocar reacções adversas nos consumidores. Invariavelmente, a utilização de diferentes lotes de matéria-prima condicionou os níveis de AB, aminoácidos e compostos bioactivos. Todavia, os resultados mostraram que a utilização de aroma de fumo associada à secagem em câmara contribuem para minimizar a presença de AB nos enchidos.

Palavras-chave: Produtos de salsicharia tradicional, Processamento tecnológico, Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), Aminas biogénicas (AB) e Compostos bioactivos.

## INFLUENCE OF PRODUCTION TECHNOLOGY IN THE QUALITY AND SAFETY OF TRADITIONAL SAUSAGES

---

The current study consisted in a comprehensive investigation about the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and biogenic amines (BA) in Portuguese traditional dry-fermented sausages. In order to evaluate their impact, an incidence study was performed including several products manufactured in Alentejo and Trás-os-Montes. With the purpose to reduce PAH contamination, 2 pilot-plant scale trials were undertaken, testing alternative processing technologies. Contents of free amino acids, carnosine, anserine and creatine in manufactured dry-fermented sausages were also determined. Developed studies also comprised the analysis of smoke condensates generated by pyrolysis, at 400 °C and 600 °C, of 5 wood types which are often used by producers from these regions.

Products from Trás-os-Montes stood out with the highest PAH contamination levels (particularly benz[*a*]anthracene e chrysene, both carcinogenic), which repeatedly exceeded the established legal limits. Still, casing removal before consumption allows nearly a 40% reduction over PAH initial content. The collagen casing as well as the addition of smoke flavourings proved to reduce PAH levels, thus minimizing risk of exposure. In fact, heavy PAH were not detected in those sausages produced using smoke flavourings. The analysis of smoke condensates demonstrated that the corkwood is the wood type that led to lower PAH emissions, especially when pyrolysis occurred at 600 °C.

The greatest amounts of BA were found in products from Alentejo. These products showed frequently remarkable levels of histamine and vasoactive amines, which are likely to cause adverse reactions in consumers. Using different batches of raw materials significantly affected BA, free amino acids and bioactive compounds contents determined in manufactured dry-fermented sausages. Our results also demonstrated that the use of smoke flavouring associated with a drying processed in controlled environment chamber helps to minimize BA contamination levels.

Keywords: Dry-fermented sausages, Processing technology, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), Biogenic amines (BA) and Bioactive compounds.

## AGRADECIMENTOS

---

A realização deste trabalho não seria possível sem a colaboração de inúmeras pessoas a quem não posso deixar de demonstrar a minha gratidão. As minhas primeiras palavras destinam-se, como não podia deixar de ser, aos meus orientadores.

À Doutora Cristina Roseiro, que desde o primeiro momento acompanhou de forma incansável todo o trabalho. Mesmo no meio das maiores adversidades, a sua procura contínua para me proporcionar as melhores condições de trabalho, bem como as suas sugestões contribuíram de forma decisiva para a concretização desta dissertação.

De igual forma não posso deixar de expressar o meu sincero reconhecimento ao Professor Doutor Miguel Elias que, com a sua inesgotável perseverança e constante incentivo, me fez prosseguir ao longo deste caminho, mesmo quando por vezes as energias falhavam. Os seus ensinamentos, a sua permanente disponibilidade e visão crítica foram decisivos para a realização deste trabalho.

Ao Doutor Carlos Santos, na qualidade de Responsável pelos Laboratórios de Tecnologia Alimentar da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Tecnologia e Segurança Alimentar (UEISTA, INIAV I.P.), agradeço a oportunidade que me concedeu de realizar este trabalho na instituição. Pela sua proximidade, teve um contributo fundamental na prossecução deste objectivo. Foi o primeiro a acreditar que eu poderia concretizar esta demanda, por isso, o meu sincero agradecimento.

Gostaria de agradecer também a todos os colaboradores da UEISTA, pelo seu apoio, técnico e não só, ao longo das várias fases deste trabalho. Deste grupo gostaria de destacar a Doutora Marta Abreu cujo constante incentivo me ajudou a prosseguir com os meus objectivos. Agradeço ainda à Helena Gonçalves a sua colaboração ao longo da realização dos trabalhos, nomeadamente na oficina-piloto.

Agradeço ao Doutor João Almeida a sua colaboração e apoio ao nível da estatística e dos trabalhos na oficina-piloto.

À Doutora Marta Laranjo estou grata pela inestimável ajuda que me deu com a estatística não paramétrica. Não esqueço a sua disponibilidade, as inúmeras conversas telefónicas e a sua perseverança que me mantiveram focada no meu objectivo final. Bem-haja!

Aos meus amigos Diana, Quina, Mária e Tiago S., Ana e Tiago C., devo igualmente um grande agradecimento, pela vossa presença constante. Mesmo quando por vezes me ausentava, o vosso carinho deu-me as energias para terminar esta etapa. Obrigada por tudo!

Carla, para ti, um agradecimento especial... Enquanto colega, mas acima de tudo amiga, agradeço-te as horas incontáveis que “perdeste” comigo. Mesmo ocupada, estiveste sempre

disponível para mim e para as minhas dúvidas. Amiga, não há palavras que cheguem para te mostrar a minha gratidão.

Alina, a ti te devo muitas risadas, a boa disposição e a paciência interminável para os meus desabafos! Sem a tua profunda amizade a escrita desta tese teria sido muito mais complicada. Muito muito obrigada!

Paulo, a ti devo todo o amor, perseverança e sacrifícios que me dedicaste. Mesmo nos momentos mais conturbados acreditaste que era possível. Fizeste-me sonhar, inspiraste-me e seguraste-me quando as energias me faltaram. Não posso esquecer as horas que dedicaste à leitura deste documento, assim como a ajuda na construção de tabelas de dados intermináveis, acompanhada da tua permanente boa disposição. Obrigada “Mô”.

Ao meu pai que, pela sua maneira de ser discreta mas constante, foi o meu “porto seguro” ao longo desta caminhada, com a sua paciência infinita aturou os maus humores e as dificuldades... Obrigada! À minha mãe que, mesmo não estando fisicamente, é uma presença constante e inspiradora na minha vida.

A todos quantos não mencionei individualmente mas que de uma forma ou de outra participaram na realização deste trabalho deixo também o meu mais sincero agradecimento.

Tabela 1. Formulação e condições de processamento de produtos de salsicharia originários de vários países da União Europeia. ....	25
Tabela 2. Vantagens e desvantagens associadas às tripas naturais e artificiais de origem natural.....	31
Tabela 3. Exposição dos consumidores da União Europeia ao BaP e PAH4. ....	38
Tabela 4. Teores em BaP e PAH4 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) determinados em diversos produtos cárneos. ....	39
Tabela 5. PAH definidos como prioritários pela Comissão Europeia e pela US EPA, bem como a respectiva classificação de acordo com a IARC. ....	42
Tabela 6. Valores de TEF para os PAH individuais.....	45
Tabela 7. Teores médios de aminas biogénicas ( $\text{mg}/\text{kg}$ ) em diversos tipos de alimentos.....	50
Tabela 8. Teores médios em aminas biogénicas ( $\text{mg}/\text{kg}$ ) em produtos cárneos e, quando disponível, valor mínimo e máximo. ....	52
Tabela 9. Limites de tolerância sugeridos na bibliografia. ....	64
Tabela 10. Amostragem considerada em função do tipo de produto e região de origem. ....	75
Tabela 11. Teores médios individuais dos PAH (em $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) nos produtos investigados, provenientes das duas regiões de produção consideradas: Alentejo e Trás-os-Montes. ....	80
Tabela 12. Teor relativo médio dos 16 PAH estudados (expresso em %) na tripa e na massa dos produtos analisados em função da região de produção.....	84
Tabela 13. Efeito da região de produção, constituinte principal, teor de gordura, diâmetro e período de fumagem nos teores médios em BaP, PAH leves, pesados, PAH4 e total de PAH (em $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) quantificados nos enchidos tradicionais. ....	86
Tabela 14. Margens de exposição (MOE) estimadas para o BaP e indicador PAH4, associadas à ingestão dos vários produtos estudados.....	91
Tabela 15. Teores médios em PAH (em $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sob a forma média $\pm$ DP) no chouriço de carne. ....	105
Tabela 16. Teores médios em PAH (em $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sob a forma média $\pm$ DP) no chouriço de carne. ....	111
Tabela 17. Teores médios em PAH (em $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sob a forma média $\pm$ DP) nos condensados de fumo líquido. ....	135
Tabela 18. Evolução do teor em PAH (em $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sob a forma média $\pm$ DP) ao longo do tempo de armazenamento. ....	143

Tabela 19. Composição em lenhina de algumas madeiras (resultados apresentados em base seca).....	153
Tabela 20. Amostragem de produtos de salsicharia tradicional em função do tipo de produto e região de origem. ....	161
Tabela 21. Valores médios do pH e fracções azotadas determinados para os produtos de salsicharia investigados para as duas regiões de produção consideradas: Alentejo e Trás-os-Montes. ....	166
Tabela 22. Teores médios em aminas biogénicas (em mg/kg) nos produtos investigados, provenientes das duas regiões de produção consideradas: Alentejo e Trás-os-Montes. ....	170
Tabela 23. Efeito da região de produção, composição e diâmetro nos teores médios em aminas biogénicas (em mg/kg) determinadas nos produtos estudados. ....	174
Tabela 24. Efeito da região de produção e do produtor nos teores médios em aminas biogénicas (em mg/kg) determinadas no chouriço de carne. ....	176
Tabela 25. Gradiente de eluição usado na separação dos aminoácidos. ....	191
Tabela 26. Gradiente de eluição usado na separação da carnosina, anserina e creatina. ....	192
Tabela 27. Valores de pH e teores das várias fracções azotadas (expressos em matéria seca, sob a forma média $\pm$ DP) determinados no chouriço de carne. ....	195
Tabela 28. Teores individuais dos aminoácidos livres (expressos em matéria seca, sob a forma média $\pm$ DP em mg/100 g) determinados no chouriço de carne. ....	200
Tabela 29. Teores individuais das aminas biogénicas (resultados expressos em mg/kg em matéria seca, sob a forma média $\pm$ DP) determinados no chouriço de carne. ....	210

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da tese. ....	xvii
Figura 2. Quantidades de enchidos produzidos em Portugal e respectivos valores de vendas de acordo com as Estatísticas Agrícolas do Instituto Nacional de Estatística. ....	21
Figura 3. Quantidades de produtos de salsicharia qualificados como DOP/IGP/ETG produzidos em Portugal e respectivos valores de vendas. ....	22
Figura 4. Dados relativos ao ano de 2012 acerca da produção de produtos de salsicharia portuguesa com designação IGP (i) e modalidades de escoamento dos produtos de salsicharia com nomes protegidos (ii). Dados relativos ao ano de 2012. ....	23
Figura 5. Etapas genéricas do processamento de produtos de salsicharia. ....	24
Figura 6. Estrutura química dos 16 PAH mais frequentemente estudados nos produtos alimentares. ....	36
Figura 7. Exemplo de uma reacção de adição de Diels-Alder. ....	36
Figura 8. Metabolismo do BaP. ....	43
Figura 9. Estruturas químicas e mecanismos de formação das AB. ....	49
Figura 10. Metabolismo das aminas biogénicas no organismo. ....	62
Figura 11. Reacção de ciclização e nitroação da putrescina (i) e cadaverina (ii). ....	64
Figura 12. Estrutura química da anserina (i) e carnosina (ii). ....	67
Figura 13. Mecanismo de síntese e metabolismo da creatina. ....	69
Figura 14. Exemplo dos cromatogramas de mistura de PAH obtidos através da detecção por UV/Vis (i), fluorescência a 260/366 nm (ii), 260/430 nm (iii) e 270/500 nm (iv). ....	77
Figura 15. Diagrama de extremos e percentis relativo ao teor total em PAH (em µg/kg) quantificados nos produtos investigados. ....	79
Figura 16. Teor total em PAH na tripa e no interior dos produtos estudados, bem como a respectiva contribuição relativa (expressa em %) para os níveis de contaminação no produto inteiro. ....	83
Figura 17. Efeito da composição sobre o grau de migração dos PAH leves (i) e pesados (ii) para o interior dos enchidos, em função do seu constituinte principal (resultados expressos em %). ....	87
Figura 18. Influência do produtor nos teores médios em BaP (i), PAH4 (ii) e Total de PAH (iii) no chouriço de carne (resultados expressos em µg/kg). ....	88
Figura 19. Influência do produtor no perfil (expresso em %) e teor (expresso em µg/kg) em PAH leves (i) e pesados (ii) identificados no chouriço de carne. ....	89

Figura 20. Delineamento experimental para o processamento de chouriço de carne para análise da influência do teor de gordura, tipo de tripa e regime de fumagem.....	100
Figura 21. Representação gráfica do posicionamento das varas com os enchidos, placa de aquecimento (fonte de calor), ventoinha e barreira de inox (utilizada apenas na fumagem indirecta) na câmara de fumagem: i) vista frontal, ii) vista lateral. ....	101
Figura 22. Efeito dos factores principais e respectivas interacções de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores em PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) determinados no chouriço de carne.....	104
Figura 23. Teor total em PAH no produto inteiro em função do teor de gordura, tipo de tripa e regime de fumagem (resultados expressos em $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). ....	106
Figura 24. Teor total em PAH na tripa e no interior do chouriço de carne, bem como a contribuição relativa (expressa em %) de cada um deles para os níveis de contaminação no produto inteiro.....	107
Figura 25. Efeito dos factores principais e respectivas interacções de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores em PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) determinados no chouriço de carne.....	110
Figura 26. Evolução do teor total em PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no produto inteiro (i), tripa (ii) e interior do chouriço de carne (iii) durante o armazenamento para as diferentes tecnologias de processamento.....	114
Figura 27. Evolução do teor do indicador PAH4 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no produto inteiro (i), tripa (ii) e interior do chouriço de carne (iii) durante o armazenamento para as diferentes tecnologias de processamento.....	115
Figura 28. Evolução do teor em PAH ( $\mu\text{g}$ ) na água (i e ii), na embalagem (iii e iv) e no azeite (v e vi) e do teor PAH4 na água, na embalagem e no azeite (vii). ....	117
Figura 29. Processamento de chouriço de carne de acordo com o regime de secagem e metodologias de tratamento testadas. ....	129
Figura 30. Representação esquemática do sistema de combustão e recolha dos componentes do fumo.....	130
Figura 31. Efeito dos factores principais considerados na análise de variância dos teores dos 10 PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) determinados nos condensados de fumo. ....	133
Figura 32. Teor total dos 10 PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) determinados nos condensados de fumo produzidos. ....	133
Figura 33. Perfil de PAH dos condensados de fumo.....	137
Figura 34. Projecção da análise de componentes principais para os condensados de fumo produzidos. ....	138

Figura 35. Efeito dos factores principais e respectivas interacções de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores em PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) determinados no chouriço de carne.....	140
Figura 36. Projecção da análise de componentes principais para os PAH avaliados.....	146
Figura 37. Projecção da análise de componentes principais para os diversos tipos de amostras. ....	147
Figura 38. Evolução do teor total de PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) na tripa (i) e interior do chouriço de carne (ii) durante o armazenamento para as diversas tecnologias de processamento testadas e contribuição relativa média de cada um destes elementos para o teor em PAH4, determinada a partir das amostras “PF”, “1M” e “3M” (iii). ....	149
Figura 39. Evolução do teor do indicador PAH4 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) na tripa (i) e interior do chouriço de carne (ii) durante o armazenamento para as diversas tecnologias de processamento testadas e contribuição relativa média de cada um destes elementos para o teor em PAH4, determinada a partir das amostras “PF”, “1M” e “3M” (iii). ....	150
Figura 40. Separação cromatográfica típica de uma mistura de padrões de amins biogénicas. ....	163
Figura 41. Diagrama de extremos e percentis relativo ao teor total em AB ( $\text{mg}/\text{kg}$ ) quantificados nos produtos investigados. ....	167
Figura 42. Projecção dos factores avaliados em função do CP1 e CP2. ....	172
Figura 43. Perfil de amins biogénicas do chouriço de carne em função do produtor e respectiva região de produção.....	173
Figura 44. Representação esquemática do tipo de amostras processadas, em função do tratamento com AFL e regime de secagem.....	189
Figura 45. Exemplo de cromatograma da mistura de padrões com os 19 aminoácidos (AA) em análise. ....	191
Figura 46. Exemplo de cromatograma de uma solução de padrões individuais de creatina (1), carnosina (2) e anserina (3).....	192
Figura 47. Efeito dos factores principais e respectivas interacções de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores de aminoácidos livres determinados no chouriço de carne (resultados expressos em matéria seca). ....	198
Figura 48. Teor total em aminoácidos livres no chouriço de carne em função do lote de fabrico e tecnologia de secagem (resultados expressos em matéria seca). ....	199
Figura 49. Teor total de amins biogénicas encontrado no chouriço de carne em função da tecnologia de processamento e tempo (resultados expressos em matéria seca)...206	

Figura 50. Efeito dos factores principais e respectivas interacções de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores de aminos biogénicas determinadas no chouriço de carne (resultados expressos em matéria seca). .....	207
Figura 51. Teor total de aminos vasoactivas encontrado no chouriço de carne em função da tecnologia de processamento e tempo (resultados expressos em mg/kg em matéria seca). .....	211
Figura 52. Efeito dos factores principais e respectivas interacções de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores dos compostos bioactivos determinados no chouriço de carne (resultados expressos em mg/100 g em matéria seca). .....	213
Figura 53. Teor total de compostos bioactivos encontrados no chouriço de carne em função da tecnologia de processamento e tempo de armazenamento (resultados expressos em mg/100 g em matéria seca). .....	214
Figura 54. Evolução do teor em carnosina (i), anserina (ii) e creatina (iii) (resultados expressos em mg/100 g em matéria seca). .....	216
Figura 55. Vias metabólicas da arginina e putrescina. ....	225

<b>*</b>	$p < 0,05$
<b>**</b>	$p < 0,01$
<b>***</b>	$p < 0,001$
<b>1M</b>	Produtos com 1 mês de armazenamento
<b>3M</b>	Produtos com 3 meses de armazenamento
<b>AA</b>	Aminoácidos livres
<b>AAL</b>	Teor de azoto dos aminoácidos livres
<b>AB</b>	Aminas biogénicas
<b>ABVT</b>	Azoto básico volátil total
<b>ACL</b>	Acenaftileno
<b>ACP</b>	Análise de componentes principais
<b>AESA</b>	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
<b>AFL</b>	Aroma de fumo líquido
<b>AN</b>	Antraceno
<b>ANP</b>	Azoto não proteico
<b>aw</b>	Actividade da água
<b>BaA</b>	Benz[ <i>a</i> ]antraceno
<b>BaP</b>	Benzo[ <i>a</i> ]pireno
<b>BbFA</b>	Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno
<b>BghiP</b>	Benzo[ <i>g,h,i</i> ]perileno
<b>BkFA</b>	Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno
<b>CE</b>	Comissão Europeia
<b>CHR</b>	Criseno
<b>DBahA</b>	Dibenzo[ <i>a,h</i> ]antraceno
<b>DP</b>	Desvio-padrão
<b>FA</b>	Fluoranteno
<b>FL</b>	Fluoreno
<b>HR</b>	Humidade relativa
<b>HSD</b>	Honest significant differences
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística
<b>IP</b>	Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno
<b>LDPE</b>	Polietileno de baixa densidade (low-density polyethylene)
<b>MOE</b>	Margin of exposure (margem de exposição)
<b>MP</b>	Massa condimentada de chouriço de carne
<b>NA</b>	Naftaleno
<b>ND</b>	Não detectado
<b>ns</b>	Não significante
<b>PAH</b>	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (polycyclic aromatic hydrocarbons)
<b>PAH4</b>	Somatório do teor de BaA, CHR, BbFA e BaP
<b>PF</b>	Produto final
<b>PHE</b>	Fenantreno
<b>PI</b>	Índice de proteólise (proteolysis index)
<b>PY</b>	Pireno
<b>Temp.</b>	Temperatura
<b>US EPA</b>	Unites States Environmental Protection Agency

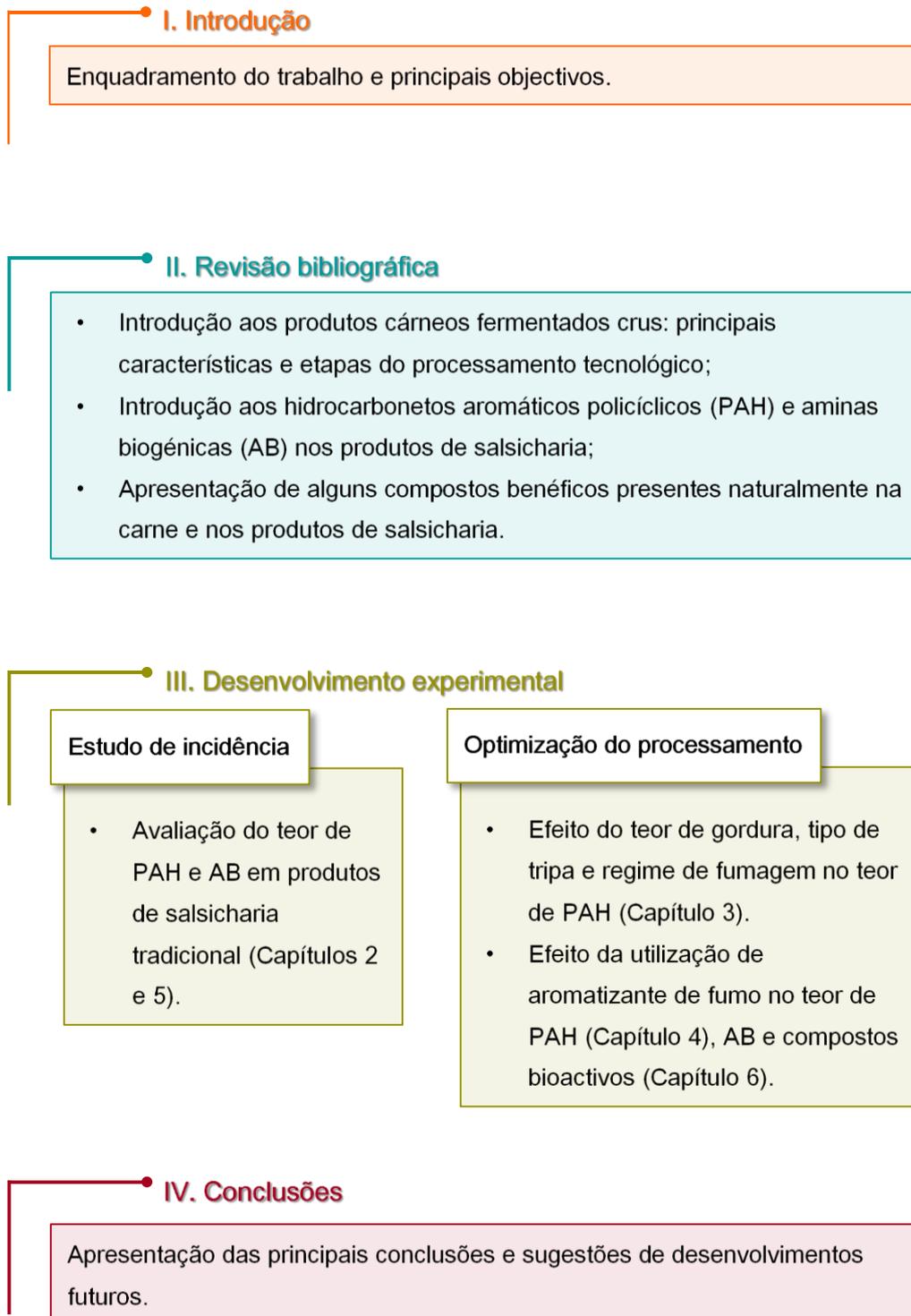


Figura 1. Representação esquemática da estrutura da tese.

O processamento da carne surgiu inicialmente com o propósito de conservar os alimentos por períodos de tempo mais prolongados. Com as tecnologias de conservação disponíveis actualmente, esta necessidade perdeu muita da sua importância. Actualmente, os produtos cárneos tradicionais são adquiridos pelas suas características únicas. De facto, ao longo dos últimos anos, a produção e consumo de produtos de salsicharia tradicional em Portugal tem aumentado de forma bastante consistente.

Tendo em conta que os consumidores actuais se encontram muito mais informados do que há alguns anos a esta parte, a indústria cárnea enfrenta o desafio constante de desenvolver produtos que respondam a elevados padrões de qualidade e segurança. Dada a elevada prevalência de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e de aminas biogénicas (AB) nos produtos de salsicharia, este é um aspecto que tem motivado a comunidade científica a desenvolver metodologias adequadas à minimização dos riscos associados a estas substâncias.

Os trabalhos desenvolvidos nesta investigação deram especial relevância aos PAH, comparativamente às AB, não só porque estes compostos estão na origem de doenças oncológicas, sendo por isso mais perigosos, mas também pelo facto de pouco se saber acerca da sua presença em produtos de salsicharia tradicional portuguesa. Este estudo teve assim como objectivo primordial a determinação do perfil de PAH em produtos de salsicharia tradicional, bem como, avaliação do impacto de múltiplas tecnologias de processamento que permitissem reduzir a presença destes compostos.

A análise do perfil de PAH em produtos de salsicharia tradicional incluiu enchidos fabricados por produtores tradicionais de duas das principais regiões com maior tradição nesta indústria: o Alentejo e Trás-os-Montes. O estudo de incidência estendeu-se também à análise do perfil de AB. Assim, depois deste estudo de incidência, realizou-se um ensaio experimental para avaliar o efeito do tipo de tripa, diferentes regimes de fumagem e teor de gordura sobre os teores de PAH. A partir dos resultados entretanto obtidos, realizou-se um segundo ensaio tecnológico que se debruçou sobre a utilização de aromas de fumo e secagem em câmara por oposição ao regime de fumagem convencional. Para este ensaio em particular foi avaliado ainda o efeito desta tecnologia de processamento sobre os teores de AB, aminoácidos livres e compostos bioactivos.

**1.**

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

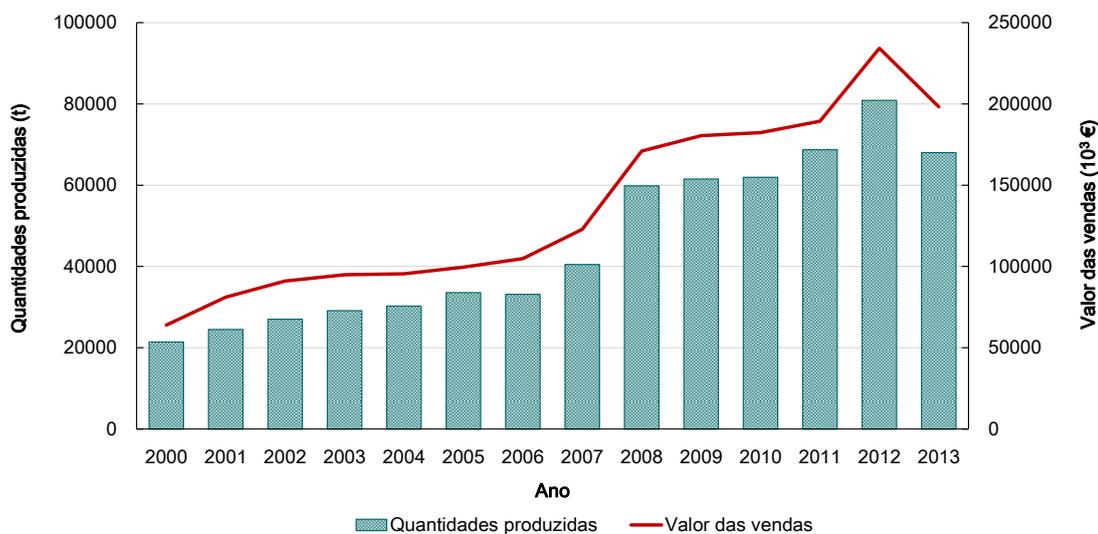
---

## 1.1. PRODUTOS DE SALSICHARIA TRADICIONAL

Em vida e até ao momento do abate, o interior dos animais são, à excepção dos intestinos, é estéril. Só após o abate e durante a desmancha os tecidos são contaminados com microrganismos que rapidamente proliferam, desencadeando o processo de deterioração da carne. Sabe-se hoje que a adopção de práticas com vista à conservação de carne remontam a 3000 anos a.C., mesmo sem que as causas responsáveis pela deterioração dos alimentos fosse ainda compreensível por essa altura. Esta prática permitia, por isso, que em momentos de maior abundância os produtos cárneos pudessem ser processados para serem posteriormente consumidos, em períodos de maior escassez. A par da salga, a fermentação e a fumagem da carne surgem entre as técnicas mais utilizadas para a preservação da carne. Os primórdios da salsicharia em Portugal, de acordo com Elias (2004), parecem ser atribuídos aos povos invasores que permaneceram em território nacional durante o século VI a.C., período em que esta foi uma importante componente da dieta das populações rurais.

Tradicionalmente os enchidos eram produzidos durante os meses de inverno, por ser este período do ano em que se reúnem as condições climatéricas mais favoráveis à sua produção, sobretudo ao nível da temperatura. O crescente interesse económico sobre estes produtos levou a que passassem a ser produzidos durante todo o ano e à sua industrialização (Campelos, 2012). Com o desenvolvimento de métodos de conservação mais eficazes, a produção de enchidos para fins de preservação da carne caiu progressivamente em desuso. Actualmente os produtos de salsicharia visam não só o maior aproveitamento da carne, mas igualmente a obtenção de produtos de elevada qualidade e que vão de encontro à expectativa dos consumidores.

O fabrico de produtos de salsicharia tradicional representa uma parte considerável da indústria cárnea a nível europeu, nomeadamente nos países mediterrânicos como Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia (Marco *et al.*, 2008; Laranjo *et al.*, 2015). Em Espanha, por exemplo, cerca de 6% dos 3 milhões de toneladas de carne de porco produzidos anualmente são destinados ao fabrico de enchidos. A nível nacional esta fracção é ainda mais significativa. Com base nos dados apurados pelo Instituto Nacional de Estatística (INE, 2015), em 2013, das 366414 toneladas de carne de suíno, mais de 66500 tiveram como finalidade a obtenção de produtos de salsicharia tradicional, o que representa cerca de 18% e um valor de vendas na ordem dos 200 milhões de euros. De facto, os resultados que têm vindo a ser publicados nos últimos anos pelo INE, acerca do fabrico de enchidos, dão conta do aumento significativo dos níveis de produção que, em 13 anos, mais do que triplicou (Figura 2).

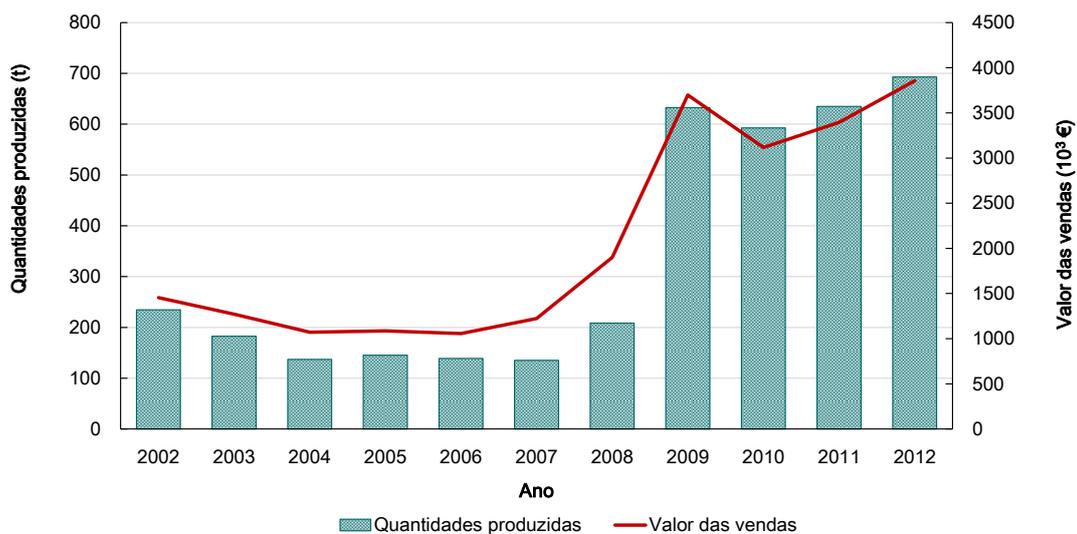


**Figura 2.** Quantidades de enchidos produzidos em Portugal e respectivos valores de vendas de acordo com as Estatísticas Agrícolas do Instituto Nacional de Estatística.

Adaptado de INE (2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015).

Por toda a Europa existem hábitos e costumes muito diferenciados, que influenciam a produção de enchidos desde as matérias-primas utilizadas, aos outros ingredientes, às formulações e aos processos de fabrico seguidos. A relevância dos produtos de salsicharia na indústria cárnea está assim relacionada com a cultura e tradições regionais, o que determina a quantidade e a qualidade dos enchidos produzidos. Por esta razão é possível encontrar uma grande variedade de produtos secos fermentados no mercado europeu, dependendo do país, ou até mesmo da região, que lhes dá origem. Em Portugal, é possível identificar várias zonas de produção com base nas suas tradições. As regiões do Alentejo e Trás-os-Montes são disso um bom exemplo, onde é privilegiada a utilização de matérias-primas locais. Nos produtos tradicionais do Alentejo destaca-se a sua composição, frequentemente à base de carne de porco Alentejano (Elias e Carrascosa, 2010) e a fumagem com lenha de azinho e sobre (Elias *et al.*, 2014; Ledesma *et al.*, 2016b). A carne de porco Bísaro, raça autóctone da região transmontana (Alfaia, 2004; Carvalho, 2010) constitui a matéria-prima incorporada numa parte considerável dos produtos tradicionais desta zona do país, enquanto as madeiras de carvalho e oliveira são as preferidas para a sua fumagem (Esteves, 2005).

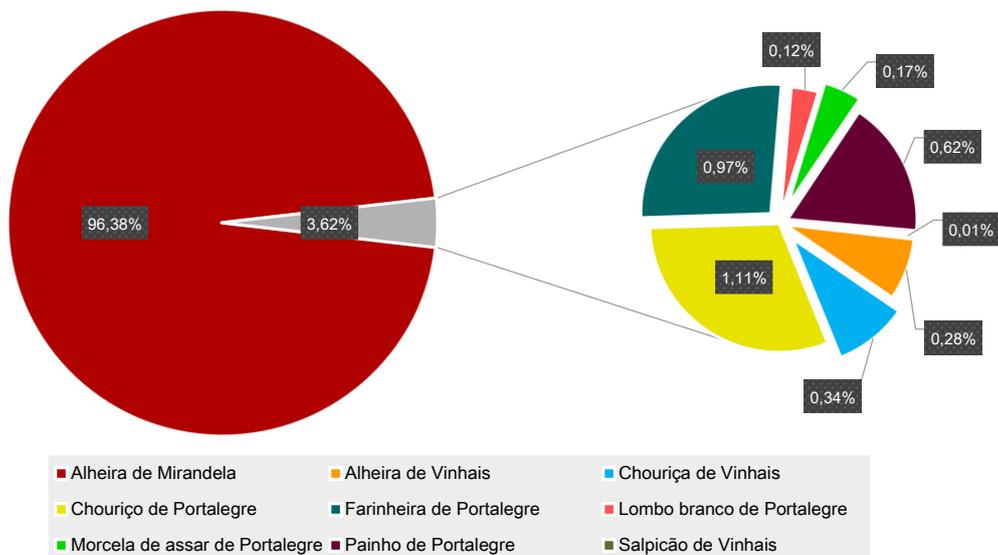
Relatórios elaborados pelo Gabinete de Planeamento e Políticas (GPP) do Ministério da Agricultura e do Mar relativos aos enchidos tradicionais certificados com as designações DOP (Denominação de Origem Protegida), IGP (Indicação Geográfica Protegida) e ETG (Especialidade Tradicional Garantida), apontam para o aumento da produção bem como dos valores das vendas nos últimos anos (Figura 3). Os dados respeitantes ao ano de 2012 dão conta da produção de praticamente 700 toneladas e um volume de vendas próximo dos 4 milhões de euros. Apesar disto, comparativamente à produção total a nível nacional, os produtos tradicionais certificados continuam, segundo a Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR, 2014), a corresponder a uma fracção inferior a 1%.



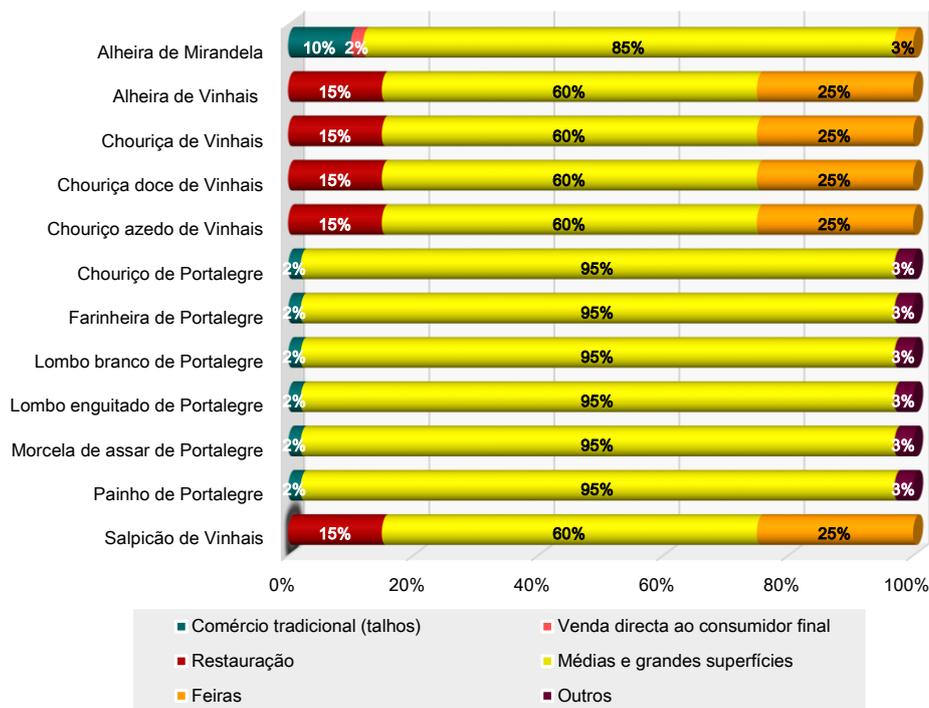
**Figura 3.** Quantidades de produtos de salsicharia qualificados como DOP/IGP/ETG produzidos em Portugal e respectivos valores de vendas. Adaptado de GPP (2014b, 2014a).

Na Figura 4 são apresentados alguns dados relativos à opção de compra dos consumidores no que diz respeito aos produtos de salsicharia certificados, a partir dos quais é possível extrair dois aspectos fundamentais. Por um lado, e muito embora existam já 34 enchidos tradicionais nacionais devidamente certificados com a designação IGP, a alheira de Mirandela é, manifestamente, a escolha mais frequente. Por outro lado, percebe-se que estes produtos chegam até aos consumidores principalmente por intermédio das médias e grandes superfícies.

i)



ii)



**Figura 4.** Dados relativos ao ano de 2012 acerca da produção de produtos de salsicharia portuguesa com designação IGP (i) e modalidades de escoamento dos produtos de salsicharia com nomes protegidos (ii). Dados relativos ao ano de 2012. Adaptado de GPP (2014b).

## 1.2. TECNOLOGIA DE PROCESSAMENTO DE PRODUTOS DE SALSICHARIA

Os procedimentos tecnológicos adoptados variam não só de acordo com a região de produção, como se mostra, a título de exemplo, na Tabela 1, como também entre os respectivos produtores. Existe porém uma série de etapas genéricas, retratadas na Figura 5, que são comuns no processamento destes produtos, das quais fazem parte a preparação das matérias-primas, a preparação da massa, a maturação da massa, o enchimento, a secagem/fumagem e a embalagem.

### 1.2.1. Selecção das matérias-primas

Os enchidos são constituídos maioritariamente por carne e gordura, razão pela qual as suas características são determinantes para a qualidade e segurança do produto final, como tal a sua correcta selecção é considerada de extrema importância.

Seja por razões relacionadas com hábitos de consumo, tradições locais, ou por motivos culturais, os enchidos podem incorporar na sua composição carne de diferentes espécies de animais como a vaca, o cavalo, o javali ou as aves, porém a carne de porco continua a ser indiscutivelmente a mais utilizada pelos produtores (Vural e Özvural, 2007; Vignolo *et al.*, 2010; Hierro *et al.*, 2015; Ruiz, 2015). Já a gordura utilizada no fabrico de enchidos é quase sempre de origem suína, principalmente a gordura subcutânea (Ruiz, 2015). A preparação das matérias-primas é realizada atendendo às características dos músculos e da gordura mais adequadas ao tipo de produto pretendido, através da selecção da carne e da gordura que irão ser incorporadas, bem como a proporção relativa de cada uma delas na massa.



Figura 5. Etapas genéricas do processamento de produtos de salsicharia.

**Tabela 1.** Formulação e condições de processamento de produtos de salsicharia originários de vários países da União Europeia.

	<b>França</b>	<b>Espanha</b>	<b>Itália</b>	<b>Portugal</b>	<b>Grécia</b>	<b>Eslováquia</b>
<i>Formulação</i>						
Tipo de carne	Porco	Porco	Porco	Porco	Porco	Porco
Rácio carne/gordura (%)	80/20	75 - 90/25 - 10	50 - 90/50 - 10	60 - 90/40 - 10	50 - 90/50 - 10	40 - 70/60 - 30
Sal (NaCl) (g/kg)	14 - 30	13 - 23	Desconhecido	Empírico	20 - 30	Empírico
Nitratos/Nitritos (g/kg)	0 - 0,08/0 - 0,3	0 - 0,5	Desconhecido	0,6	0,15/0,2	Desconhecido
Glicidos (g/kg)	0 - 8	0 - 33	Desconhecido	-	0 - 3	0 - 6
Outros aditivos	Pimenta, vinho e alho	Pimenta, vinho	Pimenta, vinho e alho	Pimentão, vinho e alho	Pimenta preta, pimentão e paprika	Pimenta caiena e alho
<i>Condições processamento</i>						
Fumagem						
Temp. (°C) / HR (%)	-	-	-	2 - 21/50 - 90 <sup>1</sup>	18 - 20/85 - 89	>26/30 - 95
Tempo (dias)	-	-	-	5 - 45	2	Empírico
Fermentação						
Temp. (°C) / HR (%)	10 - 22/76 - 99	2 - 24/49 - 94	4 - 26/70 - 84	2 - 12	12 - 24/93 - 80	15 - 16/80
Tempo (dias)	2 - 8	<1 - 5	1 - 10	1 - 3	1 - 7	5 - 12
Maturação						
Temp. (°C) / HR (%)	8 - 14/70 - 90	10 - 18/58 - 85	6 - 22/58 - 83	2 - 21/50 - 90 <sup>1</sup>	12 - 17/76 - 78	15 - 25/82 - 90
Tempo (dias)	31 - 82	15 - 60	15 - 90	5 - 45	14 - 60	12 - 21

<sup>1</sup> As fases de fumagem e maturação ocorrem geralmente em simultâneo.

Temp. - temperatura, HR - humidade relativa.

Adaptado de Latorre-Moratalla *et al.* (2008).

Sob o ponto de vista da qualidade do produto final, é importante seleccionar carnes provenientes de animais adultos (o seu maior teor em mioglobina influencia positivamente o desenvolvimento da cor), que se apresente firme, possua bom poder tampão e capacidade de retenção de água, e níveis de pH entre 5,4 e 6,0 (Hierro *et al.*, 2015). A carne deve estar igualmente limpa de ossos, aponevroses, tendões e gorduras intramusculares moles.

Relativamente à gordura, esta deve ser firme e incluir baixo teor em ácidos gordos polinsaturados (geralmente conhecidos como PUFA, da designação inglesa *polyunsaturated fatty acids*), característica necessária para prevenir a exsudação excessiva dos produtos durante o processamento, bem como a rápida oxidação da gordura e o conseqüente desenvolvimento do ranço (Hierro *et al.*, 2015). De acordo com estes autores, existem contudo algumas excepções, como os produtos fabricados a partir de carne de porco Ibérico, que se caracterizam por conterem na sua constituição quantidades consideráveis de gordura intramuscular e subcutânea, ambas ricas em ácidos gordos insaturados. Neste caso particular, como refere Elias (2004), o elevado grau de insaturação da gordura destes animais contribui directamente para o aroma e sabor destes produtos, com a vantagem adicional dos polifenóis e tocoferóis nela contidos desempenharem uma importante acção protectora sobre a oxidação.

### **1.2.2. Miga**

A miga consiste na redução da carne e da gordura em pedaços adequados às características desejadas para os produtos, podendo esta ser realizada manual e/ou mecanicamente. Este processo deve ser realizado a baixas temperaturas, geralmente entre -5 e 0 °C. A manutenção da temperatura dentro destes limites permite que o corte efectuado seja preciso, evitando perdas ao nível da fracção lipídica que redundariam em alterações negativas da cor e textura do produto final. Segundo Ordoñez *et al.* (1999), durante o processo de miga as fibras musculares são quebradas e as proteínas miofibrilhares ficam expostas à acção do sal. Estes mesmos autores referem ainda a importância do efeito do sal nos processos electrostáticos para a formação do filme proteico que envolve as partículas de gordura e favorece as interacções entre proteína - gordura e proteína - proteína. São estas interacções que, por sua vez, são responsáveis pela adesão entre os fragmentos de carne e gordura e a ligação da massa, condição necessária para que os produtos adquiram a textura que lhes é característica.

### **1.2.3. Preparação da massa**

Esta etapa do processamento diz respeito principalmente à incorporação dos restantes ingredientes na mistura de carne e gordura preparada anteriormente. No conjunto dos ingredientes adicionados incluem-se os condimentos e aditivos, também eles seleccionados de acordo com as características previamente definidas para os produtos. Entre os mais utilizados encontram-se, por exemplo, o sal (cloreto de sódio), aditivos (nitritos e nitratos, ácido ascórbico, entre outros) e outros ingredientes (como o vinho, o açúcar, as especiarias e as ervas aromáticas,

entre outros), bem como as culturas de arranque (bactérias do ácido láctico e estafilococos coagulase-negativos) (Vignolo *et al.*, 2010).

O sal adicionado apresenta inúmeros benefícios que, sob o ponto de vista tecnológico, o tornam imprescindível para a indústria cárnea. Desde logo, porque promove a redução da actividade da água ( $a_w$ ) e a proliferação de microrganismos indesejáveis, que como se sabe, são condições elementares para a garantia da segurança microbiológica dos enchidos (Slobodan e Vesna, 2011). Outro benefício associado ao cloreto de sódio prende-se com a maior capacidade de extracção das proteínas miofibrilhares essencial para a ligação da massa dos enchidos, favorecendo a coesividade aos produtos (Desmond, 2006; Laranjo *et al.*, 2015). Efectivamente sabe-se que existe um limite para a  $a_w$  mínimo abaixo do qual os microrganismos não conseguem crescer (Durack *et al.*, 2008). A este respeito Elias (2004) refere que a maioria das bactérias halossensíveis não se desenvolve na presença de teores de sal de 10%, sendo que níveis de 5% inibem apenas aquelas anaeróbias. A nível sensorial, além da textura, o sal apresenta um efeito positivo no desenvolvimento da cor e do sabor característico deste tipo de produtos.

O recurso às especiarias visa especialmente melhorar a cor, o aroma e o sabor dos produtos cárneos, muito embora lhes seja também reconhecida uma importante acção bacteriostática e antioxidante contribuindo, desta forma, para a conservação dos mesmos (Cui *et al.*, 2010; Tajkarimi *et al.*, 2010). O alho (*Allium sativum*) e o pimento (*Capsicum annuum* L.) estão entre os condimentos mais utilizados na produção de enchidos, nomeadamente em Portugal, todavia é frequente a utilização de outras especiarias, como sejam a pimenta, o cravinho, noz-moscada, entre muitas outras. Além destes ingredientes é frequente a utilização do vinho e do sangue no fabrico de produtos de salsicharia tradicional.

Relativamente aos aditivos, a selecção das substâncias utilizadas é feita por cada produtor em função das opções tecnológicas pretendidas. Porém, no caso dos enchidos que seguem as metodologias tradicionais, a sua incorporação é tendencialmente inferior, por comparação com a produção industrializada (Leroy *et al.*, 2006; Roncalés, 2015).

A adição de conservantes, como os nitritos e nitratos, por exemplo, é fundamental pelo seu papel no controlo do crescimento de bactérias putrefactivas, bem como de patogénicos como o *Clostridium botulinum*. De destacar ainda a sua acção no desenvolvimento da cor e sabor do produto final, mas igualmente na prevenção do fenómeno oxidativo e o aparecimento do ranço (Lorenzo *et al.*, 2008; Marco *et al.*, 2008; Hospital *et al.*, 2015). Apesar dos aspectos positivos existem, todavia, algumas desvantagens relativamente à utilização destes aditivos. De Mey *et al.* (2014) enumeram duas que podem ter consequências directas na saúde dos consumidores: a metahemoglobinémia e a exposição às *N*-nitrosaminas. A primeira é induzida pelo consumo elevado de nitritos que têm um efeito tóxico no organismo dos consumidores. As *N*-nitrosaminas, por sua vez, são compostos com actividade carcinogénica que ocorrem a partir da reacção de

aminas biogénicas (AB) como a putrescina, a cadaverina, a agmatina, a espermidina e a espermina com o nitrito residual (Naila *et al.*, 2010). A utilização destes aditivos encontra-se já devidamente regulamentada pelo Regulamento (UE) N° 1129/2011 (CE, 2011b), que limita os nitritos e nitratos a um teor máximo de 150 mg/kg.

Outra classe de aditivos, igualmente importante, inclui os antioxidantes que são incorporados com o objectivo de melhorar ou estabilizar os produtos de salsicharia, principalmente por via da prevenção das reacções oxidativas, das quais pode resultar a rancificação. Entre os antioxidantes mais utilizados encontram-se os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e ascorbatos. A respeito do ácido ascórbico e ascorbatos, Salavessa (2009) refere a importância daqueles compostos para a indústria transformadora da carne, na medida em que são utilizados como coadjuvantes no processo de fixação da cor. Por outro lado, Honikel (2008) destaca a capacidade do ascorbato reagir com o nitrito e, deste modo, diminuir a produção de *N*-nitrosaminas.

A incorporação de reguladores de maturação tais como açúcares (dextrose, glucose, sacarose e lactose, entre outros) têm como principal função aumentar a quantidade de substrato disponível para o crescimento das bactérias do ácido láctico (BAL) (Vignolo *et al.*, 2010). O rápido desenvolvimento das BAL permite que estas se tornem rapidamente a microflora predominante. Em resultado, maiores quantidades de ácido láctico são libertadas, o que induz o decréscimo mais acentuado do pH do meio que, em conjunto com a natureza competitiva das BAL, inibe o desenvolvimento de microrganismo indesejáveis, como os patogénicos e os que estão envolvidos na deterioração dos produtos. A inoculação de culturas de arranque (vulgarmente designadas por *starters*) nas massas dos produtos de salsicharia tradicional, por sua vez, confere benefícios importantes no que respeita ao nível da sua qualidade na medida em que contribuem para o desenvolvimento do sabor, cor e textura, mantendo as suas características típicas (Simion *et al.*, 2014). Deste modo a fermentação não fica exclusivamente dependente da microbiota endógena, mas também das culturas de arranque que propiciam a padronização do processo produtivo, facto que se traduz na maior homogeneidade do produto final (Leroy *et al.*, 2006; Baka *et al.*, 2011). Baka *et al.* (2011) destacaram ainda o contributo das culturas de arranque para a garantia da segurança e estabilidade dos enchidos, estendendo o seu tempo de vida útil. Entre outras, os lactobacilos e os estafilococos são frequentemente utilizadas por se encontrarem bem adaptadas às condições fermentativas (Elias *et al.*, 2014). Este facto permite-lhes impulsionar as reacções químicas relacionadas com o processo fermentativo, metabolizando os açúcares e convertendo-os em ácido láctico e etanol (Bassi *et al.*, 2015; Cocconcelli e Fontana, 2015). Bolores e leveduras são igualmente utilizados como culturas de arranque para a melhoria das qualidades sensoriais, muito embora os primeiros, por serem microrganismos aeróbicos, tenham a sua aplicação restrita à superfície/tripa dos produtos (Elias *et al.*, 2014).

Na elaboração de enchidos crus curados é ainda habitual o recurso a aditivos estabilizantes, emulsionantes, espessantes e gelificantes (fosfatos, carragenatos, caseinatos e proteínas de

soja, entre outros), cuja presença visa potenciar a emulsificação da massa dos enchidos, promovendo a ligação dos seus fragmentos; reguladores de pH que através da acidificação inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis, promovem a emulsificação e melhoram a proteólise e a lipólise (como o ácido láctico, ácido cítrico, gluconato- $\delta$ -lactona); potenciadores do sabor (ácido glutâmico e glutamatos, ácido guanílico e guanilatos, entre outros); corantes (cochinilha (ácido carmínico), carotenóides, xantofilas, entre outros) e os aditivos para tratamento de superfície, como é o caso de agentes antifúngicos como a pimaricina (Alvarez, 1994; Roncalés, 2015).

#### 1.2.4. Maturação da massa

Com a incorporação dos vários ingredientes na matéria-prima são desencadeadas múltiplas alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas que fazem parte do processo fermentativo que tem lugar durante a maturação da massa, e que são essenciais para a qualidade e segurança do produto final.

É igualmente durante esta fase que se registam as maiores alterações ao nível da microbiota. A grande variedade de grupos de microrganismos presentes inicialmente na carne é gradualmente reduzida (Ordoñez *et al.*, 1999), em consequência do rápido desenvolvimento dos microrganismos que estão mais directamente envolvidas no processo de fermentação como é o caso das BAL, estafilococos coagulase-negativos (ECN) e, embora em menor escala, de bolores e leveduras (Landeta *et al.*, 2013).

Em Portugal, as massas são habitualmente deixadas a maturar em cubas, que permanecem em câmaras de refrigeração, entre 0 e 5 °C com humidades relativas entre 90% e 95%, por períodos que podem variar entre 1 e 4 dias (Ferreira *et al.*, 2007; Roseiro *et al.*, 2008; Elias *et al.*, 2014; Laranjo *et al.*, 2015). É frequente, contudo, que o processo de fermentação ocorra já no interior da tripa, depois do enchimento dos produtos, com regimes de temperaturas que podem variar entre 18 e 27 °C e humidades relativas de 80 - 95%, durante 2 a 12 dias (Di Cagno *et al.*, 2008; Komprda *et al.*, 2009; Aro *et al.*, 2010; Baka *et al.*, 2011; Kameník *et al.*, 2012; Latorre-Moratalla *et al.*, 2014).

#### 1.2.5. Enchimento

Esta etapa compreende a operação de enchimento do invólucro com a massa de carne. Segundo Wu *et al.* (2015) os invólucros de origem natural (principalmente do porco) consistiam, no passado, uma forma de acondicionar a carne, entretanto picada e fermentada. No presente, os invólucros constituem uma barreira física, que protege os produtos de riscos externos, designadamente o da contaminação microbiana, conferindo igualmente maior ligação à massa e forma ao produto final (Djordjevic *et al.*, 2015; Pecanac *et al.*, 2015).

Existe actualmente uma grande diversidade de invólucros, de origem natural e artificial, aptos a serem utilizados no fabrico de produtos de salsicharia. Para ambas as opções encontram-se disponíveis diversos diâmetros em função das características do produto pretendido. No caso dos invólucros naturais, estes incluem, por exemplo, os intestinos (grosso e delgado), o estômago e a bexiga, que são extraídos após o abate do animal. As tripas naturais podem ser de origem suína, bovina, ovina ou caprina (Heinz e Hautzinger, 2007). Os invólucros artificiais são, como o nome indica, produzidos artificialmente, a partir de materiais naturais como o colagénio e a celulose, ou sintéticos se forem usadas poliamidas ou polímeros de polietileno (PE), dicloreto de polivinilideno (PVDC), polipropileno (PP) e poliéster (PET).

Na Tabela 2 são listadas algumas características das tripas naturais e artificiais de origem natural. Os invólucros naturais destacam-se pela sua tenrura, permeabilidade aos componentes do fumo e pelo aspecto tradicional que conferem aos produtos, razão pela qual continuam a ser os preferidos dos produtores tradicionais. A irregularidade no calibre dos produtos e a sua reduzida resistência mecânica constituem, porém, um inconveniente quando se trata de processos à escala industrial. Os invólucros à base de colagénio e celulose, por seu turno, estão mais bem adaptados a processos mais industrializados proporcionando maior rendimento, facilidade de manipulação e maior uniformidade do calibre. Acresce ainda que, a contaminação microbiológica destas tripas é praticamente inexistente não necessitando por isso de cuidados de maior relativamente ao seu armazenamento (Pecanac *et al.*, 2015). Além disso, Ledesma *et al.* (2016a) referem que, para o mesmo tempo de fumagem, comparativamente às tripas naturais, e em comparação com as tripas naturais, os invólucros sintéticos apresentam uma cor mais escura, conferindo aos produtos um aspecto “mais fumado”.

Tratando-se de uma tripa natural ou artificial, a sua elasticidade é um dos critérios mais importantes, pois é esta capacidade que permite a sua expansão durante o enchimento (acomodando no seu interior a massa dos enchidos), assim como a retracção que ocorre durante a etapa de secagem. A selecção da tripa a utilizar deve ainda considerar a sua resistência à pressão produzida durante o enchimento e a sua permeabilidade ao vapor de água e componentes do fumo (Heinz e Hautzinger, 2007).

Por forma a garantir as condições de anaerobiose necessárias, para impedir o desenvolvimento de microrganismos envolvidos na decomposição destes produtos, é imprescindível a remoção de bolsas de ar durante o processo de enchimento. Desta forma, são ainda favorecidos o desenvolvimento da cor, a consistência adequada e a prevenção de reacções oxidativas que, como se sabe, estão na origem de características sensoriais indesejáveis (Feiner, 2006; Heinz e Hautzinger, 2007; Djordjevic *et al.*, 2015). O recurso a enchedoras que funcionam sob vácuo promove já a remoção de uma boa parte do oxigénio contido na massa, ainda assim é necessário que esta seja cuidadosamente compactada, perfurada com agulhas e devidamente atada.

**Tabela 2.** Vantagens e desvantagens associadas às tripas naturais e artificiais de origem natural.

	Natural	Colagénio	Celulose
<i>Custo associado</i>	A mais dispendiosa	Menos dispendiosa	A mais económica
<i>Armazenamento refrigerado</i>	Sim	Sim	Não
<i>Tenrura</i>	Maior	Menor	Removida
<i>Probabilidade de ruptura durante o processamento</i>	Muito provável	Pouco provável	Improvável
<i>Custo associado à preparação</i>	Sim	Não	Não
<i>Necessidade de imersão e lavagem antes do enchimento</i>	Sim	Não	Pode necessitar imersão
<i>Adaptação à operação em máquinas</i>	A menos adaptada	Mais adaptada	A mais bem adaptada
<i>Penetração dos componentes do fumo</i>	Muito permeável	Menos permeável	Pouco permeável
<i>Rendimento</i>	A de menor rendimento	Bom rendimento	A de maior rendimento
<i>Uniformidade do produto final</i>	A menos uniforme	Maior	A mais uniforme
<i>Aspecto tradicional</i>	Maior	Menor	Não tem

Adaptado de Wu *et al.* (2015).

### 1.2.6. Secagem

A etapa de secagem caracteriza-se pela desidratação gradual dos enchidos, com a consequente redução da sua  $a_w$ . Os produtos que no início desta etapa apresentam teores de  $a_w$  próximos de 0,96 - 0,97 (entretanto já reduzidos devido à adição do sal) devem, por efeito da desidratação, atingir níveis iguais ou inferiores a 0,89, condição necessária à estabilização microbiológica dos produtos (Feiner, 2006). Deste modo a massa microbiologicamente instável é convertida num produto estável. Em simultâneo com a redução do teor de água desenrolam-se a proteólise e uma série de alterações físicas, químicas e bioquímicas, já desencadeadas durante a fase fermentativa e que se prolongam ainda durante esta etapa. Este é o caso da conversão dos nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) em nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), crucial para que seja possível o desenvolvimento da cor nos produtos curados e que acontece neste período, sendo esta reacção mediada maioritariamente pelas enzimas redutases dos ECN (Mauriello *et al.*, 2004). Apesar dos claros benefícios relacionados com a sua presença, a utilização de nitritos e nitratos, não é isenta de riscos, e

como tal devem ser usados com moderação. A este respeito, De Mey *et al.* (2014) é da opinião que teores de nitritos e nitratos residuais abaixo de 20 mg/kg são fundamentais para que os teores de outros contaminantes químicos resultantes do nitrito residual, como as *N*-nitrosaminas, se mantenham reduzidos.

As alterações que se verificam ao nível da textura resultam de uma combinação de vários factores em simultâneo, nomeadamente da descida do pH, do processo de desidratação e da proteólise promovida pelas enzimas endógenas e microbianas. Nesta fase as proteínas entretanto extraídas e solubilizadas, por acção da miga e do sal, coagulam, formando um gel que promove a ligação da carne e gordura e o aumento da dureza (Barbut, 2015). Ruiz-Ramirez *et al.* (2005) relembram igualmente a importância da diminuição do teor de água no aumento da dureza dos produtos, seja pela contracção que ocorre naturalmente, com o consequente aumento da densidade do produto, ou devido a novas interacções que se estabelecem entre as proteínas da carne. Em contrapartida, a acção das enzimas proteolíticas, tanto de origem endógena como microbiana, contribuem para a tenrura do produto (Troy e Kerry, 2010). A textura final resultará, por isso, do equilíbrio do conjunto destes factores.

Ao nível dos aromas e sabor, transformações importantes desenrolam-se também nesta fase, na sequência dos processos fermentativo, proteolítico e lipolítico (Casaburi *et al.*, 2008; Flores e Toldrá, 2011). No contexto do processo fermentativo, destaca-se a oxidação dos hidratos de carbono que são utilizados como fonte de energia por parte da microflora presente, em especial das BAL, e a partir da qual resulta a libertação de ácidos orgânicos, entre eles o ácido láctico, que é um dos principais responsáveis pelo sabor ácido nos enchidos (Montel *et al.*, 1998; Flores e Olivares, 2015). Na sequência da extensa proteólise são libertadas grandes quantidades de aminoácidos e péptidos de pequenas dimensões aos quais são reconhecidas propriedades sensoriais relacionadas com o sabor dos produtos (Jurado *et al.*, 2007; Martuscelli *et al.*, 2009; Mora *et al.*, 2015). Segundo Toldrá e Flores (1998), alguns aminoácidos encontram-se correlacionados com sabores específicos. Estes mesmos autores dão como exemplo a relação da tirosina e lisina com o sabor a envelhecido, assim como do ácido glutâmico com o sabor salgado, e da leucina com o sabor ácido. A fenilalanina e isoleucina parecem estar igualmente associadas ao sabor ácido (Toldrá, 1998). A correlação dos aminoácidos com sabores específicos, contudo, não é ainda consensual, seja devido aos níveis de detecção individuais (que por serem frequentemente elevados dificultam a sua percepção), ou devido à sinergia que estes estabelecem entre si bem como com outros compostos presentes nos produtos (Montel *et al.*, 1998). Paralelamente, os aminoácidos acumulados na matriz podem por sua vez ser degradados e originar compostos com impacto ao nível do aroma e sabor dos produtos. A degradação dos aminoácidos decorre maioritariamente da actividade microbiana, muito embora possam ocorrer algumas reacções químicas, como a degradação de Strecker (Ordoñez *et al.*, 1999). Entre os principais produtos da degradação dos aminoácidos destacam-se alguns compostos que, pelo seu baixo nível de detecção, têm um impacto considerável no aroma e no sabor. Este é o caso dos aldeídos, os álcoois e os ácidos que se formam a partir da degradação

de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, isoleucina e leucina), mas também compostos sulfurados (que surgem devido à degradação da cisteína e metionina) ou do fenol e do indol (que têm a tirosina e o triptofano como precursores) (Montel *et al.*, 1998; Flores e Olivares, 2015).

A hidrólise da fracção lipídica, que no caso da carne de porco é constituída principalmente por triglicéridos, ocorre por via enzimática, promovida por lipases endógenas e bacterianas (em particular dos ECN) (Mauriello *et al.*, 2004; Olesen *et al.*, 2004). Durante este processo são libertadas grandes quantidades de ácidos gordos livres (Ordoñez *et al.*, 1999; Zanardi *et al.*, 2004), como os ácidos oleico e linoleico que se encontram entre os mais abundantes na gordura de porco (Wood *et al.*, 2003; Bovolenta *et al.*, 2008; Baer e Dilger, 2014). Apesar destes compostos não apresentarem qualquer tipo de aroma (Elias, 2004), da sua autooxidação surgem inúmeros compostos voláteis, eles sim providos de aroma e sabor. Ainda que a oxidação lipídica seja um dos principais factores relacionado com a deterioração da qualidade dos produtos cárneos, quando esta ocorre em níveis moderados, é considerada desejável, pois através dela que são obtidas algumas das características sensoriais pretendidas para este tipo de produtos (Ordoñez *et al.*, 1999). Com base em Laranjo *et al.* (2016c), os alcanos, alcenos, aldeídos, álcoois, cetonas e ácidos são os principais produtos das reacções de oxidação dos ácidos gordos. Com excepção dos alcanos e alcenos, todos os outros grupos de compostos, ainda que formados em pequenas quantidades (na ordem dos ppm), devido ao seu baixo limite de percepção sensorial, têm um grande impacto nas características sensoriais dos enchidos.

A duração desta etapa depende de factores relacionados com as condições de secagem (temperatura, humidade relativa, circulação de ar) e o produto (humidade, dimensão, forma, composição) (Grau *et al.*, 2015). Em qualquer dos casos, a velocidade de desidratação deve ser controlada para que a água, contida no interior dos enchidos, possa fluir gradualmente até à sua superfície e, então aí, evaporar. Quando este processo é acelerado, é intensificada a desidratação da camada superficial dos produtos, dando lugar à formação de uma crosta, mais dura e menos permeável à saída da água (Gou *et al.*, 2005; Ruiz-Ramirez *et al.*, 2005), facto que compromete a desidratação dos produtos a partir do interior e a redução da  $a_w$ , com repercussões directas na qualidade e segurança microbiológica do produto final. Um dos mecanismos que pode ser utilizado para prevenir a desidratação excessiva da superfície dos produtos, segundo Grau *et al.* (2015), consiste no aumento da temperatura (que facilita a migração da água a partir do interior) com a manutenção da humidade relativa em níveis adequados. A adição de maiores quantidades de gordura é também responsável pela diminuição da  $a_w$  inicial dos produtos. Neste caso, a velocidade de desidratação é menor sendo por isso, segundo Feiner (2006), necessário manter a humidade relativa a níveis mais elevados, em especial durante a fase inicial de secagem, para evitar a formação da referida crosta. Períodos de secagem mais prolongados são também necessários para os produtos de maior calibre, ou quando se procede a maior fragmentação da carne e gordura (Grau *et al.*, 2015).

Nos métodos tradicionais, e sempre que a fase fermentativa se desenvolve já após o enchimento, é frequente o processo de fumagem coincidir com a fase de secagem dos produtos, decorrendo estes dois em simultâneo. Nestes casos, a temperatura e humidade relativa dentro do fumeiro são determinadas pela fogueira e pela circulação de ar veiculada pela chaminé. Um dos aspectos fundamentais da fumagem tem que ver com o processo de deposição e penetração nos enchidos dos compostos voláteis contidos no fumo (Djinovic *et al.*, 2008a).

O fumo é gerado por combustão incompleta da madeira durante a qual, por meio de pirólise, os seus componentes (celulose, hemicelulose e lenhina) são decompostos numa série de moléculas mais pequenas. A composição do fumo compreende, por isso, uma complexa mistura de compostos cuja formação está dependente de factores como a temperatura, composição da madeira e disponibilidade de oxigénio. Além do vapor de água, do monóxido e dióxido de carbono, são já conhecidas várias centenas de outros compostos orgânicos, nomeadamente álcoois, carbonilos, ácidos carboxílicos, ésteres, hidrocarbonetos (entre os quais os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que serão abordados na secção seguinte), óxidos de nitrogénio e fenóis (Sikorski e Kołakowski, 2010). É precisamente a alguns destes compostos que se devem os benefícios atribuídos ao fumo. Por exemplo, Pegg e Honikel (2015) realçam o papel dos compostos bacteriostáticos e micostáticos que cobrem a superfície exterior dos enchidos e que contribuem para a sua preservação. Este efeito conservante do fumo deve-se principalmente aos compostos fenólicos, aldeídos (tais como o guaiacol e o formaldeído, respectivamente) e ácidos carboxílicos (Goulas e Kontominas, 2005; Pöhlmann *et al.*, 2012; Ledesma *et al.*, 2016b). A acção destes compostos sobre os microrganismos pode manifestar-se de diferentes formas, dependendo da sua sensibilidade. Sabe-se no entanto que as bactérias são mais susceptíveis quando se encontram na sua forma vegetativa, enquanto os fungos são consideravelmente resistentes (Sikorski e Kołakowski, 2010). Recorde-se, contudo, que esta acção é potenciada pelo efeito da temperatura, desidratação e redução da  $a_w$  que ocorrem durante a fumagem. Por esta razão, o processo de fumagem assume especial importância nos métodos artesanais, já que nos produtores mais industrializados o recurso a câmaras de ambiente controlado contribui para garantir a segurança microbiológica dos enchidos. Sikorski e Kołakowski (2010) relembram que os compostos fenólicos do fumo são ainda reconhecidos pela sua forte acção antioxidante, fundamental para retardar a oxidação das gorduras.

Outro aspecto indissociável do processo de fumagem prende-se com o desenvolvimento das características sensoriais (Feiner, 2006; Stumpe-Viksna *et al.*, 2008a; Ledesma *et al.*, 2016a). Segundo Sikorski e Kołakowski (2010), uma parte importante das alterações de cor notadas nos produtos fumados deve-se à deposição dos compostos corados do fumo. A este propósito Ledesma *et al.* (2016b) referem ainda a importância do escurecimento não enzimático, em que, por intermédio da reacção de Maillard, os grupos carbonilo dos hidratos de carbono interagem com os grupos amina das proteínas e das fracções azotadas não proteicas, com a formação de compostos corados (melanoidinas). A acção dos compostos fenólicos contidos no fumo estende-se ainda ao aroma e sabor onde, na opinião de Kostyra e Baryłko-Pikielna (2006), eles

desempenham um papel fundamental. Sabe-se ainda que a este nível os carbonilos e os furanos influenciam fortemente a alteração dos aromas e que os aldeídos e os ácidos estão entre os principais promotores dos sabores desenvolvidos durante a fumaça (Sikorski e Sinkiewicz, 2015). Os aromas e sabores habitualmente associados aos enchidos não dependem apenas dos compostos do fumo, mas também das interações que se estabelecem entre eles e os componentes dos produtos. Deste modo, os aromas são determinados maioritariamente pelos carbonilos e furanos e os sabores pelos aldeídos e pelos ácidos. Os compostos fenólicos, por seu turno, estão envolvidos na modificação tanto do aroma como do sabor.

Apesar de todos os benefícios descritos anteriormente, a fumaça apresenta igualmente alguns inconvenientes que são motivo de preocupação. Sabe-se hoje que durante a pirólise da madeira são libertados inúmeros compostos tóxicos, entre os quais figuram os radicais livres, os aldeídos e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Naeher *et al.*, 2007). Estes últimos, em particular, têm sido considerados como os principais responsáveis pela relação há muito estabelecida entre o consumo de produtos fumados e o desenvolvimento de cancro (Phillips, 1999), sendo esta temática abordada com maior detalhe na secção que se segue.

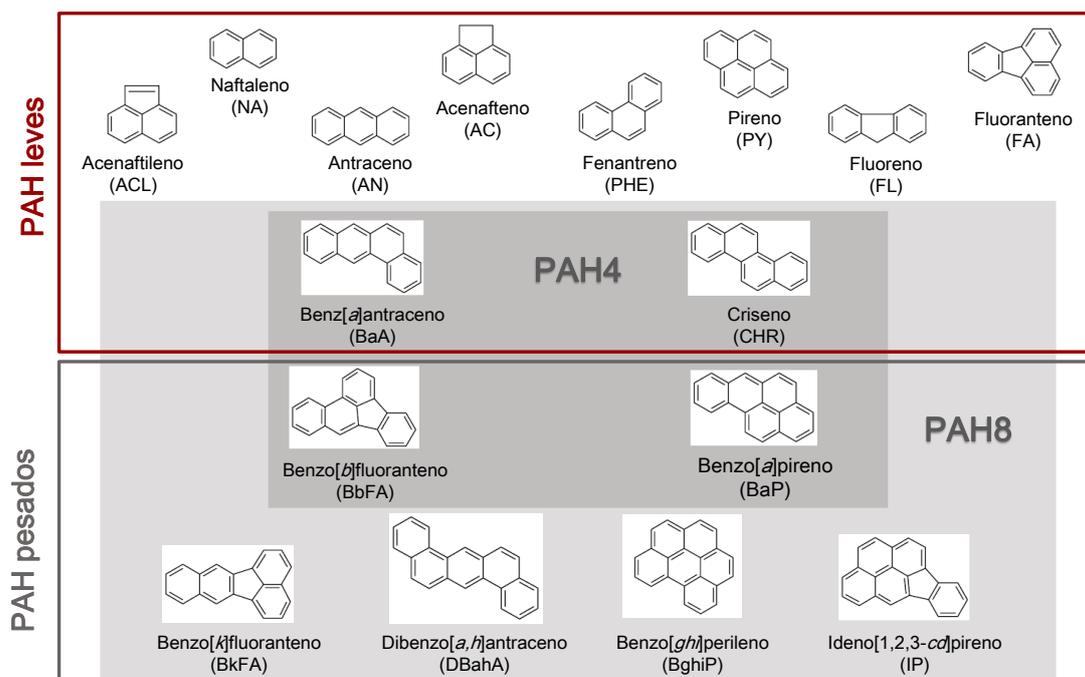
## 1.3. HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS NOS PRODUTOS DE SALSICHARIA

### 1.3.1. Aspectos gerais

A ocorrência de múltiplos contaminantes químicos em produtos de salsicharia é, há muito, motivo de escrutínio no âmbito da segurança alimentar. Entre os mais investigados surgem os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH, da designação inglesa *polycyclic aromatic hydrocarbons*), que pela sua natureza mutagénica e carcinogénica representam um risco para a saúde dos consumidores deste tipo de produtos. Estes compostos integram um vasto grupo de contaminantes ambientais, cuja presença está habitualmente associada à combustão incompleta de matérias orgânicas que decorrem directa, mas não exclusivamente, de processos industriais como recurso energético, facto que determina a sua ampla disseminação. Os combustíveis fósseis, a incineração do lixo, os incêndios florestais e o fumo dos cigarros, por exemplo, constituem algumas das fontes mais significativas no que respeita à emissão destes compostos para o meio ambiente.

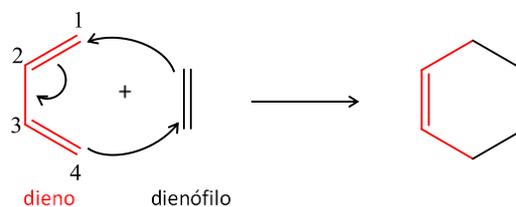
Do ponto de vista químico, os PAH definem-se como compostos orgânicos, formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrogénio, dispostos sob a forma de anel aromático, o qual pode integrar entre 5 a 6 elementos. As suas ligações duplas conjugadas, e conseqüente deslocalização da nuvem electrónica, conferem-lhes uma elevada estabilidade química, tornando-os pouco reactivos (Anyakora, 2007). Como tal, a sua elevada persistência no meio

ambiente é inevitável, permitindo a acumulação de maiores quantidades destes compostos. De realçar ainda a natureza lipofílica dos PAH, que se reflecte na sua baixa solubilidade em água, bem como o facto de serem susceptíveis à fotoxidação quando expostos à radiação ultravioleta (Šimko, 2005). Com base no número de anéis que os compõem, os PAH são designados por leves, quando possuem até 4 anéis aromáticos, e por pesados, se forem formados por 5 ou mais anéis (Dennis *et al.*, 1991; Plaza-Bolaños *et al.*, 2010). Na Figura 6 é apresentado o conjunto de PAH mais frequentemente avaliados nos alimentos.



**Figura 6.** Estrutura química dos 16 PAH mais frequentemente estudados nos produtos alimentares.

Segundo McGrath *et al.* (2003) a formação dos PAH durante a pirólise da biomassa da madeira pode ser atribuída a pelo menos dois mecanismos: reacções de adição do tipo Diels-Alder (ilustrada na Figura 7) e da desoxigenação de compostos aromáticos oxigenados. Durante a pirólise, a matéria orgânica é sucessivamente decomposta e transformada em moléculas mais pequenas (frequentemente radicais livres) que, por acção da temperatura, se recombinam e dão origem a compostos cíclicos. Uma vez formado o anel, a desoxigenação e desidrogenação dos compostos cíclicos conduzem à formação de ligações duplas conjugadas, em que os electrões partilhados se encontram deslocalizados por todo o anel (estrutura típica de um anel benzénico).



**Figura 7.** Exemplo de uma reacção de adição de Diels-Alder.

O perfil de PAH gerado durante o processo de fumagem é amplamente influenciado por factores como a temperatura, a presença de oxigénio, a humidade e a composição da madeira. A temperatura é consistentemente referida como sendo um factor chave no que se refere à formação de PAH. Diversos estudos concluem que o aumento da temperatura favorece a formação de PAH, em especial os pesados (Maga, 1988). Concomitantemente, a humidade e a disponibilidade de oxigénio, por influenciarem directamente a temperatura de pirólise da madeira, são igualmente determinantes para o perfil de PAH gerado. Por outro lado, a combustão de madeiras duras revelou gerar menores quantidade de PAH, especialmente os pesados (conhecidos por ser os mais perigosos) comparativamente às madeiras brandas.

Devido à sua presença ubíqua, facilmente se compreende que a exposição do ser humano aos PAH pode ocorrer tanto por via inalatória, como oral e dérmica. Quanto à sua ocorrência nos alimentos, há muito que esta se encontra identificada, contudo, só mais recentemente se tornaram motivo de preocupação, em virtude de terem sido identificados numa vasta gama de alimentos. São diversos os estudos que demonstram a sua presença desde os vegetais, ao peixe, aos cereais, aos óleos e gorduras, bem como na carne e produtos cárneos (Linares *et al.*, 2010; Bansal e Kim, 2015). Simultaneamente, emergiram claras evidências de que a ingestão de água e alimentos contaminados constituem a maior fonte de exposição humana aos PAH (Martí-Cid *et al.*, 2008; Farhadian *et al.*, 2011). Mais concretamente, estima-se que mais de 90% da exposição da população aos PAH tenha origem nos alimentos (Furton e Pentzke, 1998; Alomirah *et al.*, 2011), por conseguinte é urgente avaliar e controlar o risco de exposição a estes compostos (EC, 2002; Reinik *et al.*, 2007; Plaza-Bolaños *et al.*, 2010).

### **1.3.2. PAH nos produtos cárneos fumados**

Em termos globais existem duas grandes vias pelas quais pode ocorrer a contaminação dos alimentos com PAH: a poluição ambiental (com impacto, por exemplo, nos vegetais que contactam com o ar, água e solos contaminados) ou durante o seu processamento (Camargo e Toledo, 2003; Rey-Salgueiro *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2011). De acordo com os dados recolhidos pela Comissão Europeia (CE) junto dos Estados-Membros (Tabela 3) a categoria da carne e produtos cárneos é um dos agentes responsáveis pela exposição dos consumidores europeus ao benzo[*a*]pireno (BaP) e PAH4, sendo este último constituído pela soma dos teores de benz[*a*]antraceno (BaA), criseno (CHR), benzo[*b*]fluoranteno e BaP.

Nos produtos cárneos a contaminação com PAH decorre quase exclusivamente durante o processamento. Durante esta fase os produtos são sujeitos a tratamentos térmicos, como sejam grelhar, fritar e assar, os quais favorecem a ocorrência destes compostos (Alomirah *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2011; Duedahl-Olesen *et al.*, 2015; Rose *et al.*, 2015; Gorji *et al.*, 2016). A exposição ao fumo para efeitos de cura e secagem, como acontece nos produtos de salsicharia tradicional, constitui a outra via de contaminação decorrente do processamento tecnológico dos produtos

cárneos (Jira, 2009; Andrée *et al.*, 2010; Lorenzo *et al.*, 2010; Wretling *et al.*, 2010; Rozentāle *et al.*, 2015).

**Tabela 3.** Exposição dos consumidores da União Europeia ao BaP e PAH4.

<b>Categoria</b>	<b>BaP (ng/dia)</b>	<b>PAH4 (ng/dia)</b>
<i>Cereais</i>	67	257
<i>Açúcar (incluindo chocolate)</i>	5	25
<i>Gorduras (vegetal e animal)</i>	26	177
<i>Vegetais, nozes e leguminosas</i>	50	221
<i>Frutos</i>	5	75
<i>Café, chá e cacau</i>	21	106
<i>Bebidas alcoólicas</i>	4	25
<i>Carne e produtos cárneos</i>	42	195
<i>Marisco</i>	36	289
<i>Peixe</i>	21	170
<i>Queijo</i>	6	20

Adaptado de EFSA (2008b).

### 1.3.3. Factores que afectam a contaminação dos produtos de salsicharia com PAH

Em virtude do crescente interesse em torno dos PAH, inúmeros estudos foram realizados nos últimos anos a fim de determinar o grau de exposição dos consumidores a estes compostos, através da ingestão de produtos cárneos. Alguns desses resultados encontram-se compilados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Teores em BaP e PAH4 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) determinados em diversos produtos cárneos.

País	Produto	BaP	PAH4	Referência	
Espanha	Produtos cárneos fumados	0,02	-	Garcia Falcon <i>et al.</i> (1999)	
	Carne e produtos cárneos	0,10	1,61	Falcó <i>et al.</i> (2003)	
	Botillo	0,38	2,25		
	Androlla	0,49	2,71		
	Carne e produtos cárneos	0,14	1,45	Martorell <i>et al.</i> (2010)	
Itália	Salsichas tipo Frankfurt	Fumagem tradicional	12,00	-	Roda <i>et al.</i> (1999)
		Câmara de fumagem: método directo	1,40	-	
		Câmara de fumagem: método directo modernizado	0,72	-	
		Câmara de fumagem: método indirecto	0,12	-	
Dinamarca	Salsichas pequenas	0,14	-	Duedahl-Olesen <i>et al.</i> (2006)	
	Salame	< 0,08	-		
	Bacon	< 0,08	-		
Irlanda	Produtos cárneos fumados	0,03	0,18	FSAI (2006)	
Estónia	Presunto	0,40	-	Reinik <i>et al.</i> (2007)	
	Salsichas fumadas	0,40	-		
	Galinha fumada	0,40	-		
Sérvia	Salsichas	Fumagem industrial (indirecta): 1 dia	0,51	0,83	Škrbić <i>et al.</i> (2014)
		Fumagem industrial (indirecta): 3 dias	0,28	1,68	
		Fumagem tradicional (indirecta): 10 dias	0,51	1,49	
	Presunto de vaca	1,09	8,62	Djinovic <i>et al.</i> (2008a)	
	Presunto	0,52	4,48		
	Bacon sem pele	1,04	8,42		
	Bacon com pele	0,55	4,42		
	Cajna	0,24	1,79		
	Sremska	0,33	4,13		
Letónia	Produtos cárneos fumados	0,74	6,36	Rozentāle <i>et al.</i> (2015)	

Nos produtos de salsicharia, o perfil e o grau de deposição/absorção dos PAH é determinada principalmente pelo processo de fumagem, nomeadamente no que se prende com a sua duração, o tipo de madeira e as condições às quais é realizada a sua combustão (Maga, 1988).

A selecção do tipo de madeira usada no fumeiro baseia-se em critérios relacionados com as características sensoriais que lhe estão associadas em termos de aromas e sabores. Além disso, a sua disponibilidade na região em que são fabricados os produtos é um factor igualmente importante. O azinho (*Quercus ilex* L.) e o sobro (*Quercus suber* L.) por exemplo, são os dois tipos de madeira mais utilizados no Alentejo, enquanto em Trás-os-Montes a preferência recai sobre o castanho (*Castanea sativa* Mill.), o carvalho (*Quercus faginea* Lam.) e a oliveira (*Olea europaea* L.). A combustão de madeiras duras, como as mencionadas anteriormente, é de facto recomendada, por duas razões primordiais. A primeira prende-se com o facto de a pirólise de madeiras macias conferir ao fumo aromas e sabores indesejáveis (Meier, 2009). Por outro lado, a combustão deste tipo de madeiras gera habitualmente maiores quantidades de PAH. A comprovar isto mesmo podem ser referidos os trabalhos de Guillén *et al.* (2000c), García-Falcón e Simal-Gándara (2005) e Stumpe-Viksna *et al.* (2008a) onde, de acordo com estes últimos autores, a libertação de maiores quantidades de PAH durante a pirólise de madeiras macias se deve à maior quantidade de resina que contêm.

A par do tipo de madeira, a temperatura de combustão tem uma influência dramática sobre o perfil e a quantidade de PAH formados. Há muito que é conhecida a relação directa entre o aumento de temperatura e a formação de maiores quantidades de PAH, especial sobre os compostos de elevado peso molecular como o BaP (Maga, 1988). A temperatura de combustão é, por sua vez, condicionada pela humidade da madeira e a disponibilidade de oxigénio. A nível nacional, para uma parte considerável dos produtores, em especial os produtores tradicionais, as condições no interior do fumeiro são influenciadas pelas condições climatéricas através da chaminé impossibilitando, desta forma, um maior controlo sobre a temperatura de combustão.

Ainda relativamente ao processo de fumagem, de referir a importância da localização dos produtos dentro do fumeiro. Em primeiro lugar, porque a proximidade dos produtos à origem do fumo favorece a acumulação de maiores quantidades de PAH. De igual forma, quando os enchidos são posicionados directamente sobre a fogueira a gordura que contêm pode derreter e ela própria sofrer pirólise dando lugar à formação de PAH e níveis de contaminação mais elevados (Chung *et al.*, 2011; Roseiro *et al.*, 2011).

Além dos aspectos relativos à fumagem, o grau de deposição e incorporação dos PAH nas camadas internas é também afectado em função das características intrínsecas dos produtos. Entre eles, a existência de uma barreira física (como a tripa dos enchidos, ou a pele do bacon, por exemplo) e o teor de gordura são dois factores comumente apresentados pela literatura como exercendo influência sobre a acumulação de PAH nos produtos (García-Falcón e Simal-Gándara, 2005; Duedahl-Olesen *et al.*, 2006; Djinovic *et al.*, 2008a).

As maiores quantidades de PAH são encontradas à superfície dos produtos, como tal, a tripa assume especial importância na medida em que constitui uma barreira à penetração dos PAH (García-Falcón e Simal-Gándara, 2005). Assim, a migração destes compostos será tanto mais dificultada quanto maior for o grau de impermeabilidade da tripa. Considerando os resultados publicados por alguns autores (García-Falcón e Simal-Gándara, 2005; Škaljac *et al.*, 2014), a tripa natural tem apresentado de forma consistente maior grau de permeabilidade aos PAH, relativamente aos invólucros semi-sintéticos. De igual modo, em virtude da natureza lipofílica dos PAH, maiores quantidades de gordura constituem um agente facilitador da absorção destes compostos, como o demonstra o trabalho de Pöhlmann *et al.* (2013).

#### 1.3.4. Efeitos toxicológicos

A relação entre a exposição aos PAH e o desenvolvimento de cancro foi estabelecida pela primeira vez no século XVIII, por Percivall Pott, que descreveu a ocorrência de cancro no escroto em limpa-chaminés (Luch, 2004). Muito embora os primeiros dados referentes às propriedades carcinogénicas dos PAH datem de 1775, a identificação do primeiro composto envolvido neste mecanismo surgiu bem mais tarde, já em 1930, quando se relacionou o dibenzo[*a,h*]antraceno (DBahA) com a actividade carcinogénica (Furton e Pentzke, 1998). A evidência do desenvolvimento de cancro do colo-rectal e a exposição aos PAH foi igualmente identificada por Sachse *et al.* (2002), Cross e Sinha (2004), Gunter *et al.* (2005) e Sinha *et al.* (2005). O efeito tóxico destes compostos foi ainda associado à ocorrência de cancro no pulmão e da mama (Lan *et al.*, 2005; Brody *et al.*, 2007), assim como de cancro do estômago e esófago (Ward *et al.*, 1997). Em Portugal uma relação similar foi reportada por Monteiro *et al.* (1974) e Monteiro *et al.* (1983), que detectaram fortes indícios de que a elevada incidência de cancro gástricos verificada na região da Guarda seria devida à ingestão de teores importantes de PAH presentes nos produtos fumados, muito apreciados pelos consumidores daquela região. De acordo com a Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América (US EPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) foram encontrados defeitos congénitos quando roedores em período de gestação estiveram expostos a níveis superiores de 300 ppm de BaP na sua alimentação (US EPA, 2008). A mesma fonte refere ainda que roedores expostos a níveis de BaP superiores a 900 ppm durante vários meses desenvolveram problemas de fígado e sangue. A exposição alimentar parece estar ainda na origem da contaminação do leite materno e do cordão umbilical, onde se encontraram vestígios de BaP, DBahA e CHR, facto que, de acordo com Madhavan e Naidu (1995), confirma a exposição do feto aos PAH.

Na Tabela 5 são apresentados os PAH prioritários seleccionados pela CE e pela US EPA. Da referida tabela constam ainda as classificações atribuídas pela Agência Internacional da Organização Mundial de Saúde que se dedica à investigação do cancro (IARC, abreviado de *International Agency for Research Cancer*) em função da sua toxicidade. A classificação dos compostos por parte deste organismo é baseada em cinco grupos distintos: carcinogénico para

os humanos (Grupo 1); provavelmente carcinogénico em humanos (Grupo 2A); possivelmente carcinogénico para os humanos (Grupo 2B); não classificável quanto à sua carcinogenicidade para os humanos (Grupo 3); provavelmente não carcinogénico para os humanos (Grupo 4). Apesar disto, no entender de Wenzl *et al.* (2006), ainda que alguns PAH individualmente não estejam envolvidos no processo de carcinogénese, o facto de ocorrerem repetidamente em misturas complexas pode resultar num efeito sinérgico.

**Tabela 5.** PAH definidos como prioritários pela Comissão Europeia e pela US EPA, bem como a respectiva classificação de acordo com a IARC.

Nome comum	Abreviatura	CE <sup>1</sup>	EPA <sup>2</sup>	Classificação <sup>3</sup>
<i>Acenafteno</i>	AC		X	3
<i>Acenaftileno</i>	ACL		X	-
<i>Antraceno</i>	AN		X	3
<i>Benz[a]antraceno</i>	BaA	X	X	2A
<i>Benzo[b]fluoranteno</i>	BbFA	X	X	2B
<i>Benzo[j]fluoranteno</i>	BjFA	X		2B
<i>Benzo[k]fluoranteno</i>	BkFA	X	X	2B
<i>Benzo[b]fluoreno</i>	BbFL	X		3
<i>Benzo[ghi]perileno</i>	BghiP	X	X	3
<i>Benzo[a]pireno</i>	BaP	X	X	2A
<i>Criseno</i>	CHR	X	X	3
<i>Ciclopenta[cd]pireno</i>	CPP	X		3
<i>Dibenzo[a,h]antraceno</i>	DBahA	X	X	2A
<i>Dibenzo[a,e]pireno</i>	DBaeP	X		2B
<i>Dibenzo[a,h]pireno</i>	DBahP	X		2B
<i>Dibenzo[a,i]pireno</i>	DBaiP	X		2B
<i>Dibenzo[a,l]pireno</i>	DBalP	X		2A
<i>Fenantreno</i>	PHE		X	3
<i>Fluoranteno</i>	FA		X	3
<i>Fluoreno</i>	FL		X	3
<i>Indeno[1,2,3-cd]pireno</i>	IP	X	X	2B
<i>5-Metilcriseno</i>	5-MCH	X		2B
<i>Naftaleno</i>	NA		X	2B
<i>Pireno</i>	PY		X	3

<sup>1</sup> PAH definidos como prioritários pela Comissão Europeia (EC, 2002).

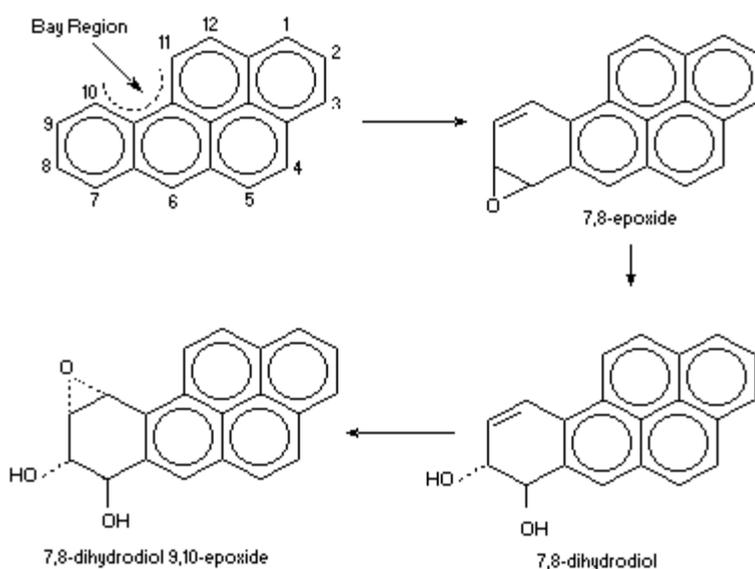
<sup>2</sup> PAH definidos como prioritários pela US EPA (2014).

<sup>3</sup> Classificação dos compostos de acordo com a IARC (2016). Grupo 2A: provavelmente carcinogénico em humanos; Grupo 2B: possivelmente carcinogénicos para os humanos; Grupo 3: não classificável quanto à sua carcinogenicidade para os humanos.

Os trabalhos realizados nos últimos anos, para além de reforçarem o efeito carcinogénico, mutagénico e teratogénico reconhecido nos PAH, procuram explicar os mecanismos envolvidos assim como os factores que dão início ao desenvolvimento de cancro (Topinka *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2008; Chakravarti *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2010; Korsh *et al.*, 2015; Li

*et al.*, 2016). Uma vez no interior das células, os PAH são metabolizados a fim de serem excretados, todavia, é precisamente nesta fase que os metabolitos são formados e que podem ocorrer danos no ADN (Cross e Sinha, 2004), que numa fase inicial compreende a oxidação dos PAH através da acção enzimática do citocromo P450 (Xue e Warshawsky, 2005), a partir da qual se formam epóxidos, tais como os que são ilustrados na Figura 8 (Melendez-Colon *et al.*, 2000). Segundo Ramesh *et al.* (2004), a actividade biológica dos PAH nos organismos é determinada pela sua estrutura (zonas e disposição dos átomos de carbono). Os mesmos autores acrescentam que os compostos que contêm uma zona em forma de baía (em inglês designada por *bay region*), como a que se exemplifica na referida figura, reagem fortemente com o ADN (formando o aducto PAH - ADN).

O aducto PAH - ADN entretanto formado pode eventualmente ser reparado e, neste caso, segundo Anyakora (2007) e Chakravarti *et al.* (2008), pode verificar-se uma de duas situações: o nucleótido afectado é revertido ao seu estado original (ainda antes da replicação celular, sem que daí advenham quaisquer consequências) ou da reparação resulta a alteração permanente da sequência do ADN (a qual pode iniciar a carcinogénese). Quando a reparação não ocorre ou a modificação persiste e o ADN não é replicado correctamente o que leva à formação de células mutantes que, por sua vez, desencadeiam o desenvolvimento de tumores (Ramesh *et al.*, 2004; Chakravarti *et al.*, 2008).



**Figura 8.** Metabolismo do BaP.

Retirado de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm> em 05/01/2016.

A extensão da actividade carcinogénica dos PAH depende em grande medida de dois aspectos fundamentais e que dizem respeito, em primeiro lugar, à sua capacidade bioacumulativa nos organismos (ATSDR, 1995; EC, 2002) e, depois, pela via como ocorre a exposição a estes contaminantes químicos. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO, 2005a), apesar do relato de várias excepções, a maioria dos estudos

parecem indicar de forma bastante consistente uma relação entre a via de exposição e a localização do tumor (tumores gástricos que surgem devido à exposição oral e tumores de pele em consequência da exposição dérmica, por exemplo).

### 1.3.5. Análise de risco

Em face do perigo que os PAH representam, diversas autoridades têm desenvolvido esforços consideráveis no sentido de caracterizar o risco associado à exposição a estes compostos. A análise de risco, todavia é dificultada pelo facto dos PAH ocorrerem habitualmente em misturas complexas, bem como à multiplicidade das vias pelas quais os indivíduos estão em contacto com estes compostos tóxicos. Por outro lado, os dados apresentados por Kligerman *et al.* (2002) parecem indicar que as alterações podem variar de indivíduo para indivíduo. Desta forma, as consequências do contacto com os PAH dependem do grau seu de acumulação nos tecidos adiposo e subcutâneo e do metabolismo do indivíduo afectado (Singh *et al.*, 2016). Este é assim um aspecto que deve ser, no entender de Singh *et al.* (2016), abordado de forma cautelosa quando se trata da análise de risco relativamente a estes compostos, em especial, em indivíduos fumadores, por exemplo.

Actualmente existem várias abordagens possíveis para a análise de risco do desenvolvimento de cancro por contacto com PAH pela via alimentar, das quais destacamos duas por serem as mais frequentemente referidas na literatura: o factor de equivalência tóxica (TEF, da designação inglesa *toxic equivalent factor*) e a margem de exposição (MOE, acrónimo derivado do termo inglês *margin of exposure*) (Duedahl-Olesen *et al.*, 2006; Benford *et al.*, 2010; Martorell *et al.*, 2010; Bansal e Kim, 2015; Duedahl-Olesen *et al.*, 2015; Rozentāle *et al.*, 2015).

A análise de risco com base no TEF surge da necessidade de avaliar a toxicidade de misturas de PAH (Ramesh *et al.*, 2004). Esta metodologia consiste na quantificação da toxicidade e carcinogenicidade dos compostos por comparação com um segundo composto de referência (Delistraty, 1997). Para os PAH o factor associado a cada composto é determinado a partir de dados toxicológicos tendo como referência o BaP (Tabela 6). O resultado da sua multiplicação pela concentração do composto em análise determina os equivalentes de BaP, também designados de BaPE (Bansal e Kim, 2015). A inexistência de dados relativamente à interacção destes compostos constitui uma desvantagem desta abordagem (Ramesh *et al.*, 2004).

**Tabela 6.** Valores de TEF para os PAH individuais.

PAH	TEF
<i>Acenafteno</i>	0,001
<i>Acenaftileno</i>	0,001
<i>Benz[a]antraceno</i>	0,1
<i>Benzo[b]fluoranteno</i>	0,1
<i>Benzo[k]fluoranteno</i>	0,1
<i>Benzo[ghi]perileno</i>	0,01
<i>Benzo[a]pireno</i>	1
<i>Criseno</i>	0,01
<i>Dibenzo[a,h]antraceno</i>	1
<i>Fenantreno</i>	0,001
<i>Indeno[1,2,3-cd]pireno</i>	0,1
<i>Naftaleno</i>	0,001
<i>Pireno</i>	0,001

Adaptado de Nisbet e LaGoy (1992).

A segunda metodologia para a análise de risco associado ao consumo de alimentos contaminados com PAH é a preconizada pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA). Esta abordagem tem por base a determinação da margem de exposição que, em termos práticos, equivale a uma “margem de segurança”. De acordo com este organismo, quanto menor for a referida margem, maior será o risco associado (EFSA, 2005). O valor de MOE é determinado pelo rácio entre o valor da dose estimada necessária para causar uma incidência de 10% de tumores (em inglês designada por *benchmark dose lower confidence limit 10%*, BMDL<sub>10</sub>) e a ingestão diária (Barlow *et al.*, 2006; Duedahl-Olesen *et al.*, 2015). Conforme alega a AESA, se a margem de exposição daí resultante for igual ou superior a 10000, então é possível garantir um baixo risco para a saúde dos consumidores (EFSA, 2005). O facto de ser baseada quer na exposição alimentar, mas igualmente em dados laboratoriais que permitem estabelecer uma relação dose-resposta, conferem a esta abordagem maior robustez (FAO/WHO, 2005a; Barlow *et al.*, 2006; Yebra-Pimentel *et al.*, 2015). Esta metodologia foi adoptada pela AESA em 2005 para análise de risco de compostos genotóxicos e carcinogénicos (EFSA, 2005), utilizando para o efeito níveis de BMDL<sub>10</sub> de referência de 0,07 e 0,34 ng/kg pc/dia de BaP e de PAH4, respectivamente (EFSA, 2008b).

### 1.3.6. Estratégias para minimizar / remover PAH dos produtos

Em consequência do elevado poder carcinogénico e mutagénico dos PAH descrito na secção anterior, urge minimizar, tanto quanto possível o grau de exposição dos consumidores a estes contaminantes. Devido à elevada estabilidade destes contaminantes químicos, a sua eliminação, à luz dos conhecimentos actuais, é extremamente difícil, se não mesmo inviável. Como tal, a redução dos níveis de contaminação nos produtos cárneos fumados passa, em grande medida,

pela adopção de metodologias preventivas, desde logo na fase de secagem onde os produtos se encontram expostos ao fumo e a contaminação ocorre. Na revisão bibliográfica elaborada por Ledesma *et al.* (2016b) são incluídas algumas das tecnologias que têm vindo a ser propostas como resultado de diversos trabalhos de investigação que têm sido desenvolvidos nestes últimos anos. De entre as diversas variáveis abordadas estes autores destacam três, que constituem uma importante mais-valia no que respeita à redução da contaminação dos produtos com PAH: o tipo de invólucro, a tecnologia de fumagem (directa ou indirecta) e a temperatura de pirólise referindo a necessidade da temperatura de combustão da madeira não exceder os 600 °C. Apesar da importância do controlo da temperatura na prevenção da formação de PAH pesados, Jira *et al.* (2013) alertam que esta não deverá ser inferior a 500 °C, uma vez que para obter as características sensoriais desejadas, em particular o aroma e sabor a fumo, seriam necessários períodos de fumagens mais prolongados e perdas de peso mais elevadas. Por outro lado, a implementação de tecnologias que impeçam o contacto directo entre os produtos e os PAH são consideradas igualmente eficazes. Além da utilização de tripas impermeáveis e da fumagem indirecta, já referidas anteriormente, é aconselhável a colocação de filtros que retenham os PAH colocados à saída do fumeiro. A utilização de condensados de fumo é outra opção amplamente referida na literatura (Guillén *et al.*, 2000a; Šimko, 2005; Duedahl-Olesen *et al.*, 2006). Os aromas de fumo líquido são obtidos a partir da combustão controlada da madeira, condensados e posteriormente filtrados, para que partículas e compostos indesejáveis como os PAH sejam removidos. Desta forma, a utilização de condensados de fumo líquido assume-se também como uma tecnologia altamente benéfica no que se refere à prevenção da contaminação com PAH. A seu favor é de referir a facilidade de aplicação do aroma de fumo líquido, a maior homogeneidade no produto final, bem como a sua acção antimicrobiana, nomeadamente sobre alguns microrganismos patogénicos (Lingbeck *et al.*, 2014).

Quando os PAH se encontram já incorporados nos produtos, as estratégias para os minimizar incidem principalmente na sua remoção. Maga (1988), por exemplo, sugere a lavagem dos produtos como forma de remover entre 20 a 30% dos PAH. Šimko (2005), por sua vez, conseguiu diminuir a concentração de BaP de 4,8 para 1,9 µg/kg através da cozedura dos produtos, resultados que atribuiu à transferência da gordura contida nos produtos, onde se acumula a maior quantidade de PAH, para a água da cozedura. A mesma estratégia é sugerida por Chen e Chen (2005), Fries e Zarfl (2012) e García-Falcón e Simal-Gándara (2005), mas desta vez a remoção foi conseguida através da transferência dos PAH por contacto directo com o material da embalagem. Resultados bastante encorajadores foram apresentados por Chen e Chen (2005), por exemplo, que registaram uma diminuição na ordem de 50 e 70% nos teores de BbFA e BaP, respectivamente, por contacto da pele de pato tostada com polietileno de baixa densidade (em inglês designado por *low density polyethylene*, LDPE). A eficácia desta metodologia depende, claro está, do grau de afinidade dos PAH para a embalagem, como aliás se comprova pelo trabalho de Fries e Zarfl (2012) e Šimko (2005), e que varia em função das características da matriz dos produtos e do material da embalagem.

### 1.3.7. Legislação

Durante algum tempo o BaP foi o mais estudado deste grupo de contaminantes químicos (Plaza-Bolaños *et al.*, 2010), tendo mesmo sido considerado como um bom indicador da presença de PAH (Garcia Falcon *et al.*, 1999). Mais recentemente, o parecer emitido pela AESA (EFSA, 2008b), tendo por base o estudo de Culp *et al.* (1998), veio demonstrar a necessidade de reavaliar este pressuposto. Por conseguinte, foi recomendado que a análise de risco se baseasse futuramente no indicador entretanto designado por PAH4 constituído pelos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP. A mesma entidade assinala o PAH8 como um indicador igualmente válido e que, neste caso, corresponde ao somatório dos mesmos compostos enumerados para o PAH4 acrescido do benzo[*k*]fluoranteno (BkFA), benzo[*g*/*h*]perileno (BghiP), DBahA e indeno[1,2,3-*cd*]pireno (IP).

Na última década têm sido desenvolvidos esforços consideráveis no sentido da redução da exposição dos consumidores aos PAH, seja pela consciencialização do risco envolvido no consumo de produtos contaminados, seja pela adequação da legislação a nível comunitário. Em 2005 foi aprovada a primeira regulamentação europeia a este respeito. Com o Regulamento (CE) N.º 208/2005 (CE, 2005a) a CE estabeleceu 5 µg/kg como o teor máximo admissível para o BaP (na altura considerado como composto indicador da presença dos PAH com efeito toxicológico) em carnes fumadas e produtos fumados à base de carne. Desde então, e seguindo as recomendações entretanto emitidas pela AESA (EFSA, 2008b), a legislação comunitária passou a contemplar não apenas o teor em BaP como anteriormente, mas também o do indicador PAH4. Actualmente, tal como prevê o Regulamento (CE) N.º 835/2011 da Comissão, os teores máximos autorizados de BaP e PAH4 nos produtos cárneos são, respectivamente, de 2 e 12 µg/kg.

## 1.4. AMINAS BIOGÉNICAS NOS PRODUTOS DE SALSICHARIA

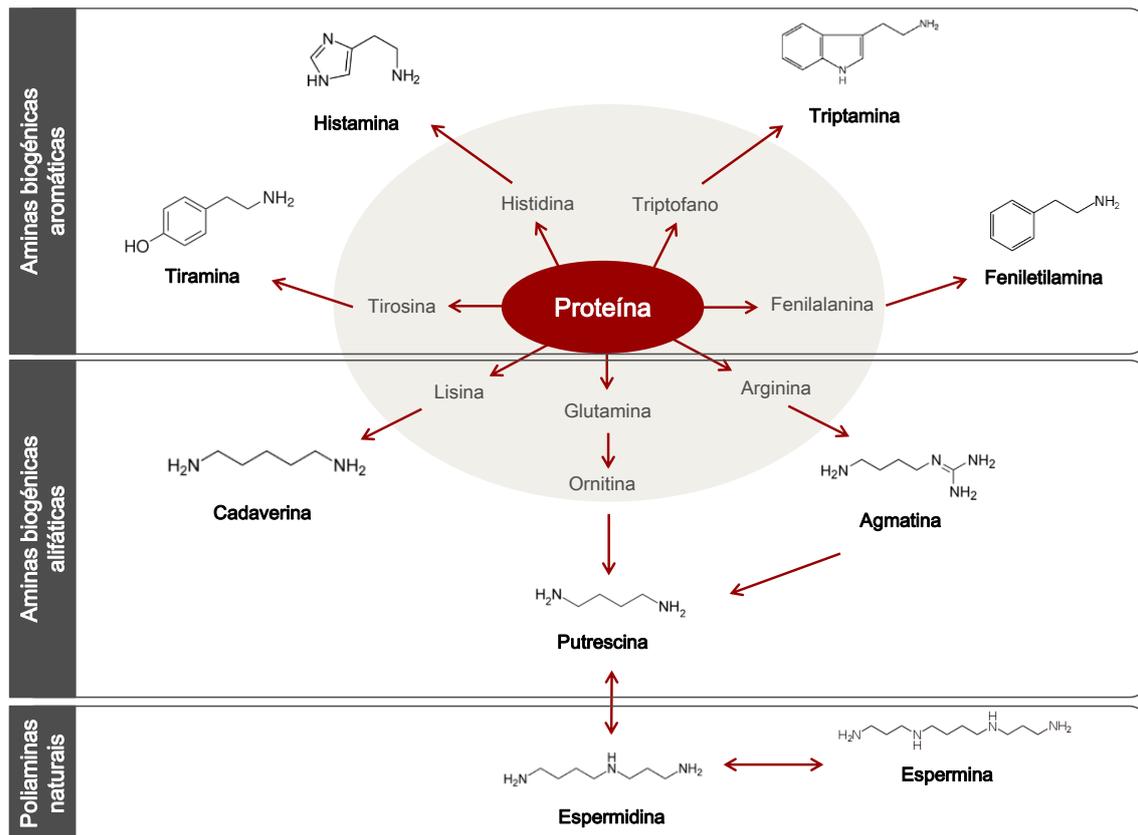
### 1.4.1. Aspectos gerais

As aminas biogénicas (AB) caracterizam-se por serem substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular e que estão envolvidas em diversas funções biológicas nos animais, plantas e microrganismos, razão pela qual são frequentemente designadas como aminas biologicamente activas. A classificação das AB é geralmente feita tendo por base a sua estrutura química ou a sua origem. De acordo com a sua estrutura química, podem ser agrupadas em aromáticas, alifáticas ou poliaminas. A sua origem, por sua vez, determina se são endógenas ou exógenas. As primeiras dizem respeito àquelas que ocorrem habitualmente no organismo, como a espermina e a espermidina, ao passo que as aminas exógenas, onde se incluem a triptamina,

$\beta$ -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e tiramina, devem a sua presença nos alimentos à actividade microbiana.

A síntese das AB é realizada por enzimas de origem bacteriana que promovem a descarboxilação dos aminoácidos existentes no meio (Kumar *et al.*, 2015). As aminas descarboxilases, assim designadas, apresentam uma actividade específica, o que significa que actuam sobre aminoácidos específicos. Desta forma, cada amina é produzida a partir do respectivo aminoácido precursor, tal como se encontra esquematizado na Figura 9. Na verdade, a putrescina constitui uma excepção, uma vez que além da desaminação da ornitina (Pereira *et al.*, 2009) esta pode ser formada por outras vias, nomeadamente através da agmatina por acção da agmatinase (Moinard *et al.*, 2005). Por sua vez, com a adição de dois grupos amino-propil, a putrescina é convertida a espermidina que por adição de um novo grupo de amino-propil pode ser convertida a espermina (Thomas e Thomas, 2003). Por este motivo, quando presente em pequenas quantidades, a putrescina pode ser considerada como tendo origem endógena (Bardócz, 1995; Vidal-Carou *et al.*, 2015).

Contrariamente ao que sucede com as aminas exógenas, as poliaminas fisiológicas espermidina e espermina não dependem da actividade microbiana, existindo naturalmente nos alimentos e em conjunto com a diamina putrescina são indispensáveis às células. Estas desempenham funções de regulação ao nível da síntese proteica e dos ácidos nucleicos, onde intervêm activamente no crescimento e regeneração das células e dos tecidos (Silla Santos, 1996). Assim, a acumulação de poliaminas é, por isso, mais elevada em tecidos de crescimento rápido ou em fases de maior regeneração celular. As poliaminas estão por isso intimamente relacionadas com o desenvolvimento de tumores (Bardócz, 1995; Thomas e Thomas, 2003; Kalač e Krausová, 2005). Por este motivo Kalač (2006) defende que a investigação ao nível do tratamento de cancro deverá passar também pela regulação dos níveis destas aminas, nomeadamente minimizando a sua ingestão.



**Figura 9.** Estruturas químicas e mecanismos de formação das AB.  
Adaptado de Bover-Cid *et al.* (2014).

Na medida em que ocorrem naturalmente nos organismos, a espermidina e a espermina são geralmente as mais abundantes nos alimentos frescos como os frutos e vegetais, leite, carne e peixe. A primeira destaca-se em produtos de origem vegetal enquanto a espermina surge em maiores quantidades nos de origem animal (Bover-Cid *et al.*, 2014). As aminas exógenas, por sua vez, surgem na sequência da actividade microbiana levada a cabo em produtos armazenados e/ou processados, e são quase sempre as mais abundantes neste tipo de alimentos. A título de exemplo, são apresentados os teores em aminas para alguns alimentos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Teores médios de aminas biogénicas (mg/kg) em diversos tipos de alimentos.

Produtos	N	Aminas biogénicas							
		<i>Triptamina</i>	<i>β-Feniletilamina</i>	<i>Putrescina</i>	<i>Cadaverina</i>	<i>Histamina</i>	<i>Tiramina</i>	<i>Espermidina</i>	<i>Espermina</i>
<i>Frutos (laranja, maçã, kiwi)</i>	136	ND	ND	13	-	ND	1	5	1
<i>Frutos secos (amêndoa, pinhões, pistácios)</i>	41	1	ND	5	-	ND	ND	23	14
<i>Vegetais (tomate, batata, espinafre)</i>	98	ND	ND	6	ND	3	1	16	3
<i>Legumes (lentilhas, feijão)</i>	11	-	-	3	-	-	-	31	14
<i>Cereais (pão, arroz)</i>	28	-	-	6	ND	ND	-	55	15
<i>Chocolate</i>	25	ND	2	ND	1	1	2	2	2
<i>Especiarias</i>	12	-	1	3	1	-	4	11	3
<i>Peixe fresco</i>	136	ND	ND	1	1	1	1	4	7
<i>Peixe enlatado</i>	96	ND	ND	ND	ND	14	2	1	2
<i>Peixe semi-preservado</i>	49	ND	1	4	13	3	15	2	5
<i>Produtos cárneos tratados termicamente</i>	48	ND	ND	1	6	ND	9	3	20
<i>Produtos cárneos curados</i>	23	ND	ND	4	28	13	7	6	36
<i>Produtos cárneos fermentados</i>	209	16	9	94	41	32	181	5	21
<i>Queijo não fermentado</i>	20	-	-	ND	ND	-	ND	ND	ND
<i>Queijo (leite cru)</i>	20	7	6	130	55	59	155	7	2
<i>Queijo (leite pasteurizado)</i>	20	6	7	87	58	18	78	8	4
<i>Cerveja de alta fermentação</i>	49	ND	ND	4	1	1	4	ND	1
<i>Cerveja de baixa fermentação</i>	88	ND	1	4	2	2	7	ND	1
<i>Vinho branco</i>	83	-	-	-	-	1	1	-	-
<i>Vinho tinto</i>	260	-	-	-	-	4	3	-	-

N: número de amostras analisadas. ND – não detectado.

Adaptado de Bover-Cid *et al.* (2014).

Os alimentos e bebidas que dependem do crescimento e da actividade microbiana durante o seu processamento ou armazenamento são particularmente susceptíveis de apresentar teores significativos de AB. O vinho, queijo e produtos cárneos cujo processo de fermentação depende directamente da actividade de microrganismos, nomeadamente daqueles que possuem enzimas descarboxilases, são disso bons exemplos. O desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, como os que intervêm na deterioração dos alimentos, pode estar igualmente na origem de elevados níveis de contaminação. Por esta razão as AB são geralmente consideradas como bons indicadores de frescura e qualidade higiénica dos alimentos. Ao nível do armazenamento, por exemplo, indiciam condições inadequadas de conservação que podem estar relacionadas com quebras da cadeia de refrigeração. Nos produtos fermentados, por seu lado, teores elevados de AB sugerem um crescimento microbiano descontrolado que poderá resultar de uma reduzida qualidade higiénica das matérias-primas ou de práticas de fabrico inadequadas (Komprda *et al.*, 2004; Stadnik e Dolatowski, 2010). Neste contexto, Hernández-Jover *et al.* (1996) propuseram limites de referência para que uma carne pudesse ser classificada em função da sua qualidade higiénica. Aqueles autores sugerem que sempre que a soma de putrescina, cadaverina, histamina e tiramina for inferior a 5 mg/kg estamos perante uma carne de elevada qualidade higiénica, no que concerne ao teor em AB.

#### **1.4.2. Aminas biogénicas na carne e produtos cárneos**

Os produtos cárneos reúnem uma série de factores favoráveis à formação de AB. Desde logo porque são alimentos ricos em proteínas, péptidos e aminoácidos. A extensão da aminogénese, contudo, é variável em função do tipo de produto considerado, como se constata pela análise da Tabela 8, onde são compilados resultados obtidos por diversos autores que estudaram diferentes produtos de diferentes proveniências.

**Tabela 8.** Teores médios em aminas biogénicas (mg/kg) em produtos cárneos e, quando disponível, valor mínimo e máximo.

Produtos	N	AB							
		Triptamina	$\beta$ -Feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina
<i>Chorizo</i>	20	16 (ND - 88)	1 (ND - 52)	60 (3 - 416)	20 (ND - 658)	18 (ND - 314)	282 (29 - 627)	4 (2 - 10)	26 (14 - 44)
<i>Chorizo</i>	3	ND	ND	92 (1 - 185)	103 (9 - 229)	6 (1 - 16)	129 (19 - 214)	8 (7 - 8)	46 (36 - 59)
<i>Fuet</i>	11	9 (ND - 68)	2 (ND - 34)	72 (2 - 222)	19 (5 - 51)	2 (ND - 358)	191 (32 - 743)	5 (1 - 11)	17 (9 - 30)
<i>Fuet</i>	23	8 (ND - 36)	8 (ND - 47)	49 (1 - 169)	28 (82 - 156)	12 (ND - 158)	119 (22 - 272)	8 (2 - 45)	24 (2 - 84)
<i>Fuet fino</i>	15	5 (ND - 39)	4 (ND - 29)	80 (1 - 513)	43 (1 - 115)	1 (ND - 5)	92 (1 - 218)	7 (1 - 21)	25 (2 - 44)
<i>Sobrasada</i>	7	12 (ND - 65)	2 (ND - 39)	65 (2 - 501)	13 (3 - 42)	9 (3 - 143)	332 (58 - 501)	3 (2 - 7)	14 (10 - 18)
<i>Sopressata</i>	9	-	3 (ND - 20)	99 (ND - 416)	61 (ND - 271)	22 (ND - 101)	178 (ND - 557)	40 (ND - 91)	36 (ND - 98)
<i>Salsichón</i>	19	15 (ND - 142)	12 (ND - 126)	99 (ND - 325)	18 (ND - 127)	14 (ND - 59)	141 (3 - 490)	4 (1 - 13)	25 (7 - 52)
<i>Salsichón</i>	22	9 (ND - 65)	7 (ND - 35)	103 (6 - 400)	12 (ND - 342)	7 (ND - 151)	281 (53 - 513)	5 (1 - 14)	15 (7 - 43)
<i>Saucisson (Industrial)</i>	5	4 (0 - 9)	4 (0 - 8)	279 (195 - 410)	103 (31 - 192)	71 (16 - 151)	220 (172 - 268)	5 (4 - 6)	91 (59 - 119)
<i>Saucisson (Tradicional)</i>	3	ND	1 (0 - 4)	223 (61 - 317)	71 (39 - 110)	15 (15 - 16)	164 (84 - 217)	4 (2 - 6)	84 (82 - 86)
<i>Pepperoni</i>	11	18 (ND - 42)	6 (ND - 48)	61 (ND - 230)	82 (ND - 390)	21 (ND - 200)	94 (5 - 190)	6	33
<i>Lubeck</i>	9	10 (ND - 20)	4 (ND - 7)	49 (ND - 220)	3 (ND - 8)	6 (ND - 40)	73 (9 - 150)	5	33

N: número de amostras analisadas. ND - não detectado.

Adaptado de Vidal-Carou *et al.* (2015).

Na carne fresca, as poliaminas naturais são as mais prevalentes, por oposição às aminas de origem bacteriana que se encontram em quantidades reduzidas, ou mesmo ausentes. Teores que variam entre 15 - 50 mg/kg de espermina e 1 - 5 mg/kg de espermidina são frequentemente encontrados na carne fresca, sendo que esta gama de resultados não depende da espécie animal considerada, mas sim dos diferentes tecidos (ou órgãos) e das diferentes actividades metabólicas a eles associadas (Vidal-Carou *et al.*, 2009). Sendo assim, os níveis de poliaminas encontrados nos produtos cárneos serão necessariamente determinados pelos tecidos utilizados como matéria-prima. A acumulação de aminas exógenas na carne surge habitualmente durante o seu armazenamento em consequência da actividade microbiana que se estabelece durante este período, tal como o demonstram os trabalhos de Halász *et al.* (1994); Galgano *et al.* (2009); Li *et al.* (2014) e Vidal-Carou *et al.* (1990). A velocidade a que aquelas aminas são formadas é tanto maior quanto maior a temperatura de armazenamento (Vidal-Carou *et al.*, 1990). Com o decorrer do tempo de armazenamento as aminas bacterianas podem atingir quantidades assinaláveis mesmo antes do aparecimento de qualquer sinal que do ponto de vista sensorial possa sugerir a deterioração da carne.

Os produtos sujeitos a tratamento térmico apresentam tendencialmente teores reduzidos, ou mesmo indetectáveis, de aminas de origem bacteriana. O tratamento térmico actua preventivamente sobre o desenvolvimento de microrganismos e, conseqüentemente, sobre a formação de AB, pelo que os níveis de putrescina, cadaverina, histamina e tiramina são de um modo geral muito reduzidos nestes produtos (Vidal-Carou *et al.*, 2009). Nestes casos, as poliaminas naturais são mais uma vez prevalentes, no entanto, em menores quantidades comparativamente à carne fresca, devido ao efeito de diluição que resulta da adição de outros componentes como a gordura e a água (Hernández-Jover *et al.*, 1997).

Nos produtos curados, como o bacon e o presunto, a proliferação microbiana é limitada pela acção do sal. Na presença de elevadas concentrações salinas o crescimento microbiano é fortemente inibido, desenvolvendo-se apenas microrganismos tolerantes ao sal, nomeadamente as bactérias halófilas, assim como algumas leveduras e BAL. Este facto faz com que os níveis de AB se mantenham reduzidos. Níveis mais elevados de AB podem contudo surgir quando os produtos são sujeitos a tempos de maturação mais prolongados, tal como Virgili *et al.* (2007) relataram. Em presuntos com 15 meses de maturação estes autores encontraram teores máximos de putrescina de 3 mg/kg. Aos 19 e 23 meses de maturação estes ascendiam já a 93 e 219 mg/kg, respectivamente.

Os produtos fermentados são globalmente os mais susceptíveis de apresentar quantidades elevadas de AB de origem bacteriana, isto porque durante o fabrico as condições tecnológicas favorecem o crescimento microbiano e a proteólise, por serem factores cruciais no desenvolvimento das propriedades organolépticas dos produtos. Por outro lado, no entender de Bover-Cid *et al.* (1999), o meio ácido favorece a síntese e actividade das enzimas descarboxilases que actuam sobre os aminoácidos.

Do conjunto das oito aminas biologicamente activas habitualmente avaliadas, quatro delas destacam-se por serem as mais predominantes: a tiramina, a putrescina, a cadaverina e a histamina. De facto, apesar de existir uma grande variabilidade associada ao perfil de aminas nos produtos cárneos, o predomínio destas aminas é um resultado transversal à maioria dos trabalhos publicados acerca destes produtos (Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero, 2004a; Miguélez-Arrizado *et al.*, 2006; Papavergou *et al.*, 2012). Como resultado da intensa actividade desenvolvida pelas BAL durante o processo fermentativo, a tiramina é de uma forma geral a amina que se encontra em maiores quantidades (Shalaby, 1993; Eerola *et al.*, 1998; Virgili *et al.*, 2007; Papavergou *et al.*, 2012), com teores máximos que podem ultrapassar os 700 mg/kg. Embora em menores quantidades, as diaminas putrescina e cadaverina estão também presentes na maioria dos produtos cárneos fermentados. Ainda assim, Erkmen e Bozkurt (2004) e Eerola *et al.* (1998) registaram teores próximos de 900 e 800 mg/kg de putrescina e cadaverina, respectivamente. A histamina, por sua vez, encontra-se frequentemente ausente dos produtos fermentados existentes no mercado, no entanto, de acordo com Vidal-Carou *et al.* (2009) também para este composto se regista uma elevada dispersão de resultados como, de resto, é notório pelos exemplos incluídos na Tabela 8. Apesar do teor máximo de 100 mg/kg indicado como limite de segurança (Silla Santos, 1996), é frequente algumas amostras apresentarem níveis de contaminação superiores. Nos casos em que se verificam elevados teores de histamina, estes são geralmente acompanhados por elevados teores de outras AB. Já a triptamina e  $\beta$ -feniletilamina, quando presentes, encontram-se normalmente em pequenas quantidades.

A grande variabilidade de resultados que habitualmente se regista para os teores das AB nos produtos não se estende, porém, às poliaminas naturais. Acresce ainda que o teor destas aminas permanece globalmente inalterado durante o processamento e/ou armazenamento. Existem, contudo, algumas excepções como as que foram observadas nos trabalhos de Bover-Cid *et al.* (2001b) e Bover-Cid *et al.* (2001e), nos quais se registaram a diminuição da espermidina e espermina. Nestes casos, os autores referem que a causa mais provável para esta tendência se prende com a reacção de desaminação, bem como o seu consumo, como fonte de azoto, por parte da microflora existente.

#### **1.4.3. Produção de aminas biogénicas por microrganismos isolados a partir de produtos cárneos fermentados**

As enzimas descarboxilases são sintetizadas pelos microrganismos presentes nos produtos, facto que torna a formação e a acumulação de aminas indissociável da evolução microbiológica. Esta capacidade não é, no entanto, transversal a todos os microrganismos e, segundo Suzzi e Gardini (2003), no caso dos produtos cárneos a capacidade de produzir AB é mais frequente nas enterobactérias, nos enterococos e nos lactobacilos. Note-se que embora estes microrganismos possam apresentar geralmente uma maior actividade descarboxilativa, esta é uma característica que depende ainda da estirpe considerada.

Uma elevada actividade descarboxilativa está associada às enterobactérias em particular no que se refere à formação de putrescina e cadaverina, embora elevados níveis de histamina possam também surgir. Estes microrganismos caracterizam-se por surgirem principalmente na fase inicial da produção dos enchidos crus curados, estando a sua presença bastante limitada no produto final. A sua proliferação ocorre em matérias-primas de baixa qualidade, mas também quando é permitida uma fermentação descontrolada dos produtos. Durante o desenvolvimento daqueles microrganismos são libertadas enzimas descarboxilases que se mantêm activas, mesmo depois de já não se encontrarem células viáveis (Suzzi e Gardini, 2003), contribuindo para a produção de AB. Resultados de estudos efectuados por Bover-Cid *et al.* (2001a) com *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia liquefaciens* e *S. marcescens*, isoladas de produtos de salsicharia, demonstram a grande capacidade de algumas estirpes de enterobactérias para produzirem putrescina e cadaverina.

As BAL são um dos géneros que mais contribui para a actividade descarboxilásica que se verifica nos produtos cárneos. Apesar de lhes ter sido identificada alguma capacidade para produzir histamina, triptamina e  $\beta$ -feniletilamina (de Las Rivas *et al.*, 2008), são frequentemente reconhecidas como as principais responsáveis pela acumulação de tiramina. Entre outras, a formação desta amina é consequência da actividade de algumas estirpes de *Lactococcus* e *Leuconostoc* (Choudhury *et al.*, 1990; González de Llano *et al.*, 1998; EFSA, 2011). Algumas das estirpes conhecidas por participarem na fermentação de produtos cárneos como as *Lactobacillus curvatus*, *L. bavaricus* e *L. sakei* foram igualmente associados à produção de quantidades consideráveis de AB (Bover-Cid *et al.*, 2001a), nomeadamente a  $\beta$ -feniletilamina e tiramina (Masson *et al.*, 1996). Por outro lado, uma elevada capacidade de descarboxilar a tirosina e fenilalanina foi igualmente identificada em estirpes de *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* (Bover-Cid *et al.*, 2001a).

Contrariamente ao que acontece para outras famílias de microrganismos, os dados relativos à actividade descarboxilativa dos estafilococos coagulase-negativos (ECN), são ainda escassos e, frequentemente, contraditórios. São diversos os autores que atestam a capacidade descarboxilativa destes microrganismos, por exemplo, Silla Santos (1998) refere a actividade histidina descarboxilativa, Suzzi e Gardini (2003) destacam a formação de  $\beta$ -feniletilamina, histamina, putrescina e cadaverina, e Martín *et al.* (2006) identificaram a capacidade de produzir as diaminas putrescina e cadaverina por parte de várias estirpes. Martín *et al.* (2007) não observaram a produção de histamina pelas estirpes de *Staphylococcus xylosus* que testaram, à semelhança dos resultados reportados por Alfaia *et al.* (2013). De acordo com estes últimos autores, não se verificou igualmente actividade descarboxilásica por parte das estirpes de *S. carnosus* e *S. equorum* isoladas de produtos cárneos Portugueses. Na verdade, em face da sua grande adaptação ao meio e o seu contributo para o desenvolvimento do sabor dos produtos cárneos, estirpes daquelas duas espécies têm sido utilizadas como cultura de arranque, como estratégia para melhorar o produto final (Leroy *et al.*, 2006; Alfaia *et al.*, 2013; Lorenzo *et al.*, 2014; Bassi *et al.*, 2015).

#### 1.4.4. Principais factores que influenciam a formação de aminas biogénicas

Muito embora seja reconhecida a preponderância da microflora no perfil de AB encontrado, existe um conjunto alargado de factores igualmente importante, que se prende nomeadamente com a qualidade da matéria-prima e com a tecnologia de processamento implementada. Alguns desses factores são enumerados de seguida.

A carne, pela sua composição rica em proteína, representa uma fonte de substrato para a formação de AB. Por outro lado, as suas características favorecem o desenvolvimento de microrganismos contaminantes indesejáveis, designadamente das enterobactérias. A elevada qualidade higiénica da matéria-prima constitui assim um factor absolutamente crucial para a prevenção da aminogénese durante o processamento dos produtos cárneos (Maijala *et al.*, 1995; Komprda *et al.*, 2004). No entender de Maijala *et al.* (1995), quando a temperatura e o tempo de descongelamento não são descurados, a utilização de matérias-primas congeladas confere garantias adicionais neste âmbito.

Além dos aspectos anteriormente referidos, a proteólise que se desenvolve ao longo do processamento dos produtos de salsicharia constitui outro factor determinante. Durante a fermentação dos enchidos as proteínas são hidrolisadas em consequência da actividade microbiana assim como da das enzimas endógenas. Em resultado do meio ácido, da desidratação e do cloreto de sódio existente no meio, as proteínas são desnaturadas e desta forma uma actividade proteolítica mais intensa ocorre, com a libertação de fracções azotadas, nomeadamente sob a forma de aminoácidos. Assim, quanto mais intensa for a proteólise maior será a disponibilidade de aminoácidos precursores que podem ser descarboxilados e convertidos em AB (Bover-Cid *et al.*, 1999; Latorre-Moratalla *et al.*, 2014).

Os produtos cárneos fermentados podem, como se sabe, apresentar-se com formas muito diversificadas. No contexto das AB, aqueles com maior diâmetro têm sido alvo de algum interesse. A importância deste factor tecnológico tem sido suportada por diversos autores que registaram maior acumulação de AB em produtos de maior calibre, por comparação a outros semelhantes de menor calibre (Parente *et al.*, 2001; Miguélez-Arrizado *et al.*, 2006). Conclusões semelhantes foram reportadas nos trabalhos conduzidos por Laranjo *et al.* (2016a) e Laranjo *et al.* (2016b) em produtos nacionais. Comparativamente aos produtos mais finos, aqueles com maior calibre requerem processamentos mais prolongados para que a  $a_w$  de segurança seja atingida na parte interior dos enchidos. Estes produtos são submetidos por isso a processos fermentativo e proteolítico mais extensos. Esta combinação de factores faz com que a aminogénese ocorra de forma mais pronunciada nas camadas internas dos enchidos (Treviño *et al.*, 1997; Miguélez-Arrizado *et al.*, 2006). A menor disponibilidade de oxigénio nos produtos de maior calibre também parece interferir na actividade descarboxilásica de alguns microrganismos. De acordo com Halász *et al.* (1994) a produção de putrescina e cadaverina por *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente, é fortemente inibida em condições de

anaerobiose. Os mesmos autores referem todavia que estes últimos (*K. pneumoniae*) parecem produzir maiores teores de putrescina na presença de quantidades reduzidas de oxigénio. Por sua vez a disponibilidade de oxigénio (crescimento aeróbico ou anaeróbico) não revelou, segundo Bover Cid *et al.* (2008), ter influência ao nível da produção de tiramina,  $\beta$ -feniletilamina e putrescina por parte das *Lactobacillus curvatus*.

O processo tecnológico associado à produção de enchidos inclui frequentemente a utilização de culturas de arranque devido às inúmeras vantagens tecnológicas que aquelas conferem (entre outros aspectos, promovem a fermentação, contribuem para a segurança assim como para o desenvolvimento do sabor e da cor característicos deste tipo de produtos). No entanto, na maioria dos produtores tradicionais, é ainda muito comum que a fermentação seja realizada recorrendo somente à microflora que existe naturalmente nas matérias-primas. Na carne a microflora endógena inclui geralmente a presença de BAL, entre as quais espécies de enterococci e lactobacilli, assim como ECN e leveduras (Santos *et al.*, 1998; Hugas, 2003).

As BAL são geralmente as mais utilizadas como culturas de arranque, como os *L. sakei*. Por seu turno outros tipos de microrganismos como os *S. xylosus* e *S. carnosus* (Cocconcelli e Fontana, 2015) são também bastante usados. Devido à ausência de actividade descarboxilásica estas espécies podem ser usadas sem qualquer risco para a saúde dos consumidores (Masson *et al.*, 1996). *L. curvatus*, e *L. plantarum* também são frequentemente adicionadas, no entanto algumas estirpes apresentam capacidade para produzir tiramina (Hutkins, 2006; Alfaia *et al.*, 2013).

Na medida em que a utilização de culturas de arranque pode constituir uma mais-valia na prevenção da acumulação de AB nos produtos, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objectivo de avaliar a sua eficácia, mas também a este nível, os resultados não são sempre consensuais. González-Fernández *et al.* (2003), por exemplo, reportaram reduções substanciais nos níveis de tiramina, putrescina e cadaverina com a adição de estirpes seleccionadas de *L. sakei* e *Pediococcus Sp.* Gençcelep *et al.* (2007); Baka *et al.* (2011) e Lu *et al.* (2010) reportaram igualmente um efeito positivo das culturas de arranque nos níveis de contaminação. Em contrapartida, Parente *et al.* (2001) e Bozkurt e Erkmen (2002) não encontraram qualquer relação entre a diminuição do teor em AB e a adição de culturas de arranque aos produtos. A eficácia das culturas de arranque pode, todavia, ser comprometida em função da qualidade higiénica da matéria-prima utilizada. No seu trabalho, para a mesma combinação de culturas de arranque, Bover-Cid *et al.* (2001d) encontrou maiores quantidades de AB em produtos fabricados com matérias-primas com baixa qualidade higiénica.

A cultura de arranque mais indicada deverá ser, pois, descarboxilase-negativa e possuir a capacidade de se desenvolver rapidamente logo na fase inicial de fermentação, deste modo contribuindo para a redução do pH e impedindo o desenvolvimento de microrganismos com capacidade descarboxilativa. A capacidade daquelas culturas de se sobreporem à restante microflora será tanto maior quanto melhor for a sua adaptação à fermentação de produtos

cárneos, razão pela qual estirpes já existentes na carne, como *L. sakei* e *L. curvatus*, são geralmente tidas como boas opções (Vidal-Carou *et al.*, 2007). A combinação de culturas de diferentes espécies, por seu turno, permite potenciar ainda mais este efeito, permitindo controlar o crescimento de uma maior variedade de microrganismos (EFSA, 2011). Em todo o caso, a selecção das estirpes utilizadas como cultura de arranque deve considerar, além das características organolépticas e sensoriais, a capacidade específica de não descarboxilarem os aminoácidos de onde resulta a formação de aminas que, como se sabe, podem apresentar riscos para a saúde dos consumidores (Baka *et al.*, 2011).

A adição de elevados teores de sal no momento da formulação de enchidos conduz a uma redução da actividade descarboxilativa levada a cabo pelos microrganismos (Suzzi e Gardini, 2003; Karovičová e Kohajdová, 2005), na medida em que o seu papel bacteriostático e de redução da  $a_w$  inibem o crescimento microbiano condicionando assim a presença de enzimas descarboxilases (Roseiro *et al.*, 2006).

Os açúcares, frequentemente utilizados na elaboração de enchidos, principalmente quando se trata de produção industrial, influenciam a dinâmica da população microbiana, nomeadamente a das culturas de arranque e, assim, os níveis de produção de AB (Silla Santos, 1996; González-Fernández *et al.*, 2003). A presença de açúcares nos enchidos favorece a proliferação das BAL e a fermentação láctica, o que se reflecte na rápida acidificação do meio. Esta acidificação, por sua vez, inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis habitualmente associados à formação de AB (Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero, 2004b). A este respeito, aqueles autores referem que teores de glucose entre 0,5 e 2,0% correspondem ao nível óptimo para a formação de enzimas descarboxilases, porém para níveis superiores a 3,0%, a redução excessiva do pH induz o efeito contrário.

Um efeito benéfico parece estar igualmente associado à introdução de sulfito de sódio e nitrito de sódio ao nível da prevenção da formação de AB. O primeiro demonstrou inibir a produção de cadaverina, embora o efeito inverso tenha sido reportado para a tiramina e putrescina (Bover-Cid *et al.*, 2001e). O nitrito de sódio, em particular quando associado à adição de culturas de arranque, contribuiu de forma significativa para a redução dos níveis de tiramina, putrescina e cadaverina (Gençcelep *et al.*, 2007). Outros aditivos como o fosfato de potássio e sorbato de potássio foram igualmente testados com resultados positivos no sentido de inibir a aminogénese (Shalaby, 1996). Apesar disto, resultados publicados por Lorenzo *et al.* (2007) denotam um aumento dos níveis de AB em lacón (produto curado produzido a partir da perna dianteira do porco, característico da zona da Galiza), onde foi usada uma mistura de aditivos contendo glucose, nitrito e nitrato de sódio, ascorbato de sódio e citrato de sódio. Os autores associaram estes resultados à presença de glucose, que terá permitido o desenvolvimento de BAL e conduzido a teores mais elevados de triptamina, histamina e tiramina no final do processamento.

Os abusos de temperatura (seja no acondicionamento da matéria-prima, ou durante o processamento), como se sabe, potenciam o desenvolvimento da flora microbiana existente, possibilitando a ocorrência de maiores quantidades de AB, nomeadamente por via da actividade das enterobactérias. Ainda que seja do conhecimento geral que a produção de aminas aumenta com a temperatura e com a duração do armazenamento, os dados obtidos por Maijala *et al.* (1995) parecem indicar que esta relação nem sempre é linear. Estes autores verificaram que na presença de bactérias BAL descarboxilase-negativas, usadas como culturas de arranque, os produtos processados a temperatura mais elevada continham níveis de AB inferiores. Isto porque, na sua opinião, a temperatura mais elevada permitiu que a cultura de arranque prevalecesse sobre as BAL contidas inicialmente na matéria-prima. De qualquer modo, a utilização de estirpes descarboxilase-negativas como cultura de arranque e temperaturas de fermentação adequadas, associadas a matérias-primas de elevada qualidade, podem prevenir a formação de AB, tal como constatou (Eerola *et al.*, 1998) nos produtos de salsicharia que estudou. Por outro lado, quando os produtos são armazenados a temperaturas inferiores a 15 °C, ainda que a população microbiana já se encontre na sua fase estacionária, as enzimas descarboxilativas permanecem ainda activas e capazes de descarboxilar os aminoácidos existentes no meio. A este respeito, Halász *et al.* (1994) referem também que mesmo para temperaturas inferiores a 10 °C, alguns microrganismos mantêm ainda a capacidade de produzir AB. De facto, Komprda *et al.* (2001) registaram níveis potencialmente perigosos para a saúde dos consumidores quando os enchidos não foram mantidos a temperaturas suficientemente baixas. Outros resultados destacam também a importância de se manterem este tipo de produtos serem mantidos sob refrigeração durante o seu armazenamento (Komprda *et al.*, 2001; Komprda *et al.*, 2004; Kameník *et al.*, 2012). Kameník *et al.* (2012) referem ainda que embora seja recomendável manter temperaturas abaixo dos 10 °C desde que as boas práticas de fabrico sejam cumpridas em todas as fases do processamento, não existe risco para o consumidor se os enchidos forem mantidos a temperaturas até 15 °C. Neste contexto, o efeito do armazenamento prolongado dos produtos nos níveis de AB não deve igualmente ser descurado, na medida em que elevados níveis de contaminação (em particular de putrescina, tiramina e cadaverina) foram identificados por diversos autores (Komprda *et al.*, 2004; Ruiz-Capillas *et al.*, 2007b) em produtos sujeitos a períodos de armazenamento prolongados.

A relação entre o pH e a acumulação de AB é ainda pouco clara: enquanto alguns autores associam produtos com pH reduzido a teores baixos de aminas, outros há que reportam elevados níveis de contaminação. Na primeira situação os resultados obtidos foram relacionados com o reduzido desenvolvimento da microflora contaminante em resultado do meio ácido (Bover-Cid *et al.*, 2001b; González-Fernández *et al.*, 2003). Por outro lado, sabe-se que o pH regula a actividade das enzimas descarboxilases enquanto mecanismo de defesa das bactérias na presença de meios ácidos desfavoráveis. Este facto foi apontado por González-Tenorio *et al.* (2013) como estando na origem de maiores níveis de acumulação de AB. Assim, a interacção destes dois factores opostos resulta num equilíbrio entre si (EFSA, 2011).

#### 1.4.5. Aminas biogénicas enquanto indicadoras da qualidade

Pela sua estreita relação com a microbiota vários modelos têm sido propostos no sentido de associar os níveis de AB à qualidade e frescura dos produtos cárneos. A primeira abordagem neste sentido foi sugerida por Mietz e Karmas (1977) para avaliação da qualidade e frescura de peixe e produtos da pesca. Designado como “Índice de Aminas Biogénicas” (em inglês *Biogenic Amine Index*, BAI) esta metodologia consistia numa equação matemática que relacionava a concentração de cadaverina, putrescina, histamina, espermina e espermidina como se apresenta de seguida:

$$BAI = \frac{[Cad] + [Put] + [Hist]}{1 + [Esp] + [Espd]}$$

[*Cad*] = teor em cadaverina

[*Put*] = teor em putrescina

[*Hist*] = teor em histamina

[*Esp*] = teor em espermina

[*Espd*] = teor em espermidina

Na opinião de Hernández-Jover *et al.* (1996) um BAI inferior a 5 mg/kg seria o mais aceitável para carne fresca, enquanto carnes com índice entre 20 - 50 mg/kg ou superior a 50 mg/kg corresponderia a carne de baixa qualidade e deteriorada, respectivamente.

Tendo em conta o aumento considerável da tiramina durante o armazenamento da carne e produtos cárneos, um método alternativo foi proposto tendo por base a soma das quantidades de tiramina, cadaverina, putrescina e histamina sendo que, neste caso, o limite máximo admissível seria de 500 mg/kg (Stadnik e Dolatowski, 2010).

Ainda que este tipo de abordagem possa ser muito útil na avaliação de produtos à base de carne fresca, quando aplicada a produtos fermentados esta denota algumas limitações. Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero (2004b) destacam os inúmeros factores que podem afectar tanto o teor como o perfil de AB presentes. Desde logo, porque além da qualidade da matéria-prima o crescimento microbiano que tem lugar pode implicar a ocorrência de quantidades importantes de AB (Latorre-Moratalla *et al.*, 2008). Por outro lado, no caso de produtos fermentados o perfil de AB pode ser muito mais variado (Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero, 2004b), devido ao elevado número de factores que afectam a sua formação.

#### 1.4.6. Estratégias para minimizar / remover as aminas biogénicas dos produtos

A eliminação das AB nos produtos já acabados é uma matéria controversa pois pode mascarar condições higiénicas ou práticas de fabrico inadequadas (Vidal-Carou *et al.*, 2007). Em detrimento de tratamentos *a posteriori*, a prevenção da acumulação de AB deve ser favorecida

através da selecção de matérias-primas de elevada qualidade, assim como a adopção de práticas de fabrico adequadas.

Uma das estratégias mais eficazes consiste na utilização de tratamentos térmicos, entre os quais a pasteurização, como forma de prevenir o desenvolvimento de microrganismos que possuem actividade descarboxilativa (Novella-Rodríguez *et al.*, 2004). Quando este tipo de abordagem não pode ser aplicada, em virtude da natureza dos produtos, a irradiação e tratamentos com altas pressões têm sido apontados como alternativas viáveis (Naila *et al.*, 2010).

Os tratamentos de alta pressão (em inglês *high hydrostatic pressure*, HHP) baseiam-se na inactivação da carga microbiana, através de danos causados ao nível da membrana celular, sem que alterações, do ponto de vista sensorial, sejam perceptíveis. Os tratamentos por alta pressão não inactivam necessariamente por completo os microrganismos, ao invés podem apenas afectar uma parte da população (Ruiz-Capillas *et al.*, 2007b) prevenindo, deste modo, a formação de AB (Canto *et al.*, 2014). Apesar da informação acerca da eficiência desta tecnologia ser ainda insuficiente, alguns resultados parecem sugerir uma contribuição significativa para a redução dos teores de AB. Latorre-Moratalla *et al.* (2007), por seu turno, registaram uma forte inibição da produção das diaminas putrescina e cadaverina, sem prejuízo da fermentação dos produtos. Simultaneamente, constataram que o desempenho das culturas de arranque não foi afectado pelas altas pressões aplicadas nas matérias-primas. Menores teores de AB (putrescina, cadaverina e tiramina) foram igualmente detectados por Ruiz-Capillas *et al.* (2007b) durante o armazenamento de enchidos tratados por HHP. Num dos seus trabalhos Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero (2004a) constataram que a formação de tiramina foi condicionada pela utilização de elevadas pressões, enquanto a atmosfera protectora inibiu a produção de cadaverina. Resultados positivos foram igualmente reportados por Simon-Sarkadi *et al.* (2012) no que concerne à inibição da produção de putrescina e cadaverina. Todavia, no decurso do seu trabalho, os mesmos autores verificaram a formação de tiramina em maiores quantidades, comparativamente às amostras que não tinham sido tratadas com altas pressões, bem como, algumas alterações ao nível da cor e da firmeza dos produtos avaliados.

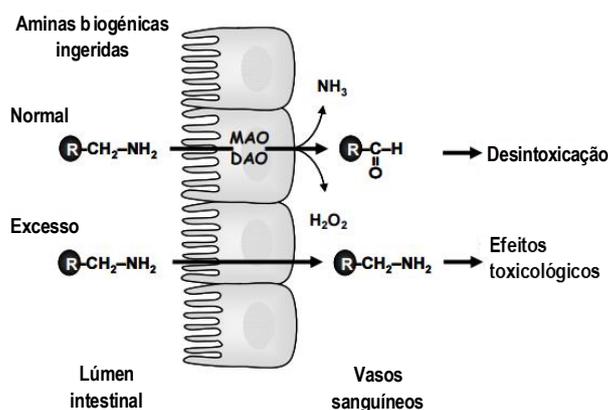
No mesmo sentido, a irradiação tem permitido avanços significativos no sentido de prolongar o tempo de conservação dos alimentos. Esta tecnologia apresenta duas vertentes no que respeita ao teor em AB: por um lado pode ser aplicada como forma de eliminar parte da carga microbiana que intervém na sua formação (Kim *et al.*, 2003), mas também por via da eliminação das aminas por meio de radiólise (Kim *et al.*, 2005). De acordo com Rabie *et al.* (2010) que testaram a eficácia da irradiação em enchidos egípcios, este procedimento resultou na eliminação de 40 a 68% do total destes contaminantes ao longo do armazenamento dos produtos. Os níveis de putrescina e tiramina foram igualmente reduzidos na carne de porco e de vaca quando sujeitos a irradiação (Min *et al.*, 2007). Em ambos os estudos o tratamento foi mais eficaz quando doses mais elevadas foram utilizadas. Porém, a utilização desta tecnologia, especialmente quando são

utilizadas doses mais elevadas, pode comprometer a aceitabilidade por parte do consumidor, na medida em que podem ocorrer alterações de cor e sabor (Cava *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006).

#### 1.4.7. Efeitos toxicológicos das aminas biogénicas

O efeito toxicológico das AB caracteriza-se pela sua acção psicoactiva e/ou vasoactiva, sendo que, do conjunto das aminas de origem bacteriana, a histamina, triptamina,  $\beta$ -feniletilamina e tiramina são as que estão habitualmente envolvidas no desenvolvimento de sintomas (Bover-Cid *et al.*, 2014). Enquanto as aminas psicoactivas afectam o sistema nervoso central, funcionando como neurotransmissores, o efeito vasoactivo interfere ao nível do sistema vascular. A histamina e tiramina isoladamente não constituem necessariamente um perigo para a saúde dos consumidores, mas quando em conjunto com outras AB o seu efeito pode ser potenciado. Este é o caso da putrescina e cadaverina que não apresentam qualquer efeito toxicológico, mas que podem agravar o efeito causado pela histamina e tiramina, em virtude da sua competição para as enzimas envolvidas na desintoxicação (Moret *et al.*, 2005). Assim, a ingestão de vinho, queijo e enchidos em simultâneo pode mesmo resultar em intoxicação com os efeitos toxicológicos que lhe estão associados (Marcobal *et al.*, 2012).

No organismo, o processo de desintoxicação é levado a cabo pelas monoaminoxidases (MAO) e diaminoxidases (DAO). Quando a eficiência deste sistema se encontra comprometida ou existe um excesso de aminas, estas são absorvidas e entram no sistema circulatório (Figura 10), levando à manifestação de efeitos toxicológicos (Stadnik e Dolatowski, 2010).



**Figura 10.** Metabolismo das aminas biogénicas no organismo. Adaptado de Ladero *et al.* (2010).

A gravidade das reacções adversas irá depender da capacidade de cada indivíduo em metabolizar as aminas e excretar os seus produtos da reacção, como da presença de agentes que possam interferir na desintoxicação das aminas biogénicas. Os tratamentos à base de inibidores de monoaminaoxidase (IMAO), frequentemente utilizados para o tratamento de

depressões, podem interferir com a capacidade de desintoxicação, e desta forma potenciar os efeitos adversos das AB.

A associação da histamina a reacções adversas tem sido evidenciada ao longo dos anos, em particular devido ao consumo de peixe das famílias *Scombridae* e *Scomberesocidae* como o atum, cavala e sauro, razão pela qual este tipo de intoxicação é frequentemente conhecida como intoxicação “escombróide” (Shalaby, 1996). Esta amina induz a vasodilatação dos vasos causando dores de cabeça, hipotensão arterial, problemas gastrointestinais (diarreia, cólicas abdominais e vômitos), rubor e prurido (Mah e Hwang, 2009; Stadnik e Dolatowski, 2010; Bover-Cid *et al.*, 2014).

Tanto a tiramina como a  $\beta$ -feniletilamina e a triptamina apresentam um efeito vasoconstritor que resulta no aumento da pressão arterial (Önal, 2007; EFSA, 2011). Sintomas como dores de cabeça, transpiração, vômitos e dilatação das pupilas são os mais reportados em consequência da ingestão destas aminas (Bover-Cid *et al.*, 2014). Tendo em conta os níveis usualmente encontrados nos produtos cárneos fermentados, a tiramina representa o maior risco para os consumidores (Eerola *et al.*, 1998), por comparação com a histamina,  $\beta$ -feniletilamina e triptamina. Segundo González-Fernández *et al.* (2003), teores de 6 mg de tiramina podem causar o aumento da pressão arterial em indivíduos medicados com IMAO, o que significa que o consumo de 50 g alimentos contendo mais de 120 mg/kg pode desencadear o aparecimento de sintomas. Por esta razão, os indivíduos sujeitos a esta medicação são, de uma forma geral, aconselhados a seguir uma dieta em que se excluem os alimentos susceptíveis de apresentarem maiores quantidades desta amina, como é caso do queijo e dos produtos de salsicharia.

Na medida em que os efeitos adversos dependem da sensibilidade de cada indivíduo, existe alguma dificuldade em estabelecer um limite de tolerância. Como tal, vários critérios têm vindo a ser sugeridos por diversos autores, como se exemplifica na Tabela 9.

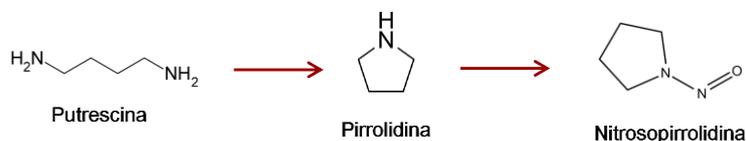
**Tabela 9.** Limites de tolerância sugeridos na bibliografia.

Aminas biogénicas	Teor recomendado (mg/kg)
Total	< 1000
Tiramina	100 - 800
Histamina	50 - 100
$\beta$ -feniletilamina	< 30
Aminas vasoactivas (histamina, tiramina, triptamina, e $\beta$ -feniletilamina)	< 200

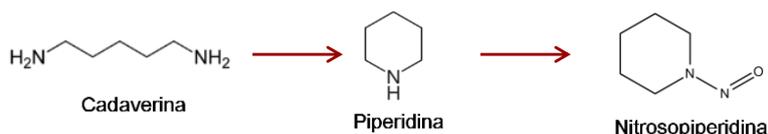
Adaptado de Tasić *et al.* (2012).

Além do desenvolvimento de sintomas adversos, os consumidores incorrem no risco de exposição às *N*-nitrosaminas que são conhecidas como potentes agentes carcinogénicos, e que têm como precursores algumas AB. Estas são formadas a partir da reacção de aminas secundárias e terciárias na presença de nitritos (Al Bulushi *et al.*, 2009; De Mey *et al.*, 2015). A razão pela qual estes contaminantes são frequentemente encontrados neste tipo de produtos está relacionada com a adição de sais de nitritos e nitratos no processamento de produtos cárneos. Em particular a putrescina e a cadaverina, assim como as poliaminas endógenas espermidina e espermina, são actualmente reconhecidas como precursores destes contaminantes (Standarová *et al.*, 2008; Drabik-Markiewicz *et al.*, 2011; De Mey *et al.*, 2012). As aminas primárias putrescina e cadaverina, por acção da temperatura (frequentemente aplicada no processamento de alimentos), podem ciclizar e ser convertidas em pirrolidina e piperidina, respectivamente, conduzindo posteriormente à formação de *N*-nitrosaminas (Drabik-Markiewicz *et al.*, 2011), como se encontra esquematizado na Figura 11. As aminas secundárias espermina e espermidina podem, por sua vez, ser convertidas a nitrosopirrolidina por reacção com um agente nitrosante existente no meio.

i)



ii)



**Figura 11.** Reacção de ciclização e nitrosação da putrescina (i) e cadaverina (ii).

#### 1.4.8. Legislação

A histamina e a tiramina, por estarem mais frequentemente associadas ao aparecimento de sintomas indesejáveis nos consumidores são, as aminas que estão sujeitas a maior escrutínio por parte da comunidade científica, bem como das entidades reguladoras. Porém, os resultados até agora apurados têm-se revelado frequentemente dispersos, o que dificulta a determinação de uma dose toxicológica exacta. Acresce ainda que o impacto das AB na saúde dos consumidores é subestimado, seja porque os sintomas não são suficientemente graves e não requerem intervenção médica ou porque são confundidos com reacções alérgicas (Nuñez *et al.*, 2016).

Nuñez *et al.* (2016) referem que os alimentos que contêm mais de 500 mg/kg de histamina e de 1000 mg/kg de tiramina são considerados tóxicos ou perigosos para a saúde. Níveis desta ordem de grandeza são, no entanto, demasiado elevados quando se trata de indivíduos susceptíveis ou cuja saúde se encontre debilitada (Stadnik e Dolatowski, 2010). De facto, de acordo com Karovičová e Kohajdová (2005), níveis tão baixos quanto 5 - 10 mg/kg de histamina podem ser prejudiciais nos indivíduos mais sensíveis. Já para o caso da  $\beta$ -feniletilamina, existem evidências que um teor de 30 mg/kg nos alimentos se pode revelar tóxico (Gardini *et al.*, 2001).

Neste momento não existe qualquer legislação aplicável nesta matéria para os produtos cárneos. Os limites definidos a nível europeu (CE, 2005b) contemplam apenas produtos da pesca com níveis máximos admissíveis de 100 e 200 mg/kg de histamina, tratando-se de peixe cru ou processado com salmoura, respectivamente. Em todo o caso, é habitualmente considerado como limite de referência o valor de 100 mg/kg de histamina para os produtos de salsicharia (Eerola *et al.*, 1998).

### 1.5. COMPOSTOS BENÉFICOS PRESENTES NATURALMENTE NA CARNE E NOS PRODUTOS DE SALSICHARIA

Notícias recentes têm contribuído para a depreciação da carne e dos produtos cárneos. Referimo-nos em particular à comunicação da Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC, acrónimo de *International Agency for Research on Cancer*) relativo ao consumo de carnes vermelhas e processadas (IARC, 2015). Com base no parecer de 22 especialistas, esta instituição classifica a carne vermelha como provavelmente carcinogénica (Grupo 2A) e as carnes processadas como carcinogénicas (Grupo 1), devido à sua associação com o desenvolvimento de cancro colo-rectal, do pâncreas e da próstata. Os produtos cárneos são igualmente conotados negativamente pelo seu elevado teor em sal e gordura saturada, intervenientes directos no desenvolvimento de problemas cardiovasculares.

Em contrapartida, a carne incorpora uma série de compostos benéficos que contribuem positivamente para a saúde dos consumidores (Oostindjer *et al.*, 2014), com a particularidade de muitos destes nutrientes serem exclusivos da carne ou apresentarem menor biodisponibilidade noutros alimentos (Arihara e Ohata, 2008). Desde logo a carne é, por excelência, uma fonte de proteína de elevado valor biológico conferido, nomeadamente, pela presença dos 8 aminoácidos essenciais (lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptofano, leucina, isoleucina e valina) (Ferguson, 2010; Pereira e Vicente, 2013). Além dos aminoácidos essenciais, as proteínas de origem animal são precursoras de compostos fisiologicamente activos. É o caso de alguns péptidos que, enquanto se encontram integrados na estrutura da proteína nativa se apresentam inactivos, mas que uma vez libertados (na sequência da digestão ou do processamento), adquirem propriedades fisiológicas benéficas para os consumidores. À data são já reconhecidos efeitos benéficos ao nível dos sistemas cardiovascular, nervoso, gastrointestinal e imunitário, todavia a sua acção específica, dependerá da sequência dos aminoácidos constituintes (Korhonen e Pihlanto, 2006). Zhang *et al.* (2010) destacam, por exemplo, as enzimas dipeptidil-peptidases que promovem a formação de dipéptidos compostos por arginina e prolina (Arg – Pro) e que possuem uma acção anti-hipertensiva.

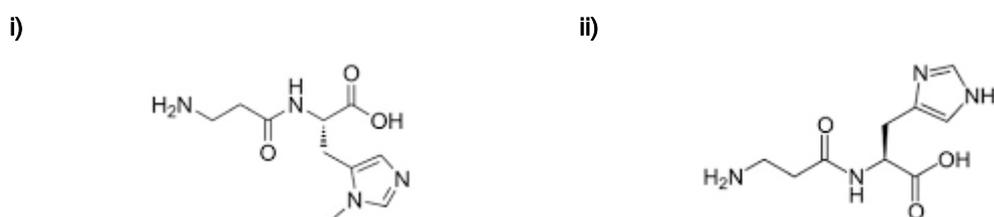
Da composição da carne fazem ainda parte diversos compostos com propriedades antioxidantes, entre eles alguns péptidos de pequenas dimensões (como por exemplo, a carnosina, a anserina e a glutatona) e a coenzima Q<sub>10</sub> (Roseiro *et al.*, 2014b). A carne constitui também uma excelente fonte de L-carnitina, que participa na produção de energia, na absorção do cálcio, produção de massa muscular assim como na diminuição do colesterol no organismo (Demarquoy *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2010; Marušić *et al.*, 2013). Os níveis mais elevados de L-carnitina encontram-se no músculo-esquelético, que de acordo com dados de Weiss *et al.* (2010) podem variar entre 135 - 830 mg/kg (matéria seca) e entre 1870 - 3320 mg/kg (matéria seca) nas carnes de porco e vaca, respectivamente. Níveis da ordem de grandeza como os reportados por estes autores não devem ser menosprezados, especialmente se considerarmos que a maior parte da L-carnitina disponível no organismo provém da alimentação (Marušić *et al.*, 2013). As carnes vermelhas são ainda excelentes fontes de creatina, ácido linoleico conjugado (em inglês *conjugated linoleic acid*, vulgarmente conhecido por CLA) ferro, zinco, ácido fólico e vitaminas A e B12 (Zhang *et al.*, 2010; Pereira e Vicente, 2013; Young *et al.*, 2013; Buzala *et al.*, 2016). Na composição da carne encontram-se ainda os ácidos gordos monoinsaturados (também designados MUFA, do inglês *monounsaturated fatty acids*) e os PUFA. Na carne de porco os MUFA são, frequentemente, os ácidos gordos prevalentes, em detrimento dos homólogos saturados (USDA, 2016).

Actualmente existe um interesse crescente em incrementar os teores de alguns destes nutrientes na carne e nos produtos cárneos, não só em virtude dos benefícios que estes veiculam, mas igualmente como forma de valorizar este tipo de produtos. A suplementação da alimentação fornecida aos animais foi a abordagem seguida por vários grupos de investigação, com o objectivo de valorizar a composição nutricional de diversos tipos de carne (Paiva-Martins *et al.*, 2009; Hanczakowska *et al.*, 2015; Kai *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Moroney *et al.*, 2015; Ranucci

*et al.*, 2015; Kopec *et al.*, 2016). De facto, é possível encontrar na literatura dados publicados que demonstram que a suplementação da alimentação dos animais favorece a produção de carnes com maior capacidade antioxidante e maior rácio de ácidos gordos mono e polinsaturados (Scollan *et al.*, 2003; Peiretti e Meineri, 2008; Hanczakowska *et al.*, 2015; Ranucci *et al.*, 2015; Kopec *et al.*, 2016).

### 1.5.1. Dipéptidos histidil: anserina e carnosina

A anserina e a carnosina são dois dipéptidos histidil, produzidos a partir de histidina e alanina (Figura 12). Estes são dois compostos bioactivos, cujas propriedades antioxidantes se prendem fundamentalmente com a neutralização de radicais livres que se reflectem num efeito benéfico ao nível da prevenção dos danos resultantes da oxidação que se desenrolam no organismo (Arihara e Ohata, 2008).



**Figura 12.** Estrutura química da anserina (i) e carnosina (ii).

Tanto a anserina como a carnosina são especialmente abundantes no músculo-esquelético, em particular nos músculos glicolíticos (Aristoy *et al.*, 2009; Marušić *et al.*, 2013). O músculo cardíaco é disso um bom exemplo onde, de acordo com Gil-Agustí *et al.* (2008), se encontram quantidades assinaláveis de anserina e carnosina. Por sua vez as menores quantidades destes dipéptidos histidil são determinadas nos músculos oxidativos (Cornet e Bousset, 1999; Mora *et al.*, 2008b). No entender de Suzuki *et al.* (2002), é o efeito tampão destes péptidos que os torna mais necessárias nos músculos glicolíticos pois, devido ao metabolismo anaeróbio, estes são mais susceptíveis de acumular maiores quantidades de ácido láctico. Na medida em que contribuem para a manutenção do equilíbrio ácido-base, a acção da anserina e da carnosina favorece, deste modo, a rápida recuperação dos músculos (Aristoy *et al.*, 2016). Young *et al.* (2013) referem que aqueles dois péptidos bioactivos desenvolvem também um papel de relevo na cicatrização de ferimentos, recuperação da fadiga e prevenção de doenças relacionadas com o *stress*.

Ao contrário da carnosina que se encontra naturalmente em grande parte dos organismos vertebrados, a anserina nem sempre está presente nestes organismos. Segundo Drozak *et al.* (2013), a anserina é mais abundante nas aves (onde supera os teores de carnosina) tendo sido identificada no músculo de peixes, e coelhos, mas nunca em humanos. Esta é uma particularidade útil que permite, através do rácio de anserina e carnosina, determinar as espécies incorporadas em produtos cárneos (Gil-Agustí *et al.*, 2008).

Os teores destes dois dipéptidos no organismo são determinados por diversas vias metabólicas, designadamente através da intervenção enzimática que, por intermédio da reacção de metilação mediada pela carnosina N-metiltransferase podem converter a carnosina em anserina (Drozak *et al.*, 2013).

Uma parte assinalável da carnosina encontrada no organismo humano tem origem na alimentação, através da ingestão de alimentos de origem animal, pois tanto a carnosina como a anserina estão ausentes nos alimentos de origem vegetal (Young *et al.*, 2013). Isto mesmo foi demonstrado por Park *et al.* (2005) que atestou a biodisponibilidade da carnosina através da sua determinação em sangue humano após consumo de carne de vaca. Compreensivelmente, os níveis mais elevados de carnosina são encontrados em indivíduos com dietas ricas em carne relativamente aos vegetarianos (Aristoy *et al.*, 2016). Tal só é possível porque estes dipéptidos chegam intactos ao intestino, sendo aí absorvidos ou hidrolisados (Marcolini *et al.*, 2015). Uma vez absorvidos, estes passam para a corrente sanguínea e a sua concentração no plasma aumenta (Park *et al.*, 2005). A concentração de carnosina, todavia, dependerá da acção da enzima carnosinase, responsáveis pela hidrólise da carnosina, presentes no intestino delgado e no sangue (Aristoy *et al.*, 2016).

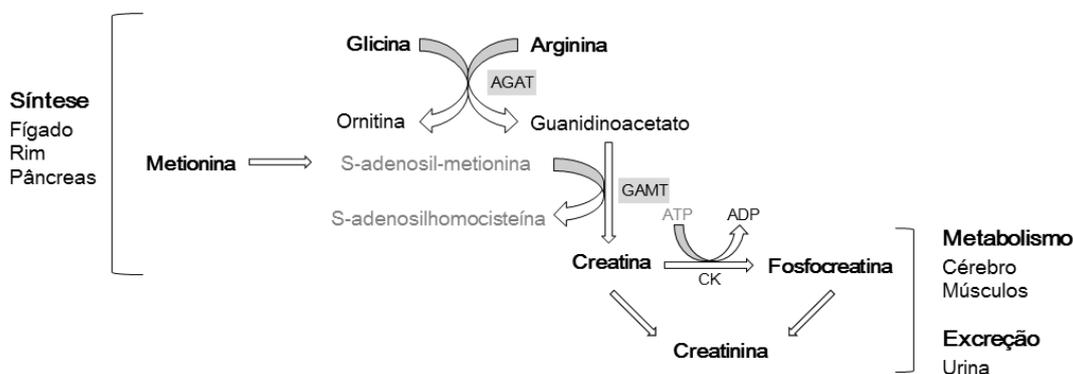
Considerando o conjunto de antioxidantes existentes na carne, alguns deles já enumerados anteriormente, a carnosina e anserina são os que se encontram em maior quantidade (Marušić *et al.*, 2013). Na carne estes participam na sua conservação, através da formação de complexos com os metais e da captação de radicais livres (Decker e Crum, 1991; Boldyrev e Abe, 1999; Gil-Agustí *et al.*, 2008), desta forma, prevenindo alterações na cor e retardando a oxidação da fracção lipídica (Decker e Crum, 1991). No seu trabalho Decker e Crum (1991), verificaram que a presença de anserina e carnosina se revelou mais eficaz, por exemplo, do que o BHT e  $\alpha$ -tocoferol (usualmente utilizados pela indústria como antioxidantes) na preservação da cor e da fracção lipídica da carne de porco congelada.

A disponibilidade de anserina e carnosina nos alimentos poderá ser afectada, em consequência do processamento tecnológico a que são sujeitos. Os dados já conhecidos a este respeito dão conta de resultados contraditórios. No caso do trabalho apresentado por Kuroda e Harada (2000), os autores noticiaram a diminuição dos teores de carnosina e anserina logo após a primeira hora de aquecimento de um caldo de carne. Na sua opinião os açúcares poderão ter reagido com estes dipéptidos por via da reacção de Maillard. Para a carnosina, os mesmos autores apresentam ainda uma segunda hipótese, em que esta é incorporada na fracção macromolecular insolúvel através da formação do tripéptido  $\gamma$ -glutamil- $\beta$ -alanil-histidina em resultado tratamento térmico. Aristoy *et al.* (2004) também registaram algumas perdas nos níveis de carnosina, todavia estas não se revelaram significativas. Os resultados publicados por Maikhunthod e Intarapichet (2005), bem como, Park *et al.* (2005) mostram que o teor em carnosina aumentou em consequência do tratamento térmico.

Seja durante a maturação da carne, seja durante o processamento, as proteínas são expostas à acção de enzimas responsáveis pela quebra das ligações peptídicas que ligam os aminoácidos que as compõe. Se nos produtos curados este processo é consumado quase exclusivamente pelas enzimas endógenas, nos produtos fermentados participam também as enzimas exógenas fornecidas pelas bactérias. Segundo Aristoy *et al.* (2016) os músculos não contêm carnosinase e as peptidases endógenas não são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas destes dipéptidos, razão pela qual os teores de carnosina e anserina permanecem inalterados durante a maturação da carne ou até mesmo durante a produção de presunto. Pelo contrário, algumas bactérias possuem a capacidade de produzir carnosinase. Este facto é claramente ilustrado pelos trabalhos de Durá *et al.* (2004a) e, mais tarde, de Casaburi *et al.* (2007) que documentaram que a microflora presente nos produtos tem influência directa no teor em carnosina. Também Marušić *et al.* (2013) dão conta da diminuição da carnosina, mas desta vez acompanhado do incremento da anserina, que os autores atribuíram em parte à hidrólise da carnosina nos seus aminoácidos constituintes (alanina e histidina), mas também à sua conversão por via enzimática.

### 1.5.2. Creatina

A creatina é produzida naturalmente pelo fígado, rins e pâncreas através da combinação de três aminoácidos: arginina, metionina e glicina (Mora *et al.*, 2010), cujo mecanismo é ilustrado na Figura 13. No organismo pode encontrar-se no estado livre ou na sua forma fosforilada (designada por fosfocreatina), sendo que, ambas as estruturas estão directamente implicadas no metabolismo energético.



**Figura 13.** Mecanismo de síntese e metabolismo da creatina.

AGAT: arginina:glicina amidinotransferase, GAMT: guanidinoacetato metiltransferase, CK: creatina-cinase.

Adaptado de Loureiro *et al.* (2010).

A creatina existente no organismo concentra-se maioritariamente no músculo-esquelético e no cérebro (Nasrallah *et al.*, 2010), onde é necessária a obtenção de energia para a contracção muscular, com especial ênfase nos músculos glicolíticos (Mora *et al.*, 2008b; Marušić *et al.*, 2013). Na opinião de Mora *et al.* (2008b) uma parte considerável desta creatina apresenta-se precisamente na forma fosforilada, que intervém na transferência do fosfato para o ADP. Por

esta razão, os níveis de creatina disponíveis nos músculos estão, como se compreende, fortemente relacionados com a performance desportiva, assim como com o aumento da força e da massa muscular. Uma parte da creatina disponível garante ainda a energia necessária às funções cerebrais (Rae e Bröer, 2015) sendo que, neste caso, a creatina não é armazenada, mas sim fornecida continuamente através da corrente sanguínea (Joncquel-Chevalier Curt *et al.*, 2015).

A creatina caracteriza-se ainda pelo seu potencial antioxidante, devido à sua capacidade para neutralizar radicais livres, nomeadamente os aniões peróxido (Lawler *et al.*, 2002; Sestili *et al.*, 2011). Segundo Lawler *et al.* (2002) a creatina pode também exercer um efeito protector relativamente às doenças neuromusculares que podem causar a perda de massa muscular e doenças cardiovasculares.

Alternativamente à sua biossíntese no organismo, e uma vez que esta não pode ser encontrada nos produtos de origem vegetal, a creatina pode ser absorvida através da ingestão de alimentos de origem animal. Os níveis de creatina na carne podem facilmente atingir ou até mesmo superar os 300 mg/100g (Purchas *et al.*, 2004b; Arihara e Ohata, 2008; Mora *et al.*, 2008b; Jayasena *et al.*, 2015). A quantidade de creatina disponível nos alimentos depende, porém, das condições de processamento, que promove a sua conversão a creatinina (Brosnan e Brosnan, 2016). A depleção dos teores de creatina é desencadeada por acção da temperatura, em especial na presença de níveis de pH reduzidos, sendo esta diminuição tanto mais elevada quanto maior for a duração do tratamento térmico (Purchas *et al.*, 2004a; Mora *et al.*, 2008a; Reig *et al.*, 2013; Brosnan e Brosnan, 2016). Ainda neste âmbito, Mora *et al.* (2008b) identificaram uma relação positiva entre o teor inicial de creatina e a creatinina formada. Assim sendo, quanto mais rica for a carne em creatina, maior será a concentração de creatinina no final do processamento.

Com o processamento da carne, em particular quando tratamentos térmicos estão envolvidos, uma parte da creatina e a creatinina são susceptíveis de ser convertidas em aminas aromáticas heterocíclicas (Ferguson, 2010). Tratam-se de substâncias com efeitos tóxicos para o organismo, facto que motivou a classificação, por parte da IARC (2016) como possivelmente ou provavelmente carcinogénicos (Grupos 2A e 2B). Sabe-se que a formação destes compostos carcinogénicos ocorre, via reacção de Maillard a temperaturas superiores a 150 °C e que envolve a presença de creatina e creatinina, aminoácidos e monossacáridos como a glucose (CE, 2003a). Muito embora o seu mecanismo de formação seja ainda desconhecido, foram já identificados alguns factores que potenciam a ocorrência de aminas heterocíclicas. Elevadas temperaturas, tais como as que são usadas para fritar ou grelhar, e processamentos prolongados são responsáveis pela produção de elevadas concentrações destes contaminantes (Koutros *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2014; Gibis *et al.*, 2015; Szterk, 2015; Wang *et al.*, 2015), assim como o tipo de carne (vaca, porco ou aves), o pH, a extensão da proteólise e a presença de agentes antioxidantes influenciam também a ocorrência de aminas aromáticas heterocíclicas (CE, 2003a; Szterk, 2015). No contexto dos produtos de salsicharia, o seu processamento decorre frequente

numa gama de temperatura muito inferior àquelas a que se regista a formação destas aminas, todavia, eles podem surgir durante a sua preparação em casa do consumidor.

A creatina é ainda conhecida como precursora da formação de *N*-nitrosaminas, designadamente a *N*-nitrosodimetilamina e a *N*-nitrososarcosina (Rath e Reyes, 2009). De acordo com vários autores, a creatina pode ser convertida em sarcosina e por reacção com o óxido nítrico, dar lugar à formação da *N*-nitrososarcosina (Walters, 1992; Pegg e Shahidi, 2000; Andrée *et al.*, 2010). Por seu turno, a *N*-nitrososarcosina pode ainda sofrer descarboxilação e assim dar lugar à ocorrência de *N*-nitrosodimetilamina. De realçar que esta reacção, além da matriz, pode ocorrer após a ingestão dos alimentos, no organismo, nomeadamente no estômago, por acção do baixo pH do meio (Habermeyer *et al.*, 2015).

## 2.

### INCIDÊNCIA DE PAH EM PRODUTOS DE SALSICHARIA TRADICIONAL PORTUGUESA

---

*Adaptado de:*

Santos, C., **Gomes, A.**, & Roseiro, L. C. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons incidence in Portuguese traditional smoked meat products. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2343-2347.

Roseiro, L. C., **Gomes, A.**, Patarata, L., & Santos, C. (2012). Comparative survey of PAHs incidence in Portuguese traditional meat and blood sausages. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1891-1896.

## 2.1. INTRODUÇÃO

Um dos perigos associados ao consumo dos produtos de salsicharia tradicional advém da presença de contaminantes químicos veiculados pelo fumo durante a sua fumagem, designados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (em inglês *polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH). São hoje conhecidas várias centenas de PAH que se formam durante a combustão da madeira (Simon *et al.*, 2005). Em virtude da sua natureza carcinogénica e da frequência com que se encontram nos alimentos, alguns têm merecido especial atenção. Pelo risco que representam, a investigação destes compostos tem-se vindo a intensificar. Como resultado têm surgido diversos estudos no sentido de conhecer de modo tão preciso quanto possível o grau de exposição dos consumidores a estes agentes nocivos (Martorell *et al.*, 2010; Alomirah *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014; Rozentāle *et al.*, 2015).

Considerando que Portugal é um país com fortes costumes no consumo de enchidos fumados e o impacto que os PAH podem ter na saúde dos consumidores, é essencial avaliar a extensão dos níveis de contaminação naqueles produtos. Porém, os resultados já publicados sobre a contaminação de produtos de salsicharia tradicional portuguesa com PAH são ainda bastante limitados. A caracterização do perfil de contaminação nestes produtos cárneos carece por isso de um estudo mais aprofundado a fim de conhecer o grau de exposição dos consumidores portugueses e, caso tal se afigure necessário, investigar a implementação das medidas correctivas necessárias. O conhecimento desta realidade assume especial importância se considerarmos o elevado número de produtores tradicionais existentes e pela heterogeneidade das práticas por eles seguidas. Na zona de Trás-os-Montes, por exemplo, os enchidos são sujeitos a um regime de fumagem mais intenso, comparativamente aos que são produzidos na zona do Alentejo, onde é frequente o recurso a câmaras de secagem.

Para fazer face à escassez de dados relativos à ocorrência de PAH em enchidos nacionais, foi conduzido um estudo que teve como objectivo avaliar a incidência destes contaminantes naqueles produtos. Pretendeu-se também aferir, a partir dos resultados obtidos e discutidos ao longo deste capítulo, acerca da sua segurança e da sua compatibilidade com os limites legais actualmente em vigor. Esta investigação considerou vários tipos de produtos provenientes de duas regiões amplamente reconhecidas pelos seus produtos de salsicharia tradicional: o Alentejo e Trás-os-Montes.

## 2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1. Amostragem

Considerando a diversidade de produtos à disposição dos consumidores foram seleccionadas duas regiões de produção: Trás-os-Montes e Alentejo. Adicionalmente, para cada zona geográfica, foram escolhidos seis tipos de produtos, onde se incluíram enchidos com diferentes características de tal forma que a amostragem final, apesar de abrangente, reflectisse de algum modo os padrões de consumo nacionais actuais. Deste modo, a selecção das amostras compreendeu produtos de diferentes calibres, composições (carne e sangue), bem como aqueles mais consumidos como é o caso do chouriço de carne e da alheira.

No total, tal como se apresenta na Tabela 10, foram analisados 90 enchidos, fornecidos por 7 produtores da região do Alentejo e 6 de Trás-os-Montes. O fabrico dos produtos seguiu os procedimentos tradicionais característicos de cada uma das regiões. Todos eles foram expostos ao fumo gerado a partir da madeira de azinho (*Quercus ilex*) e/ou sobreiro (*Quercus suber*), no caso dos enchidos Alentejanos, e de carvalho (*Quercus faginea*) e/ou castanho (*Castanea sativa* Mill.), no caso dos produtos Transmontanos. No momento da recolha todas as amostras foram embaladas sob vácuo para prevenir a sua desidratação. Já no laboratório as amostras foram congeladas, permanecendo a uma temperatura de -80 °C, ao abrigo da luz, até ao momento da sua análise. Para cada uma das amostras, a tripa e a massa interior foram analisadas separadamente, com o objectivo de avaliar o grau de contaminação de cada um daqueles constituintes.

**Tabela 10.** Amostragem considerada em função do tipo de produto e região de origem.

Produto	Diâmetro (cm)	Constituinte principal	Gordura (%) <sup>1</sup>	Fumagem (dias) <sup>2</sup>	Número de amostras
<i>Alentejo</i>					
Chouriço de carne	2	Carne	25,1	5	10
Morcela	2	Sangue	46,4	8	12
Cacholeira	2	Sangue	41,8	6	6
Chouriço mouro	2	Sangue	53,0	8	4
Painho	4	Carne	24,2	15	10
Paio de migos	10	Carne	40,0	30	6
Total	-	-	-	-	48
<i>Trás-os-Montes</i>					
Chouriço de carne	2	Carne	20,6	Desconhecido	10
Morcela	2	Sangue	39,5	Desconhecido	2
Moura	2	Sangue	23,9	Desconhecido	8
Alheira	2	Carne	16,0	Desconhecido	8
Chouriço doce	2	Sangue	11,7	Desconhecido	2
Salpicão	6	Carne	14,4	Desconhecido	12
Total	-	-	-	-	42

<sup>1</sup> Teores médios de gordura determinados para cada tipo de produto. Para efeitos de tratamento estatístico foram considerados os teores determinados experimentalmente.

<sup>2</sup> Períodos médios de fumagem em função de cada tipo de produto. Para efeitos de tratamento estatístico foram considerados os períodos reportados pelos produtores.

## 2.2.2. Determinação do teor em gordura

Antes da sua extracção, as amostras foram descongeladas (+4 °C/24h), a tripa removida e a massa interior homogeneizada num Grindomix (GM 200 Retsch, Haan, Alemanha).

O teor de gordura das amostras foi determinado com base no método descrito por Folch *et al.* (1957). Para o efeito, 10 g de amostra previamente trituradas foram homogeneizadas com 60 mL de uma mistura de solventes, composta por diclorometano e metanol na proporção de 2:1 (v/v), com auxílio de Polytron PT 3100 (Kinematica AG, Suíça). A amostra entretanto homogeneizada foi filtrada através de filtro de fibra de vidro sob vácuo. O resíduo sólido foi novamente homogeneizado com 60 mL da mistura de diclorometano e metanol, filtrado, o copo lavado com mais 30 mL da mesma mistura e o volume final ajustado para 150 mL. O extracto de gordura foi então transferido para uma ampola de decantação contendo 37,5 mL de uma solução salina que continha cloreto de sódio a 0,73%. Esta mistura foi cuidadosamente agitada e deixada em repouso durante a noite para permitir a separação das fases. Por fim, a fase orgânica foi recuperada para um balão previamente tarado e o solvente evaporado em evaporador rotativo sob vácuo (Laborota 4001, Heidolph, Schwabach, Alemanha), a uma temperatura de 45 °C. Os

balões com a gordura entretanto recuperada foram mantidos em exsiccador até que fosse atingido peso constante. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

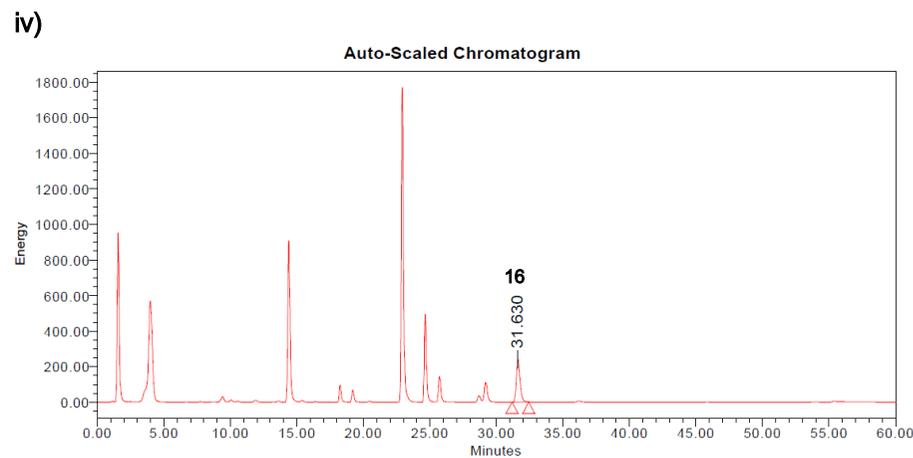
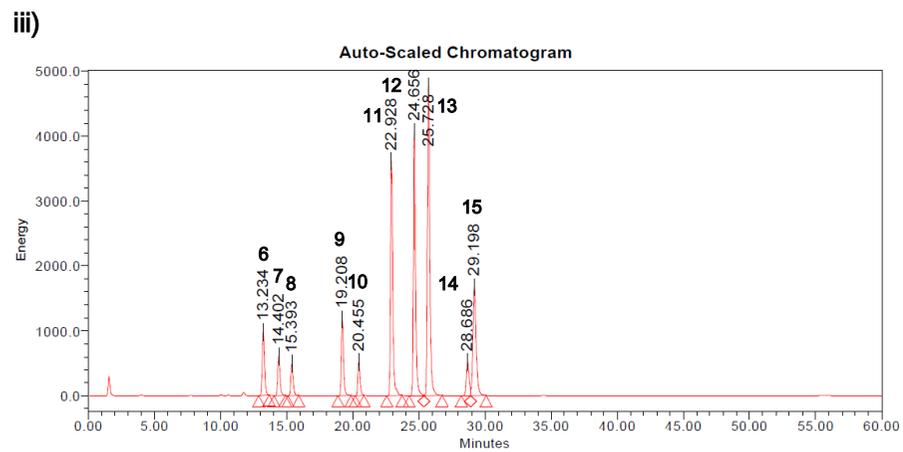
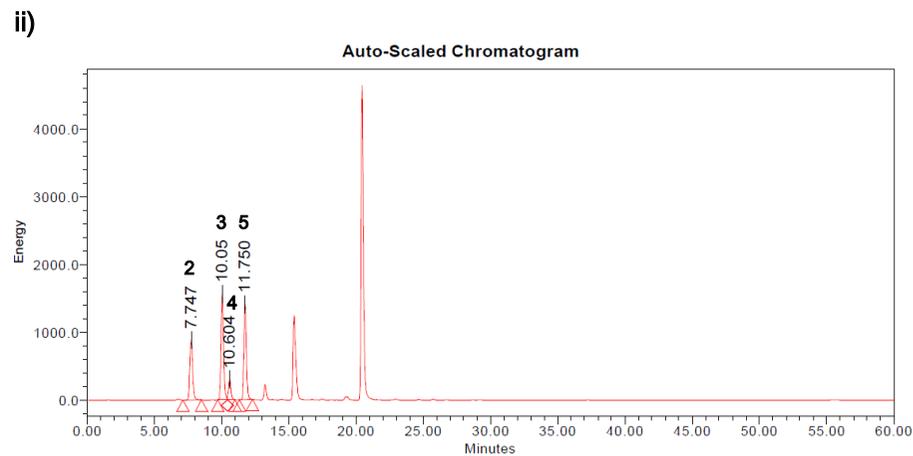
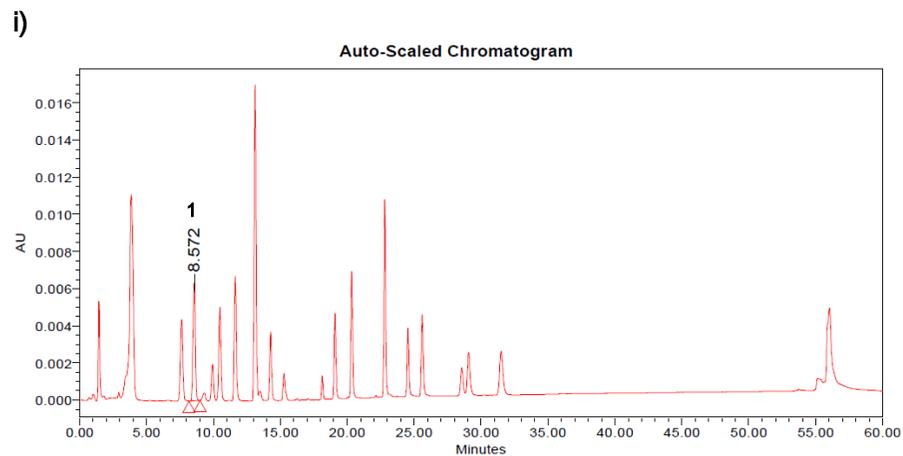
### 2.2.3. Extracção e análise cromatográfica dos PAH

A quantificação dos PAH foi efectuada através de uma metodologia analítica adaptada a partir dos procedimentos descritos por Simko *et al.* (1993). Para a extracção dos PAH, 10 g de amostra foram saponificados sob refluxo, durante cerca de 3h, na presença de uma mistura de 11,2 g de hidróxido de potássio, 10 mL de água e 90 mL de metanol. No caso da tripa, sempre que esta não atingia as 10 g, foi analisado todo o invólucro. Depois da adição de uma mistura de metanol/água (80:20, v/v), os PAH foram sucessivamente extraídos com quatro porções de 50 mL de n-hexano. As fracções recolhidas foram depois evaporadas sob vácuo num evaporador rotativo. O resíduo seco contendo os PAH foi de seguida ressuspendido em 3 mL de acetonitrilo e filtrado através de uma membrana Acrodisc 25 mm GHP, GF 0,45 µm (Waters, Milford, MA). Por fim, 20 µL do extracto contendo os PAH foram injectados num sistema HPLC composto por um módulo de separação (Waters 2690/2695, Waters, Milford, MA), um detector de fluorescência (Waters 2475 Multi λ Fluorescence, Waters, Milford, MA) e um detector UV/VIS (Waters 2487 Dual λ Absorbance, Waters, Milford, MA). O comprimento de onda de UV/VIS foi ajustado para 254 nm, enquanto os comprimentos de onda de excitação e emissão do detector de fluorescência foram definidos para 260/366 nm, 260/430 nm e 270/500 nm.

A separação dos PAH foi realizada numa coluna de fase reversa PAH C18 S-5 µm, 250 x 3,0 mm (Waters, Alemanha) através de um gradiente de eluição combinando água e acetonitrilo em proporções variáveis. O programa de eluição, com um fluxo constante de 1,5 mL/min, foi iniciado com uma proporção de 50% de acetonitrilo, aumentando progressivamente ao longo de 20 minutos, momento em que atingiu 100%. A eluição com 100% de acetonitrilo prolongou-se por mais 15 minutos de acetonitrilo. Todas as amostras incluídas neste estudo de incidência foram extraídas em triplicado, sendo que cada um dos extractos preparados foi injectado em duplicado.

O estudo de perfil de PAH em produtos de salsicharia tradicional portuguesa incidiu sobre os 16 compostos referenciados pela Environmental Protection Agency (EPA). Na Figura 14 são apresentados os cromatogramas dos compostos estudados, onde se incluem o acenaftileno (ACL), naftaleno (NA), acenafteno (AC), fluoreno (FL), fenantreno (PHE), antraceno (AN), fluoranteno (FA), pireno (PY), benz[*a*]antraceno (BaA), criseno (CHR), benzo[*b*]fluoranteno (BbFA), benzo[*k*]fluoranteno (BkFA), benzo[*a*]pireno (BaP), dibenzo[*a,h*]antraceno (DBaA), benzo[*ghi*]perileno (BghiP) e indeno[1,2,3-*cd*]pireno (IP).

O teor em PAH no produto inteiro foi determinado tendo por base a contribuição relativa da tripa (que representou cerca de 3 - 7% do produto) e da restante massa interior do enchido.



**Figura 14.** Exemplo dos cromatogramas de mistura de PAH obtidos através da detecção por UV/Vis (i), fluorescência a 260/366 nm (ii), 260/430 nm (iii) e 270/500 nm (iv). Picos identificados: 1: ACL, 2: NA, 3: AC, 4: FL, 5: PHE, 6: AN, 7: FA, 8: PY, 9: BaA, 10: CHR, 11: BbFA, 12: BkFA, 13: BaP, 14: DBaH, 15: BghiP e 16: IP

#### 2.2.4. Análise estatística

Os dados não apresentaram uma distribuição normal (confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk). Por esta razão a análise estatística dos resultados foi feita recorrendo aos testes não-paramétricos Mann Whitney e Kruskal-Wallis. A separação de médias foi efectuada através do teste de Dunn. Os testes referidos foram efectuados no *software* SPSS Statistics 20 (IBM Corporation, Nova Iorque, E. U. A.) considerando um nível de significância de 0,05.

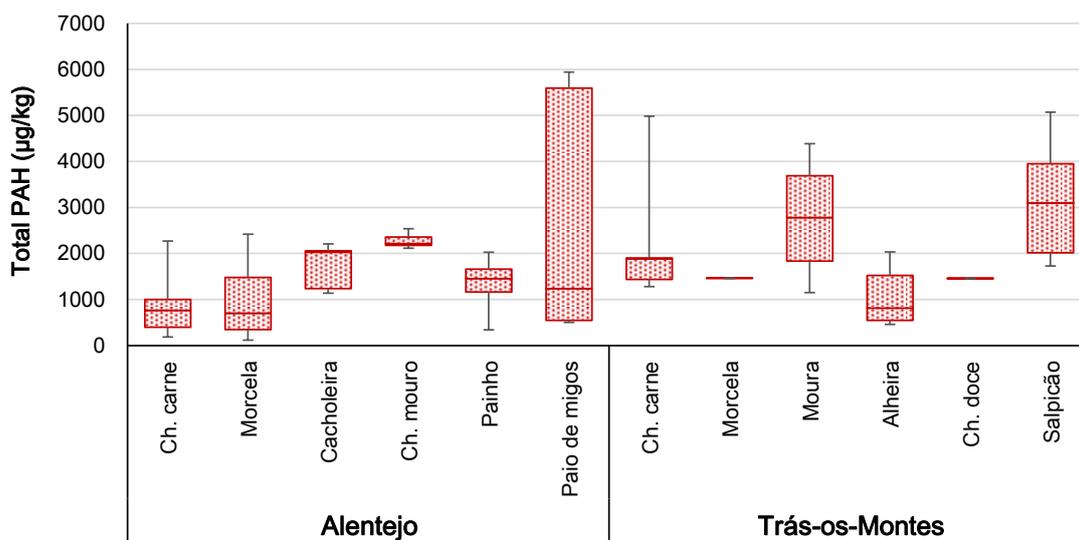
## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Perfil de PAH

Na Figura 15 são apresentados os resultados para os teores totais de PAH encontrados nas amostras de enchidos tradicionais analisadas. Desde logo, é bem patente a grande amplitude de resultados encontrados, em função do tipo de produto considerado. De notar ainda que para o mesmo produto foram encontrados resultados muito variáveis, como se constata pelo intervalo entre quartis e pelas barras de erro igualmente representadas. Esta diversidade de resultados foi particularmente evidente no paio de migos, onde os teores mínimos e máximos foram de 503,10 e 5941,74 µg/kg, respectivamente (Tabela 11). Este último é de facto um valor assinalável, mas que foi registado nas amostras de um único produtor (as restantes amostras de paio de migos não foram além de 1349,59 µg/kg), e que pode ser atribuído a um período de fumagem/secagem especialmente prolongado, a fim de serem atingidos os níveis de aw necessários para garantir a estabilidade microbiológica e físico-química dos produtos. Diferenças consideráveis foram também encontradas no chouriço de carne Transmontano, salpicão e moura, ainda que nestes três produtos as variações de resultados se tenham revelado inferiores às verificadas no paio de migos. A diferença entre os valores máximos e mínimos para o chouriço de carne (Trás-os-Montes), salpicão e moura foram, pela mesma ordem, de 3704,32; 3340,20 e 3233,51 µg/kg (Tabela 11).

Com base nos teores totais médios que constam da Figura 15, verifica-se que os produtos da região norte se apresentaram tendencialmente mais contaminados. Na verdade, o chouriço de carne, produzido em ambas as regiões, continha em média 877,40 e 2296,56 µg/kg de PAH, sendo que o teor mais elevado foi detectado nas amostras provenientes de Trás-os-Montes. Aliás, o chouriço de carne Alentejano foi, de entre os vários produtos desta região, aquele que revelou menores níveis de contaminação, cujo teor médio em PAH, tal como aconteceu no caso da morcela, não ultrapassou os 1000 µg/kg. A morcela (Alentejo) e alheira foram, respectivamente o segundo e terceiro produtos com menor quantidade de PAH, com teores médios de 996,36 e 1030,82 µg/kg, pela mesma ordem. Com efeito, de entre os seis tipos de

produtos recolhidos junto de produtores Transmontanos, a alheira foi o que revelou menores quantidades destes contaminantes químicos. Em oposição, o salpicão foi aquele que apresentou maiores níveis totais de PAH, cujo teor médio ascendeu a 3191,21 µg/kg (Tabela 11). Concentrações médias igualmente elevadas e acima de 2000 µg/kg foram determinadas na moura, paio de migos e chouriço mouro (2765,80; 2609,64 e 2428,52 µg/kg, respectivamente).



**Figura 15.** Diagrama de extremos e percentis relativo ao teor total em PAH (em µg/kg) quantificados nos produtos investigados.

Muito embora tenham sido identificadas oscilações consideráveis nos teores individuais dos PAH foi, ainda assim, possível identificar um perfil de PAH comum a todos os produtos sem excepção, e que se caracteriza pela predominância dos PAH leves sobre os compostos pesados (Tabela 11). Em média, os hidrocarbonetos compostos por até 4 anéis aromáticos representaram aproximadamente 99% do conjunto dos 16 PAH estudados. Se a estes excluirmos o BaA e CHR, que possuem actividade carcinogénica, os níveis médios de PAH considerados inócuos para a saúde dos consumidores nunca foram inferiores a 86%. Para o conjunto dos 12 tipos de produtos investigados, o ACL, PHE, FL e NA (por ordem decrescente de importância), foram os compostos com maior impacto no teor total de PAH. Os seus teores relativos variaram em média entre 12 e 33%.

**Tabela 11.** Teores médios individuais dos PAH (em µg/kg) nos produtos investigados, provenientes das duas regiões de produção consideradas: Alentejo e Trás-os-Montes.

	<b>Alentejo</b>					
	<i>Ch. carne</i>	<i>Morcela</i>	<i>Cacholeira</i>	<i>Ch. mouro</i>	<i>Painho</i>	<i>Paio de migos</i>
<i>ACL</i>	208,81 <sup>a</sup> (65,63 - 541,39) <sup>1</sup>	410,22 <sup>a,b,c</sup> (3,16 - 1674,25)	601,35 <sup>c,d</sup> (258,14 - 994,13)	1135,46 <sup>d</sup> (419,69 - 1798,78)	221,95 <sup>a</sup> (77,09 - 400,79)	256,32 <sup>a,b</sup> (61,89 - 494,21)
<i>NA</i>	107,74 <sup>a</sup> (6,89 - 347,88)	129,19 <sup>a</sup> (11,72 - 310,44)	239,10 <sup>b</sup> (112,09 - 391,18)	347,06 <sup>b</sup> (219,06 - 411,37)	147,50 <sup>a</sup> (23,69 - 373,67)	355,85 <sup>a,b</sup> (82,66 - 716,29)
<i>AC</i>	53,97 <sup>a,b,c</sup> (5,80 - 174,67)	61,00 <sup>a,b</sup> (0,33 - 232,73)	119,96 <sup>d</sup> (27,89 - 377,42)	103,21 <sup>d</sup> (50,93 - 172,59)	97,57 <sup>b,c,d</sup> (13,02 - 148,07)	350,71 <sup>c,d</sup> (20,75 - 1179,88)
<i>FL</i>	144,18 <sup>a,b,c</sup> (9,24 - 83,53)	119,33 <sup>a,b</sup> (4,47 - 346,73)	226,99 <sup>b,c,d,e,f</sup> (121,45 - 426,79)	374,05 <sup>d,e,f</sup> (198,47 - 510,12)	267,79 <sup>a,b,c,d,e</sup> (30,78 - 482,43)	747,30 <sup>c,d,e,f</sup> (107,03 - 1767,17)
<i>PHE</i>	239,71 <sup>a,b,c,d</sup> (27,98 - 574,60)	176,93 <sup>a,b</sup> (64,95 - 417,32)	281,09 <sup>b,c,d</sup> (199,45 - 400,90)	306,44 <sup>a,b,c,d</sup> (119,59 - 454,98)	331,51 <sup>b,c,d</sup> (93,59 - 58,13)	619,68 <sup>c,d,e</sup> (150,18 - 1422,04)
<i>AN</i>	49,06 <sup>a,b,c,d</sup> (6,41 - 109,31)	36,97 <sup>a,b</sup> (4,79 - 89,82)	68,39 <sup>c,d,e</sup> (39,47 - 100,94)	74,83 <sup>a,b,c,d,e</sup> (24,10 - 131,41)	71,27 <sup>b,c,d,e</sup> (20,32 - 126,48)	155,88 <sup>c,d,e</sup> (30,54 - 373,87)
<i>FA</i>	38,74 <sup>a,b</sup> (9,33 - 67,19)	39,50 <sup>a</sup> (12,80 - 61,08)	128,61 <sup>c,d,e</sup> (27,11 - 390,77)	41,37 <sup>a,b,c</sup> (30,90 - 50,92)	184,24 <sup>b,c,d,e</sup> (34,16 - 579,25)	77,80 <sup>a,b,c,d</sup> (15,43 - 164,34)
<i>PY</i>	30,63 <sup>a,b</sup> (6,94 - 61,02)	20,78 <sup>a</sup> (6,30 - 36,29)	29,28 <sup>a,b</sup> (25,02 - 46,61)	38,59 <sup>a,b</sup> (16,53 - 57,50)	69,39 <sup>b,c</sup> (23,42 - 174,34)	41,94 <sup>b,c</sup> (18,32 - 70,92)
<i>BaA</i>	1,78 <sup>a,b</sup> (0,26 - 4,92)	0,88 <sup>a</sup> (0,03 - 2,65)	3,28 <sup>c</sup> (1,24 - 8,23)	1,57 <sup>a,b</sup> (0,80 - 2,74)	2,37 <sup>b,c</sup> (0,93 - 3,91)	1,51 <sup>a,b</sup> (0,42 - 3,41)
<i>CHR</i>	1,65 <sup>b</sup> (0,27 - 4,10)	0,61 <sup>a</sup> (0,17 - 2,80)	1,57 <sup>b</sup> (1,38 - 2,47)	4,94 <sup>b</sup> (0,88 - 10,53)	1,65 <sup>b</sup> (0,54 - 2,72)	1,54 <sup>b</sup> (0,55 - 2,39)
<i>BbFA</i>	0,07 <sup>a</sup> (0,03 - 0,19)	0,03 <sup>a</sup> (0,00 - 0,09)	0,23 <sup>a,b</sup> (0,00 - 1,28)	0,07 <sup>a</sup> (0,00 - 0,13)	0,15 <sup>b</sup> (0,08 - 0,32)	0,07 <sup>a</sup> (0,00 - 0,13)
<i>BkFA</i>	0,34 <sup>a</sup> (0,22 - 0,35)	0,29 <sup>a</sup> (0,23 - 0,44)	0,43 <sup>c</sup> (0,28 - 0,55)	0,31 <sup>a,b,c</sup> (0,30 - 0,32)	0,46 <sup>b,c</sup> (0,25 - 0,49)	0,36 <sup>a,b</sup> (0,25 - 0,32)
<i>BaP</i>	0,38 <sup>a</sup> (0,06 - 0,54)	0,32 <sup>a</sup> (0,09 - 0,59)	0,39 <sup>a</sup> (0,26 - 0,53)	0,25 <sup>a</sup> (0,21 - 0,30)	0,63 <sup>a</sup> (0,14 - 0,93)	0,36 <sup>a</sup> (0,09 - 0,45)
<i>DahA</i>	0,16 <sup>a</sup> (0,06 - 0,36)	0,10 <sup>a</sup> (0,02 - 0,17)	0,13 <sup>a</sup> (0,00 - 0,27)	0,21 <sup>a</sup> (0,05 - 0,33)	0,58 <sup>b</sup> (0,14 - 0,86)	0,10 <sup>a</sup> (0,00 - 0,19)
<i>BghiP</i>	0,07 <sup>a</sup> (0,00 - 0,14)	0,09 <sup>a</sup> (0,00 - 0,60)	0,13 <sup>a</sup> (0,00 - 0,22)	0,06 <sup>a</sup> (0,00 - 0,10)	0,11 <sup>a</sup> (0,00 - 0,22)	0,14 <sup>a</sup> (0,03 - 0,59)
<i>IP</i>	0,11 <sup>b,c,d</sup> (0,04 - 0,18)	0,12 <sup>b,c</sup> (0,02 - 0,43)	0,03 <sup>a</sup> (0,00 - 0,08)	0,10 <sup>b,c,d</sup> (0,04 - 0,13)	0,44 <sup>c,d</sup> (0,00 - 1,06)	0,08 <sup>a,b,c</sup> (0,05 - 0,09)
<i>PAH leves<sup>2</sup></i>	876,27 <sup>a</sup> (185,57 - 2268,61)	995,41 <sup>a,b</sup> (113,34 - 2416,60)	1699,63 <sup>b,c,d,e,f</sup> (1132,02 - 2206,55)	2427,53 <sup>e,f</sup> (2111,01 - 2537,29)	1395,24 <sup>a,b,c,d</sup> (336,23 - 2022,25)	2608,53 <sup>a,b,c,d,e,f</sup> (502,41 - 5940,62)
<i>PAH pesados<sup>3</sup></i>	1,13 <sup>a</sup> (0,54 - 1,64)	0,94 <sup>a</sup> (0,48 - 1,76)	1,35 <sup>a,b</sup> (0,67 - 2,11)	1,00 <sup>a</sup> (0,68 - 1,23)	2,37 <sup>b</sup> (0,73 - 2,85)	1,10 <sup>a</sup> (0,68 - 1,23)
<i>PAH4<sup>4</sup></i>	3,88 <sup>a,b</sup> (0,85 - 9,69)	1,84 <sup>a</sup> (0,79 - 3,93)	5,47 <sup>b</sup> (2,97 - 10,87)	6,83 <sup>b</sup> (2,03 - 13,57)	4,80 <sup>b</sup> (2,14 - 7,31)	3,48 <sup>a,b</sup> (1,14 - 6,26)
<b>Total</b>	<b>877,40<sup>a</sup></b> (186,10 - 2270,25)	<b>996,36<sup>a,b</sup></b> (113,91 - 2418,01)	<b>1700,96<sup>b,c,d,e</sup></b> (1133,60 - 2208,66)	<b>2428,52<sup>e,f</sup></b> (2111,69 - 2538,52)	<b>1397,61<sup>a,b,c,d</sup></b> (339,98 - 2025,07)	<b>2609,64<sup>a,b,c,d,e</sup></b> (503,10 - 5941,74)

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Entre parêntesis são apresentados os teores mínimos e máximos detectados.

<sup>2</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

<sup>3</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBaH, BghiP e IP.

<sup>4</sup> O teor em PAH4 foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

**Tabela 11. (Continuação)**

	<b>Trás-os-Montes</b>					
	<i>Ch. carne</i>	<i>Morcela</i>	<i>Moura</i>	<i>Alheira</i>	<i>Ch. doce</i>	<i>Salpicão</i>
<i>ACL</i>	579,65 <sup>b,c,d</sup> (302,44 - 1442,35) <sup>1</sup>	1026,42 <sup>d</sup> (1025,77 - 1027,08)	659,39 <sup>d</sup> (324,48 - 970,79)	291,88 <sup>a,b,c</sup> (117,96 - 615,38)	405,70 <sup>a,b,c,d</sup> (405,37 - 406,03)	704,66 <sup>d</sup> (239,98 - 1430,51)
<i>NA</i>	283,29 <sup>b</sup> (154,75 - 571,47)	53,51 <sup>a</sup> (53,47 - 53,56)	283,22 <sup>b</sup> (106,26 - 511,76)	120,03 <sup>a</sup> (31,61 - 277,27)	405,05 <sup>b</sup> (403,15 - 406,95)	254,16 <sup>b</sup> (119,48 - 369,06)
<i>AC</i>	97,84 <sup>d</sup> (54,95 - 182,99)	14,46 <sup>a</sup> (14,46 - 14,46)	110,67 <sup>d</sup> (49,24 - 188,36)	46,51 <sup>a,b,c</sup> (14,07 - 75,04)	56,45 <sup>a,b,c,d</sup> (56,09 - 56,81)	165,83 <sup>d</sup> (47,96 - 307,59)
<i>FL</i>	302,03 <sup>c,d,e,f</sup> (62,75 - 596,55)	57,24 <sup>a</sup> (57,11 - 57,37)	477,38 <sup>e,f</sup> (157,11 - 825,22)	158,35 <sup>a,b,c,d</sup> (27,76 - 346,02)	126,73 <sup>a,b,c,d</sup> (125,39 - 128,07)	510,91 <sup>f</sup> (181,57 - 905,12)
<i>PHE</i>	400,38 <sup>c,d</sup> (196,42 - 789,06)	104,84 <sup>a</sup> (104,58 - 105,10)	566,91 <sup>d,e</sup> (232,69 - 910,91)	187,44 <sup>a,b,c</sup> (78,96 - 364,90)	215,10 <sup>a,b,c,d</sup> (214,19 - 216,02)	731,99 <sup>e</sup> (429,07 - 1085,61)
<i>AN</i>	88,68 <sup>d,e</sup> (41,81 - 177,81)	18,53 <sup>a</sup> (18,48 - 18,59)	114,36 <sup>e,f</sup> (46,69 - 193,51)	38,25 <sup>a,b,b,c</sup> (16,14 - 76,04)	41,60 <sup>a,b,c,d</sup> (41,33 - 41,87)	153,82 <sup>f</sup> (92,09 - 239,00)
<i>FA</i>	129,07 <sup>d,e</sup> (45,40 - 278,65)	38,99 <sup>a,b,c</sup> (38,73 - 39,24)	140,19 <sup>d,e</sup> (53,47 - 215,28)	44,42 <sup>a,b,c</sup> (27,39 - 82,21)	63,62 <sup>a,b,c,d</sup> (62,74 - 64,50)	188,22 <sup>e</sup> (81,43 - 313,84)
<i>PY</i>	101,04 <sup>c,d</sup> (44,37 - 247,59)	34,80 <sup>a,b</sup> (34,67 - 34,92)	125,26 <sup>d,e</sup> (51,81 - 180,30)	37,09 <sup>b</sup> (19,64 - 65,23)	47,45 <sup>b,c</sup> (47,16 - 47,75)	159,19 <sup>e</sup> (65,62 - 286,10)
<i>BaA</i>	124,34 <sup>e</sup> (47,22 - 309,27)	47,06 <sup>d,e</sup> (46,93 - 47,18)	121,41 <sup>e</sup> (37,82 - 170,61)	39,18 <sup>d</sup> (25,71 - 50,37)	39,92 <sup>d</sup> (36,75 - 43,09)	132,51 <sup>e</sup> (42,83 - 231,58)
<i>CHR</i>	163,01 <sup>d</sup> (63,19 - 456,25)	54,49 <sup>c</sup> (54,26 - 54,71)	139,62 <sup>d</sup> (67,14 - 245,31)	59,05 <sup>c</sup> (36,27 - 90,41)	42,53 <sup>b,c</sup> (40,17 - 44,90)	150,56 <sup>d</sup> (50,51 - 312,99)
<i>BbFA</i>	5,63 <sup>d</sup> (1,72 - 11,15)	2,10 <sup>c,d</sup> (2,09 - 2,10)	5,15 <sup>d</sup> (1,57 - 8,76)	1,71 <sup>c</sup> (1,05 - 2,41)	2,28 <sup>c,d</sup> (2,28 - 2,28)	6,68 <sup>d</sup> (2,05 - 22,70)
<i>BkFA</i>	2,62 <sup>e</sup> (0,87 - 5,37)	1,09 <sup>d,e</sup> (1,09 - 1,10)	2,57 <sup>e</sup> (0,76 - 4,13)	0,87 <sup>d</sup> (0,57 - 1,18)	1,28 <sup>e</sup> (1,24 - 1,32)	2,72 <sup>e</sup> (1,12 - 7,65)
<i>BaP</i>	5,35 <sup>c</sup> (1,53 - 12,34)	2,02 <sup>b,c</sup> (2,02 - 2,03)	5,65 <sup>c</sup> (1,31 - 9,41)	1,48 <sup>b</sup> (1,10 - 2,14)	2,03 <sup>b,c</sup> (2,02 - 2,04)	4,75 <sup>c</sup> (1,80 - 11,20)
<i>DahA</i>	5,58 <sup>d</sup> (1,91 - 9,20)	2,49 <sup>c,d</sup> (2,45 - 2,52)	5,71 <sup>d</sup> (1,85 - 9,37)	2,18 <sup>c</sup> (1,86 - 2,62)	3,44 <sup>d</sup> (3,26 - 3,62)	6,91 <sup>d</sup> (2,73 - 18,81)
<i>BghiP</i>	5,53 <sup>c</sup> (2,22 - 10,60)	2,39 <sup>b</sup> (2,39 - 2,39)	5,43 <sup>c</sup> (2,07 - 9,60)	2,33 <sup>b,c</sup> (1,93 - 2,89)	2,97 <sup>c</sup> (2,92 - 3,02)	15,73 <sup>c</sup> (2,38 - 77,36)
<i>IP</i>	2,51 <sup>d</sup> (0,04 - 9,02)	0,52 <sup>d</sup> (0,51 - 0,54)	2,88 <sup>d</sup> (0,00 - 8,58)	0,05 <sup>a,b</sup> (0,00 - 0,23)	0,18 <sup>c,d</sup> (0,17 - 0,20)	2,51 <sup>c,d</sup> (0,01 - 11,79)
<i>PAH leves</i> <sup>2</sup>	2269,34 <sup>c,d,e,f</sup> (1270,49 - 4929,31)	1450,33 <sup>a,b,d,d,e</sup> (1450,29 - 1450,37)	2738,39 <sup>d,e,f</sup> (1141,55 - 4335,10)	1022,20 <sup>a,b,c</sup> (451,80 - 2021,25)	1444,15 <sup>a,b,c,d,e</sup> (1443,66 - 1444,65)	3151,85 <sup>f</sup> (1705,66 - 4921,36)
<i>PAH pesados</i> <sup>3</sup>	27,22 <sup>d</sup> (8,36 - 53,92)	10,61 <sup>c,d</sup> (10,56 - 10,66)	27,40 <sup>d</sup> (7,57 - 47,57)	8,62 <sup>c</sup> (6,67 - 11,03)	12,18 <sup>d</sup> (11,91 - 12,45)	39,30 <sup>d</sup> (10,49 - 147,49)
<i>PAH4</i> <sup>4</sup>	298,33 <sup>d</sup> (120,67 - 787,72)	105,67 <sup>c,d</sup> (105,32 - 106,01)	271,83 <sup>d</sup> (120,90 - 426,08)	101,42 <sup>c</sup> (68,26 - 144,64)	86,76 <sup>c</sup> (81,24 - 92,28)	294,50 <sup>d</sup> (97,37 - 577,54)
<b>Total</b>	<b>2296,56<sup>c,d,e,f</sup></b> (1278,91 - 4983,23)	<b>1460,94<sup>a,b,c,d,e</sup></b> (1460,85 - 1461,03)	<b>2765,80<sup>d,e,f</sup></b> (1149,16 - 4382,67)	<b>1030,82<sup>a,b,c</sup></b> (458,70 - 2032,28)	<b>1456,33<sup>a,b,c,d,e</sup></b> (1455,57 - 1457,10)	<b>3191,21<sup>f</sup></b> (1728,65 - 5068,85)

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Entre parêntesis são apresentados os teores mínimos e máximos detectados.

<sup>2</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

<sup>3</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBaH, BghiP e IP.

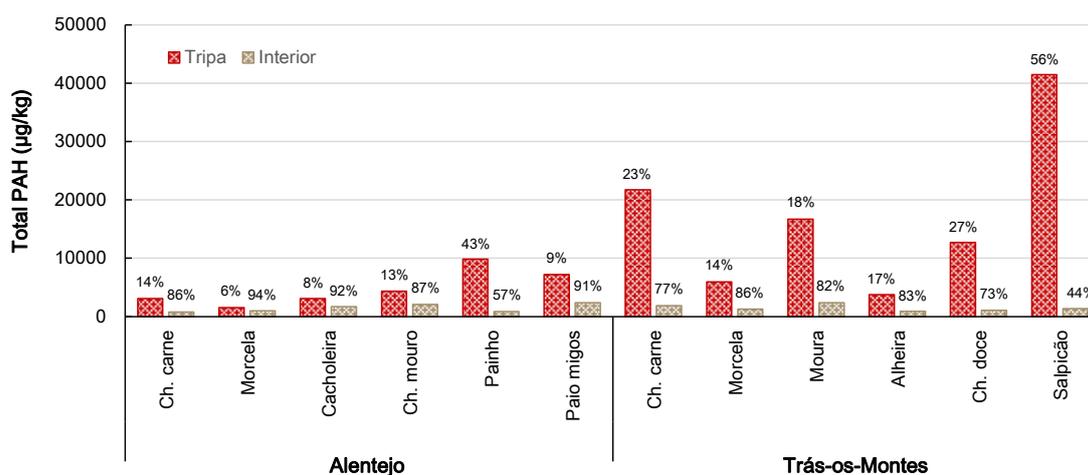
<sup>4</sup> O teor em PAH4 foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

Relativamente aos PAH leves cabe-nos ainda destacar o BaA e CHR, para os quais se encontraram níveis de contaminação invulgarmente elevados ( $p < 0,05$ ) nos produtos da região Norte e, com alguma frequência, superiores a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Em termos relativos, nestes enchidos o BaA e CHR representaram em conjunto quase 9% do total dos PAH, por oposição aos do Alentejo que corresponderam a menos de 0,5%. Ainda neste âmbito, verificou-se que o BaA foi (com teores médios entre 0,88 e 3,28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , na morcela e cacholeira, respectivamente), destes dois compostos, geralmente o mais prevalente nos produtos Alentejanos, ao passo que nos produtos Transmontanos, o CHR foi, sem excepção, o mais abundante (entre 42,53 e 163,01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , pela mesma ordem, no chouriço doce e no chouriço de carne).

Os PAH pesados, designadamente o BbFA, BkFA, BaP, DBahA, BghiP e o IP, estiveram presentes em quantidades consideravelmente mais reduzidas, comparativamente aos níveis dos contaminantes leves, tanto nos produtos Alentejanos como nos Transmontanos. Ainda assim, estes últimos destacaram-se uma vez mais pelas quantidades expressivas destes compostos, especialmente se considerarmos que se tratam de compostos que comportam um risco para a saúde dos consumidores. Os valores mais elevados de PAH pesados verificaram-se no salpicão (39,30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), seguido pela moura (27,40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e pelo chouriço de carne (27,22  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). A alheira foi, de entre os produtos Transmontanos, aquele que apresentou, os menores teores de PAH pesados (8,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), que ainda assim superou ( $p < 0,05$ ) em mais de 3 vezes o verificado nos produtos Alentejanos. Nestes produtos, muito embora tenham sido encontrados 2,85  $\mu\text{g}/\text{kg}$  numa das amostras de painho, em média o teor em PAH pesados não atingiu sequer os 1,50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabela 11). Relativamente ao BaP, em particular, os níveis de contaminação médios nos enchidos Alentejanos oscilaram entre 0,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , no chouriço mouro e 0,63  $\mu\text{g}/\text{kg}$  no painho. Nas amostras transmontanas, por sua vez, os teores encontrados variaram entre 1,48 e 5,65  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (na alheira e moura, respectivamente). Em face da regulamentação actual, verificou-se que o limite máximo de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  foi ultrapassado para a maioria das amostras desta região, com excepções pontuais a serem identificadas em algumas amostras de chouriço de carne e moura (todas do mesmo produtor). A situação inversa foi identificada na alheira sendo que, neste caso, apenas os enchidos de um dos produtores se apresentaram acima do referido patamar.

As reportadas diferenças anteriormente para estas duas regiões, tal como se infere pela Tabela 11, estendem-se igualmente ao indicador PAH4 (composto pelo BaA, CHR, BbFA e BaP). Neste caso particular, os níveis encontrados nas amostras transmontanas foram, sem excepção, fortemente incrementados pelas elevadas concentrações de BaA e CHR. O chouriço de carne e o salpicão são disso um bom exemplo, com níveis próximos de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . De entre os produtos Transmontanos, a alheira foi aquele onde se registou o menor teor deste indicador, ainda assim com níveis acima de 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mais concretamente 68,26  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . O teor em PAH4 nos enchidos Alentejanos, por sua vez, apresentou-se em níveis controlados. De todas as amostras estudadas apenas uma, de chouriço mouro (13,57  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), apresentou níveis superiores ao regulamentado de 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . De resto, em média, o nível mais baixo de PAH4 foi de 1,84  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , determinado na morcela e o mais alto de 6,83  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , no chouriço mouro.

Na Figura 16 são retratados os resultados para o teor total de PAH determinados separadamente na tripa e no interior dos enchidos. A figura apresentada é bem elucidativa quanto à distribuição desigual dos PAH. Estes concentraram-se predominantemente à superfície, na tripa. A maior acumulação de PAH foi registada nas tripas removidas de produtos Transmontanos, como o salpicão (41466,55 µg/kg), chouriço de carne (21738,89 µg/kg), moura (16718,28 µg/kg) e chouriço doce (12691,39 µg/kg). Já nos produtos Alentejanos, os teores mais elevados foram registados nos invólucros do painho e do paio de migos (9840,26 e 7202,58 µg/kg, respectivamente). Tratam-se evidentemente de valores bastante elevados, todavia o invólucro corresponde a apenas entre 3 e 7% da massa total dos enchidos, não sendo usualmente a fracção mais influente. Ao invés, o nível de contaminação da camada interna contribui habitualmente muito mais para a contaminação global dos produtos. Esta tendência foi, de resto, confirmada pelos resultados que demonstram que apenas 6 a 27% do total dos PAH se concentraram na tripa (Figura 16). O painho (43%) e, em particular o salpicão (56%) revelaram-se exceções. Apesar disto, quando são considerados os 12 tipos de produtos analisados, a parcela relativa à massa interior correspondeu em média a 76% da quantidade PAH determinados no produto inteiro.



**Figura 16.** Teor total em PAH na tripa e no interior dos produtos estudados, bem como a respectiva contribuição relativa (expressa em %) para os níveis de contaminação no produto inteiro.

A Tabela 12 pretende mostrar a distribuição de cada um dos 16 PAH na tripa e na massa dos enchidos. A sua análise permite identificar algumas tendências que, no nosso entender, devem ser destacadas e se prendem com as diferentes dinâmicas de migração que se verificam, dependendo da origem dos produtos e do composto em causa.

**Tabela 12.** Teor relativo médio dos 16 PAH estudados (expresso em %) na tripa e na massa dos produtos analisados em função da região de produção.

	Alentejo		Trás-os-Montes	
	<i>Tripa</i>	<i>Interior</i>	<i>Tripa</i>	<i>Interior</i>
<i>ACL</i>	12	88	21	79
<i>NA</i>	7	93	16	84
<i>AC</i>	28	72	28	72
<i>FL</i>	19	81	28	72
<i>PHE</i>	24	76	29	71
<i>AN</i>	25	75	30	70
<i>FA</i>	29	71	36	64
<i>PY</i>	32	68	38	62
<i>BaA</i>	53	47	39	61
<i>CHR</i>	43	57	37	63
<i>BbFA</i>	95	8	41	59
<i>BkFA</i>	21	79	40	60
<i>BaP</i>	50	50	43	57
<i>DahA</i>	98	2	42	58
<i>BghiP</i>	89	11	40	60
<i>IP</i>	95	6	80	20
<i>PAH leves</i>	17	83	30	70
<i>PAH pesados</i>	49	51	45	55

Nos produtos da região Norte, com excepção do IP, os PAH concentraram-se maioritariamente na massa, em especial aqueles de menor peso molecular como o ACL, NA, AC, FL, PHE e AN, reflexo da sua maior capacidade de migração relativamente aos pesados. Uma tendência semelhante foi verificada nos enchidos Alentejanos para estes mesmos compostos, mas não para a maioria dos PAH pesados. Neste caso, o BbFA, DahA, BghiP e IP ficaram principalmente retidos à superfície, encontrando-se em quantidades reduzidas nas camadas internas.

### 2.3.2. Influência da tecnologia de processamento

A presença de PAH, bem como a extensão da contaminação, são atribuídos primordialmente, à tecnologia de fabrico dos produtos, nomeadamente ao processo de fumagem. Todavia, algumas das características dos enchidos podem favorecer a sua deposição e a sua absorção. Como tal, foi avaliado o efeito de cinco factores que, no nosso entender, podem ter afectado os resultados obtidos como a região de produção (Alentejo e Trás-os-Montes), a composição (à base de carne ou sangue), o teor de gordura (< 30%, 30 - 50% e > 50%), o diâmetro dos produtos (2, 4 e 6 - 10 cm) e o período de fumagem (5, 6, 8, 15 e 30 dias). Este estudo foi feito por meio dos testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, para o BaP, PAH leves, PAH pesados, PAH4 e total de PAH. De referir que pelo facto de serem desconhecidos os períodos de fumagem dos produtos

provenientes de Trás-os-Montes, o tratamento estatístico efectuado para este factor considerou apenas aqueles que foram fabricados no Alentejo.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 13 é possível concluir que o efeito mais significativo ( $p < 0,05$ ) se deveu à região de produção e ao diâmetro dos enchidos. O maior ( $p < 0,001$ ) grau de contaminação verificado para os produtos de Trás-os-Montes, já referido anteriormente, é claramente confirmado através do tratamento estatístico realizado. Para o conjunto dos 16 compostos, os enchidos desta região continham, em média, mais PAH comparativamente àqueles que foram fabricados no Alentejo. Resultados que, como tivemos oportunidade de referir, são alavancados não só pelo salpicão e a moura, mas também pelo chouriço de carne e a morcela (estes últimos comuns às duas zonas de produção). No que respeita ao grupo PAH4, a diferença entre ambas as regiões foi ainda mais peremptória ( $p < 0,001$ ), sendo que, neste caso, o teor encontrado nos produtos da região Norte (193,09  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) superaram em mais de 40 vezes os verificados para os homólogos da região Sul, cujo teor médio não alcançou sequer o patamar dos 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Relativamente ao calibre, os menores níveis de contaminação foram encontrados nos enchidos de calibre intermédio (4 cm), seguidos pelos de 2 cm e, por fim pelos de 6 - 10 cm. De sublinhar que as diferenças ( $p < 0,05$ ) evidenciadas pelo tratamento estatístico (Tabela 13) relativamente ao calibre se centraram sobretudo nos produtos com maior diâmetro (6 - 10 cm), onde se registaram, invariavelmente, as concentrações de PAH mais elevadas. Quando apenas são comparados os produtos com 4 e 6 - 10 cm de diâmetro, é possível constatar que estes últimos apresentaram mais do dobro do total de PAH (2938,76  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , por oposição a 1310,02  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). No caso do indicador PAH4, o nível de contaminação registado nos produtos de maior diâmetro (195,76  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) superou em mais de 40 vezes o determinado para aqueles de 4 cm (4,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Menor, mas ainda assim significativa ( $p < 0,05$ ) foi a diferença entre os produtos com 2 e 6 - 10 cm, com os primeiros a apresentarem cerca de metade (104,57  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) da quantidade dos PAH4 determinados nos enchidos de maior calibre.

Do ponto de vista estatístico, as diferenças ( $p < 0,05$ ) assinaladas na Tabela 13, respeitantes ao período de fumagem, surgem apenas para os PAH pesados e PAH4. Para o primeiro grupo, por exemplo, o nível mais elevado, 1,95  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , foi detectado nos produtos com 15 dias de fumagem. O teor máximo do indicador PAH4 (6,80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), por sua vez, foi identificado em enchidos com 6 dias de fumagem. De salientar ainda que os PAH leves e total de PAH foram tendencialmente ( $p > 0,05$ ) mais elevados naqueles produtos que permaneceram por 30 dias no fumeiro. Por conseguinte, apesar de os teores mais elevados terem incidido mais frequentemente nos enchidos fumados por 6 e 15 dias, não foi possível estabelecer uma correlação directa entre os níveis de hidrocarbonetos determinados e o período de fumagem.

**Tabela 13.** Efeito da região de produção, constituinte principal, teor de gordura, diâmetro e período de fumagem nos teores médios em BaP, PAH leves, pesados, PAH4 e total de PAH (em µg/kg) quantificados nos enchidos tradicionais.

	Região		Constituinte principal		Teor de gordura (%)			Diâmetro (cm)			Fumagem (dias)				
	Alentejo	Trás-os-Montes	Carne	Sangue	< 30	30 - 50	> 50	2	4	6 - 10	5	6	8	15	30
<i>BaP</i>	0,38 (0,06 - 0,93) <sup>1</sup> ***	3,54 (1,10 - 12,34)	2,16 (0,06 - 12,34) ns	1,77 (0,09 - 9,41)	2,76 <sup>b</sup> (0,06 - 12,34) ***	1,64 <sup>a</sup> (0,09 - 8,66)	0,29 <sup>a</sup> (0,09 - 0,59)	2,07 <sup>a</sup> (0,06 - 12,34) **	0,48 <sup>b</sup> (0,14 - 0,93)	3,23 <sup>c</sup> (0,09 - 11,20)	0,31 (0,06 - 0,54) ns	0,38 (0,26 - 0,53)	0,27 (0,09 - 0,59)	0,48 (0,14 - 0,93)	0,27 (0,09 - 0,45)
<i>PAH leves<sup>1</sup></i>	1667,09 (113,34 - 5940,62) ***	2012,71 (451,80 - 4929,31)	1887,23 (185,57 - 5940,62) ns	1792,57 (113,34 - 4335,10)	1824,94 (185,57 - 4929,31) ns	2039,12 (297,09 - 5940,62)	1613,13 (113,34 - 2537,29)	1593,21 <sup>a</sup> (113,34 - 4929,31) ***	1308,07 <sup>a</sup> (336,23 - 2022,25)	2912,40 <sup>b</sup> (502,41 - 5940,62)	852,51 (185,57 - 2268,61) ns	1768,00 (1132,02 - 2206,55)	1317,40 (113,34 - 2537,29)	1308,07 (336,23 - 2022,25)	2507,00 (502,41 - 5940,62)
<i>PAH Pesados<sup>2</sup></i>	1,32 (0,48 - 2,85) ***	20,89 (6,67 - 147,49)	13,29 (0,54 - 147,49) *	8,91 (0,48 - 47,57)	17,22 <sup>b</sup> (0,48 - 147,49) **	7,41 <sup>b</sup> (0,68 - 40,04)	0,98 <sup>a</sup> (0,56 - 1,76)	10,30 <sup>a</sup> (0,48 - 53,92) *	1,95 <sup>a</sup> (0,73 - 2,85)	26,37 <sup>b</sup> (0,68 - 147,49)	0,99 <sup>a</sup> (0,54 - 1,64) **	1,31 <sup>a,b</sup> (0,67 - 2,11)	0,94 <sup>a</sup> (0,48 - 1,76)	1,95 <sup>b</sup> (0,73 - 2,85)	0,96 <sup>a,b</sup> (0,68 - 1,23)
<i>PAH4<sup>3</sup></i>	4,38 (0,79 - 13,57) ***	193,09 (68,26 - 787,72)	117,74 (0,85 - 787,72) *	79,93 (0,79 - 426,08)	155,02 <sup>b</sup> (0,85 - 787,72) ***	62,56 <sup>a</sup> (0,98 - 366,64)	3,82 <sup>a</sup> (0,79 - 13,57)	104,57 <sup>a</sup> (0,79 - 787,72) **	4,62 <sup>b</sup> (2,14 - 7,31)	195,76 <sup>c</sup> (1,14 - 577,54)	3,92 <sup>a,b</sup> (0,85 - 9,69) **	6,80 <sup>b</sup> (2,97 - 10,87)	3,07 <sup>a</sup> (0,79 - 13,57)	4,62 <sup>a,b</sup> (2,14 - 7,31)	3,51 <sup>a,b</sup> (1,14 - 6,26)
<i>Total PAH</i>	1668,41 (113,91 - 5941,74) ***	2033,60 (458,70 - 5068,85)	1900,53 (186,10 - 5941,74) ns	1801,48 (113,91 - 4382,67)	1842,16 (186,10 - 5068,85) ns	2046,52 (297,86 - 5941,74)	1614,11 (113,91 - 2538,52)	1603,51 <sup>a</sup> (113,91 - 4983,23) ***	1310,02 <sup>a</sup> (336,98 - 2025,07)	2938,76 <sup>b</sup> (503,10 - 5941,74)	853,50 (186,10 - 2270,25) ns	1769,31 (1133,60 - 2208,66)	1318,35 (113,91 - 2538,52)	1310,02 (336,98 - 2025,07)	2507,96 (503,10 - 5941,74)

Para o mesmo factor, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

ns - não significativo, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

<sup>1</sup> Entre parêntesis são apresentados os teores mínimos e máximos detectados.

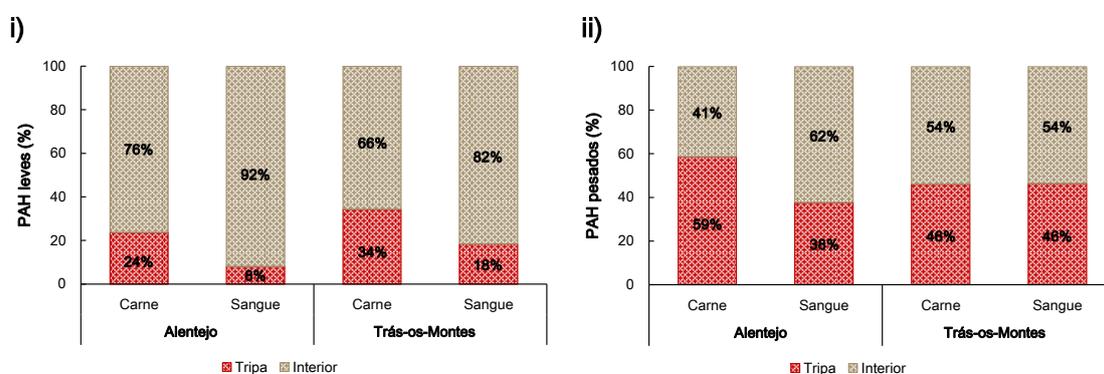
<sup>2</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

<sup>3</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBaH, BghiP e IP.

<sup>4</sup> O teor em PAH4 foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

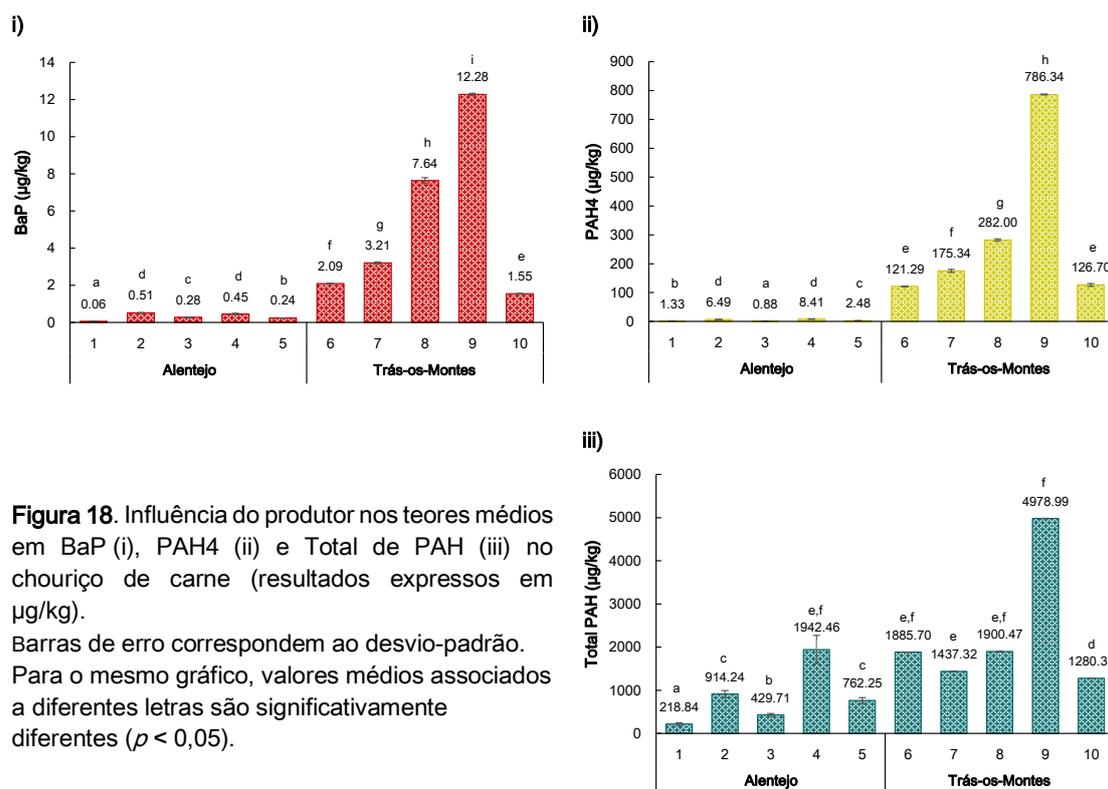
O teor de gordura apenas influenciou ( $p < 0,05$ ) o BaP, o somatório dos PAH pesados e o indicador PAH4, apresentando as amostras com menor teor de gordura os maiores níveis de contaminação. Para os produtos com menos de 30% de gordura, em média, os níveis de BaP, PAH pesados e PAH4 corresponderam, respectivamente, a 2,76; 17,22 e 155,02  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Por oposição, os enchidos com maior teor de gordura apresentaram, pela mesma ordem, 0,29; 0,98 e 3,82  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Tratando-se os PAH de compostos de natureza lipofílica, a sua deposição à superfície e posterior difusão para o interior são favorecidas pela massa gorda. Para que estes resultados sejam correctamente interpretados, impõem-se assinalar que a classe de produtos com menos de 30% de gordura inclui o salpicão e o chouriço de carne Transmontanos que, como já foi referido, se encontram entre os produtos onde se observaram teores de hidrocarbonetos mais elevados e que certamente contribuíram para o incremento destes resultados. Todavia, quando são calculados os teores médios de PAH para os produtos de menor calibre verifica-se que os níveis de contaminação mais elevados ocorrem tendencialmente ( $p > 0,05$ ) naqueles que continham maior quantidade de gordura na sua formulação (1575,16; 1620,20 e 1668,54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , para os produtos com  $< 30\%$ , 30 - 50% e  $> 50\%$ , respectivamente).

No que concerne ao constituinte principal dos produtos, e ainda de acordo com a Tabela 13, os produtos à base de carne revelaram-se mais contaminados, em particular no que se refere aos grupos representados pelo somatório dos PAH pesados e PAH4, para os quais se identificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), por oposição aos homólogos à base de sangue. Nos produtos à base de carne encontraram-se 15,09 e 132,21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de PAH pesados e PAH4, respectivamente, enquanto aqueles à base de sangue continham 8,46 e 77,93  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , pela mesma ordem. Também aqui, quando a mesma comparação é feita apenas entre os produtos de menor calibre, os de sangue apresentam teores totais médios (1801,49  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) tendencialmente ( $p > 0,05$ ) mais elevados comparativamente aos de carne (1401,59  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Um outro dado que nos parece relevante prende-se com a capacidade de absorção dos PAH por parte dos enchidos à base de sangue. Como ilustra a Figura 17, as amostras de sangue revelaram maiores níveis de migração tanto de PAH leves como pesados.



**Figura 17.** Efeito da composição sobre o grau de migração dos PAH leves (i) e pesados (ii) para o interior dos enchidos, em função do seu constituinte principal (resultados expressos em %).

Sendo que o fabrico de chouriço de carne é transversal à generalidade dos produtores, quando nos centramos apenas na avaliação deste produto é possível distinguir diferenças relacionadas com as tecnologias implementadas por cada produtor. Isso mesmo é demonstrado na Figura 18, onde se observam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os teores dos PAH em função do produtor, mesmo quando se tratam de produtores da mesma zona geográfica. No que diz respeito ao teor total de PAH, o produtor 9 foi o que se destacou, pelos teores mais elevados nos seus produtos. De assinalar que esta tendência não se cingiu apenas ao chouriço de carne, onde se quantificou um teor total de PAH de aproximadamente 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mas para todas as amostras deste produtor, designadamente, a moura, a alheira e o salpicão. À parte destas amostras de chouriço de carne, todas as outras apresentaram menos de 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de PAH. Este é o caso, por exemplo, do chouriço de carne do produtor 4 que, da zona geográfica do Alentejo, foi o que apresentou maiores níveis de contaminação (1942,46  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), equiparáveis aos de algumas amostras transmontanas recolhidas junto dos produtores 6, 7 e 8. No que diz respeito ao BaP e PAH4, nas amostras de chouriço de carne do Alentejo, estes compostos não foram além de 0,51 e 8,41  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (produtores 1 e 4, respectivamente). Já nos produtores da região transmontana, detectaram-se, nalguns casos, teores de BaP tão elevados quanto 7,64 e 12,28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (produtores 8 e 9, respectivamente) e 786,34  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de PAH4 (produtor 9).

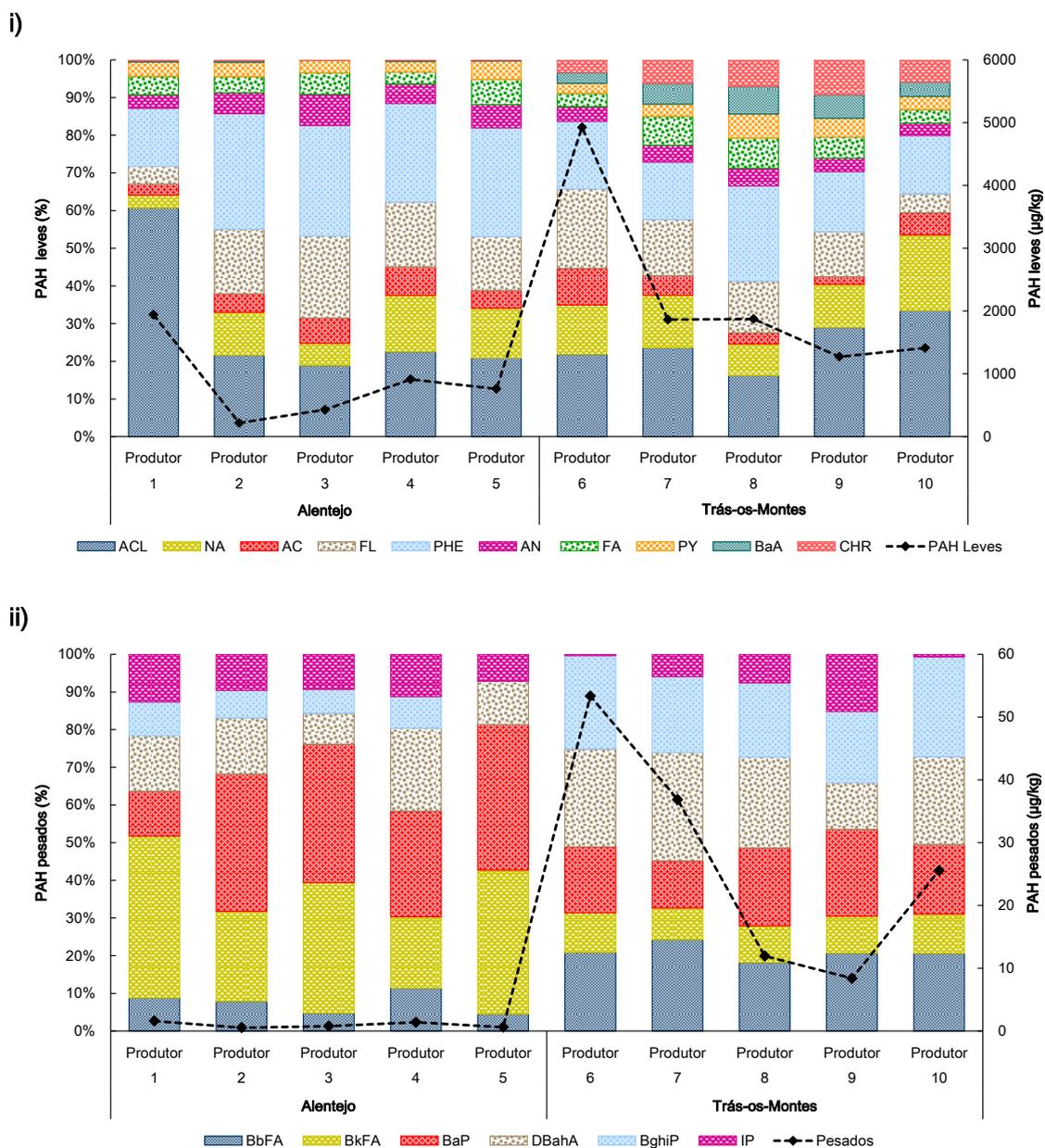


**Figura 18.** Influência do produtor nos teores médios em BaP (i), PAH4 (ii) e Total de PAH (iii) no chouriço de carne (resultados expressos em  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Barras de erro correspondem ao desvio-padrão. Para o mesmo gráfico, valores médios associados a diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Relativamente ao perfil de PAH, são apresentados na Figura 19 os teores relativos de PAH leves (i) e pesados (ii). A sua análise permite constatar que, apesar da grande amplitude de resultados que já tivemos oportunidade de referir, é perceptível a existência de um padrão no perfil dos

compostos leves que é comum a quase todas as amostras, independentemente da região ou do produtor em causa. Mais ainda, verifica-se que a proporção de ACL, NA, AC, FL PHE, AN e FA é semelhante, independentemente do teor em PAH leves. Neste caso, a maior diferença resulta da presença em maiores quantidades do BaA e CHR nas amostras da zona geográfica de Trás-os-Montes.



**Figura 19.** Influência do produtor no perfil (expresso em %) e teor (expresso em µg/kg) em PAH leves (i) e pesados (ii) identificados no chouriço de carne.

No que se refere aos PAH pesados, todavia, são evidentes as diferenças na sua proporção quando as duas regiões são comparadas. Neste caso, o chouriço de carne Alentejano caracteriza-se por apresentar geralmente maiores teores relativos de BkFA e BaP,

comparativamente aos homólogos Transmontanos. De igual forma, o BbFA, DBahA e BghiP nos enchidos Transmontanos têm maiores contribuições comparativamente às amostras alentejanas.

### 2.3.3. Análise de risco

Uma outra vertente desta investigação envolveu a avaliação do risco associado à ingestão dos produtos analisados. O conhecimento do risco associado é, no nosso entender, especialmente relevante num país onde existe uma forte tradição de fabrico e consumo de enchidos tradicionais como acontece em Portugal.

Partindo deste princípio foi seguido o tipo de abordagem preconizado pela EFSA (2008b) para a análise do risco decorrente do consumo de alimentos contaminados com PAH e que se baseia na determinação da margem de exposição (em inglês *margin of exposure*, MOE). Este conceito equivale a uma “margem de segurança”, pelo que, quanto maior for o seu valor, menor será o risco associado. O valor de MOE é estimado através do rácio entre o valor da dose estimada necessária para causar uma incidência de 10% de tumores (em inglês designada por *benchmark dose lower confidence limit 10%*, BMDL<sub>10</sub>) e a ingestão diária. Sempre que o valor de MOE determinado for igual ou superior a 10000, estamos perante um alimento que representa um baixo risco para a saúde dos consumidores (EFSA, 2005).

Os valores de MOE, que constam da Tabela 14, foram determinados com base nos resultados médios de BaP e PAH4 obtidos para cada produto, bem como os valores de BMDL<sub>10</sub> estabelecidos pela EFSA (2008b) de 0,07 e 0,34 mg/kg pc/dia (BaP e PAH4, respectivamente).

A análise da Tabela 14 permite-nos concluir que os níveis de BaP encontrados em todos os produtos estão bem acima da margem de exposição recomendada, particularmente nos fabricados no Alentejo, donde se infere o baixo perigo que estes constituem para a saúde dos consumidores. O mesmo sucede com o indicador PAH4 nos enchidos fabricados no Alentejo. Uma situação diferente, porém, é constatada para o indicador PAH4 nos produtos Transmontanos, para os quais a margem de exposição determinada ficou aquém do limite de 10000 e que é indicativo de um potencial risco.

**Tabela 14.** Margens de exposição (MOE) estimadas para o BaP e indicador PAH4, associadas à ingestão dos vários produtos estudados.

	BaP (ng/g)	Ingestão diária <sup>1</sup> (ng/kg pc/dia)	MOE <sup>2</sup>	PAH4 (ng/g)	Ingestão diária (ng/kg pc/dia)	MOE
<b>Alentejo</b>						
<i>Chouriço de carne</i>	0,38	0,16	442105	3,88	1,62	210309
<i>Morcela</i>	0,32	0,13	525000	1,84	0,77	443478
<i>Cacholeira</i>	0,39	0,16	430769	5,47	2,28	149177
<i>Chouriço mouro</i>	0,25	0,10	674960	6,83	2,85	119473
<i>Painho</i>	0,63	0,26	266667	4,80	2,00	170000
<i>Paio de migos</i>	0,36	0,15	466667	3,48	1,45	234483
<b>Trás-os-Montes</b>						
<i>Chouriço de carne</i>	5,35	2,23	31392	298,33	124,31	2735
<i>Morcela</i>	2,02	0,84	82969	105,67	44,03	7722
<i>Moura</i>	5,65	2,36	29714	271,83	113,26	3002
<i>Alheira</i>	1,48	0,62	113556	101,42	42,26	8046
<i>Chouriço doce</i>	2,03	0,85	82786	86,76	36,15	9405
<i>Salpicão</i>	4,75	1,98	35368	294,50	122,71	2771

A vermelho são destacados os valores de MOE inferiores a 10000.

<sup>1</sup> Ingestão diária calculada considerando um consumo diário de 25 g por um indivíduo de 60 kg.

## 2.4. DISCUSSÃO

A fumaça desempenha um papel fundamental no fabrico de produtos de salsicharia tradicional. Através deste processo os produtos sofrem uma importante redução do seu teor inicial de água, necessária para a sua estabilização e segurança microbiológica. Simultaneamente, os produtos desenvolvem características sensoriais relacionadas com a cor, aroma, paladar e textura determinantes para a melhoria da qualidade e que são decisivos para a opção de compra por parte do consumidor. Em conjunto com os restantes componentes do fumo que intervêm benéficamente, os enchidos podem absorver quantidades assinaláveis de PAH, designadamente aqueles que estão envolvidos no desenvolvimento de tumores.

À semelhança de diversos trabalhos disponíveis na literatura acerca da contaminação de alimentos fumados com PAH (FSAI, 2006; Reinik *et al.*, 2007; Djinovic *et al.*, 2008a; Wretling *et al.*, 2010; Tjapkin e Sad, 2014; Rozentāle *et al.*, 2015) esta investigação teve como objectivo primordial avaliar a prevalência destes contaminantes em produtos de salsicharia tradicional portuguesa.

A opção por produtos fabricados nas regiões do Alentejo e Trás-os-Montes baseou-se no facto de estas serem duas das zonas que mais concorrem para o volume de enchidos processados a nível nacional, mas igualmente pelas tecnologias distintas seguidas em cada uma delas. Uma das diferenças é, precisamente, o regime de fumagem, factor determinante no que aos PAH diz respeito. Sabe-se que os produtos da zona geográfica de Trás-os-Montes, relativamente ao que acontece no Alentejo, são sujeitos a regimes de fumagem mais intensos, o que indiciava, desde logo, a forte probabilidade de os primeiros se apresentarem mais contaminados. Efectivamente, esta foi uma expectativa que se confirmou, como de resto se demonstra através dos resultados obtidos para o teor total de PAH, os grupos de PAH leves e PAH pesados, bem como para o indicador PAH4, que se revelaram consistentemente superiores nos enchidos Transmontanos. De notar, por exemplo, que o teor em PAH pesados nas amostras transmontanas foi superior em mais de 15 vezes àquele que foi registado nas amostras alentejanas. Mesmo no chouriço de carne, que se trata de um produto fabricado em ambas as regiões, foi possível identificar diferenças assinaláveis, com as amostras da região Norte a apresentarem cerca de três vezes mais PAH (teor total). As diferenças tornam-se ainda mais contundentes no caso dos PAH pesados e PAH4, assumindo-se desta forma como um potencial risco para o consumidor a ingestão destes produtos. Esta dedução é, aliás, corroborada pelas margens de exposição determinadas para o indicador PAH4. Neste caso, os teores mais elevados de BaA e CHR que, embora sejam considerados PAH leves são ambos cancerígenos, conduziram a um forte incremento do conjunto PAH4. Tais resultados alertam para a necessidade de se investigarem objectivamente as causas que estão na origem destes níveis de contaminação e, mediante isso, implementar as alterações necessárias à redução do nível de PAH. Um outro aspecto que nos parece importante referir resulta do facto de, frequentemente, depois de adquiridos, os produtos serem novamente expostos à acção do fumo (por exemplo, nas lareiras) em casa dos consumidores, que contribuirá para incrementar os níveis de contaminação, por si só, já elevados. Monteiro *et al.* (1983) referiu-se precisamente a este aspecto, salientando que a fumagem realizada em casa pelos consumidores carece frequentemente do arejamento necessário, contribuindo para incrementar a acumulação de PAH.

De entre os produtos da região de Trás-os-Montes, a alheira assume especial importância pois representa um símbolo cuja produção é característica desta zona geográfica. Trata-se de um enchido que pelas suas características não carece de períodos de fumagem prolongados, não mais de 8 dias, apenas o suficiente para alcançar a sua cor dourada típica e alguma estabilidade microbiológica à superfície. Apesar deste facto, foram encontradas quantidades apreciáveis de PAH pesados e do indicador PAH4, ambos muito acima dos níveis registados nos produtos Alentejanos.

Além do risco que elevados teores em BaP e PAH4 representam para a saúde dos consumidores, a sua importância prende-se também com o facto de estes estarem limitados pela regulamentação comunitária actualmente em vigor (CE, 2011a), segundo a qual os níveis do primeiro não podem exceder 2 µg/kg, enquanto o máximo admissível do segundo é de 12 µg/kg.

No que respeita aos enchidos obtidos junto de produtores da região do Alentejo, estes limites foram sempre cumpridos, com excepção das amostras de chouriço mouro, onde se registaram em média 13,57 µg/kg para o PAH4. Resultados semelhantes para estes compostos (BaP e PAH4) em produtos cárneos fumados foram também reportados por diversos autores (Pöhlmann *et al.*, 2012; Hitzel *et al.*, 2013; Tjapkin e Sad, 2014; Rozentāle *et al.*, 2015). Comparativamente aos estudos conduzidos por Elias *et al.* (2014) e Roseiro *et al.* (2011) em amostras de painho, os níveis de BaP e PAH4 agora reportados revelaram-se sempre inferiores. Relativamente aos produtos Transmontanos os teores de BaP ultrapassaram repetidamente o limite permitido, verificando-se apenas algumas excepções pontuais encontradas em algumas amostras de chouriço de carne e moura (todas do mesmo produtor). A alheira foi, de resto, o único produto em que a maioria das amostras não ultrapassou o patamar de 2 µg/kg. Quanto ao indicador PAH4, todas as amostras, sem excepção, apresentaram níveis de contaminação superiores aos admissíveis. No seu trabalho, Fasano *et al.* (2016) também encontraram diversas amostras cujos teores de BaP e PAH4 superaram os limites impostos por lei. De acordo com aqueles autores estes compostos permaneceram maioritariamente retidos na tripa, pelo que a sua remoção antes do consumo eliminaria na quase totalidade o risco de ingestão destes compostos. No caso das amostras de produtos Transmontanos, um procedimento idêntico permitiria reduzir o teor em BaP e PAH4 em cerca de 40%, uma medida positiva, mas ainda assim insuficiente para que os limites legais fossem cumpridos.

As causas para diferenças tão marcadas nos resultados de PAH estarão relacionadas principalmente com o processo de secagem seguido em cada uma das regiões, particularmente, no que diz respeito à fumagem dos produtos. No Alentejo aquele processo desenrola-se parcialmente em câmaras de ambiente controlado, sendo depois fumados por períodos relativamente curtos. Na zona geográfica do Norte de Portugal, por sua vez, o processo de desidratação decorre continuamente em fumeiro, pelo que as amostras se encontram expostas ao fumo por períodos mais prolongados, facto que se reflecte inevitavelmente nos níveis de PAH acumulados. Sabe-se também da importância da selecção da madeira utilizada (Aurore *et al.*, 2000; Guillén *et al.*, 2000c; Stumpe-Vīksna *et al.*, 2008a; Hitzel *et al.*, 2013). Como referem Stumpe-Vīksna *et al.* (2008a), as madeiras macias contêm elevados teores de resinas, que durante a combustão geram quantidades assinaláveis de fuligem e podem, desta forma, contaminar os produtos com maiores quantidades de PAH, por essa razão a sua utilização deve ser preterida em detrimento das madeiras duras. Por outro lado, mesmo entre as madeiras duras o perfil de PAH pode ser muito variável como o constataram Stumpe-Vīksna *et al.* (2008a) e Hitzel *et al.* (2013). Roseiro *et al.* (2011) e Stumpe-Vīksna *et al.* (2008b) realçaram ainda a importância do posicionamento dos produtos dentro do fumeiro. Segundo estes autores, o fumo não se distribui de forma homogénea no interior da câmara, pelo que diferenças nos teores de PAH podem daí advir. Outros aspectos, igualmente importantes, têm que ver com a humidade, a temperatura, a produção de chama e a combustão de gordura derretida a partir dos enchidos sobre a fogueira que em conjunto conduzem à formação de perfis de PAH muito diferenciados,

e que irão inevitavelmente contaminar os produtos (McGrath *et al.*, 2003; García-Falcón e Simal-Gándara, 2005; Šimko, 2005; Pöhlmann *et al.*, 2012; Bansal e Kim, 2015).

Se, por um lado, a tecnologia de fumagem determina o tipo e a quantidade de PAH gerados e a sua distribuição dentro da câmara, por outro lado, as características específicas das amostras intervêm na dinâmica de adsorção e/ou absorção destes compostos. Em todo o caso, não é possível apontar uma característica em particular como a principal causa, mas antes uma complexa interacção de factores que concorrem entre si. Muito embora este seja um estudo de incidência, foi feita uma tentativa no sentido de tentar relacionar os níveis de PAH determinados com as características das amostras. O diâmetro foi umas das características avaliadas. Durante a fase de secagem as trocas de humidade com o ambiente ocorrem maioritariamente nas camadas superficiais dos produtos, o que determina que a velocidade de desidratação seja, invariavelmente, mais elevada à superfície e mais lenta no seu interior, sendo por isso necessários períodos de cura mais extensos quando se trata de enchidos de maior calibre. Por esta razão a permanência no fumo dos enchidos de maior calibre também é mais prolongada, sujeitando os produtos a tempos de exposição mais extensos aos diversos componentes do fumo, entre os quais os PAH. Este facto justifica assim o maior grau de acumulação que se registou nos produtos de maior calibre, como o que sucedeu para o paio de migos e para o salpicão. Seguindo esta lógica, seria expectável que as amostras com diâmetro intermédio apresentassem níveis de contaminantes superiores aos enchidos mais finos, mas inferiores aos de calibre superior. Tendo em consideração os resultados obtidos para os enchidos com calibre intermédio, percebe-se que esta suposição não se confirmou. Isto porque as amostras de painho (as únicas incluídas neste estudo com 4 cm de diâmetro) registaram níveis de PAH frequentemente inferiores a alguns produtos de menor calibre, designadamente a cacholeira e o chouriço mouro do Alentejo, ou até mesmo do chouriço de carne Transmontano, muito provavelmente devido ao menor tempo de exposição ao fumo do painho (note-se que de um modo geral as práticas seguidas na região do Alentejo proporcionaram menores teores de PAH). Estes resultados são, assim, reveladores da interacção que existe entre os diversos factores que contribuem para a presença destes compostos nos alimentos, e nos produtos de salsicharia em particular (Ledesma *et al.*, 2014). Apesar disto, existem outras variáveis que podem afectar positiva ou negativamente a quantidade de PAH acumulada nos produtos. Uma delas prende-se com a superfície de exposição. Comparativamente ao painho, por exemplo, os enchidos de menor diâmetro e em forma de ferradura possuem maior área de exposição, facto que permite maior acumulação num espaço de tempo mais curto. Adicionalmente, no conjunto das amostras de menor calibre encontram-se enchidos com características muito diversificadas nomeadamente no que se refere ao teor de gordura e à sua composição que, como veremos no decurso do Capítulo 3, podem desempenhar um papel de relevo na acumulação de PAH.

Um outro aspecto importante poderá estar ainda relacionado com a composição dos produtos, isto é, quando estes são produzidos à base de sangue ou carne. Os resultados demonstram que os PAH pesados e aqueles que integram o indicador PAH4 se acumularam maioritariamente nos

produtos à base de carne. O mesmo sucede quando apenas os produtos de menor calibre são considerados, no entanto, nesta situação foi possível identificar que tanto o teor total como o conjunto de PAH leves se tendem a superiorizar nos produtos à base de sangue. Efectivamente esta tendência torna-se perceptível quando o teor total de PAH no chouriço de carne (Alentejo) é comparado com a morcela (Alentejo), a cacholeira e o chouriço mouro. O mesmo se verificou para o chouriço de carne Transmontano e a moura. Por outro lado, foi ainda possível verificar uma maior taxa de migração dos PAH da superfície para as camadas internas nestes produtos. A razão por que tal acontece não é totalmente clara, todavia existem dois aspectos que poderão ter sido determinantes para explicar tanto os teores mais elevados como a maior migração verificada. O primeiro tem que ver com o facto de estes produtos serem colocados por cima da origem do fumo a fim de atingirem temperaturas mais elevadas e, com elas o efeito de pasteurização. Em segundo lugar, os produtos à base de sangue apresentam habitualmente maiores quantidades de gordura. Em virtude da natureza lipofílica dos PAH, estes podem redundar em níveis de contaminação superiores nos enchidos mais ricos em gordura, algo que, de resto, é extensivamente suportado pela literatura existente sobre esta matéria (Moret e Conte, 2000; García-Falcón e Simal-Gándara, 2005; Arrebola *et al.*, 2006; Perelló *et al.*, 2009; Martorell *et al.*, 2010; Pöhlmann *et al.*, 2013), pese embora o facto de, a partir dos nossos resultados, essa relação não se ter revelado significativa.

No que diz respeito à distribuição dos PAH entre a tripa e a massa dos enchidos, a análise dos resultados demonstra que esta não é homogénea. Considerando apenas os produtos da região do Alentejo, percebe-se a existência de um padrão, em que o grau de difusão dos PAH no interior dos produtos diminui progressivamente com o aumento do seu peso molecular. Claramente, os contaminantes de menor peso molecular foram os que mais atravessaram a tripa, acumulando-se preferencialmente no interior dos produtos; pelo contrário, alguns PAH pesados ficaram frequentemente retidos na tripa. O BaA e o CHR, com peso molecular intermédio, encontram-se distribuídos entre estes dois elementos de forma quase equitativa. Nos produtos da zona geográfica do Norte, contudo, este mesmo padrão não é tão perceptível. Apesar de se ter verificado um maior grau de acumulação dos PAH leves (particularmente o ACL, NA, AC, FL, PHE e AN), para os restantes a distribuição entre a tripa e o interior foi de aproximadamente 40 para 60%, pela mesma ordem. Neste caso apenas o IP se revelou uma excepção. Durante a fumagem dos produtos, estes são envolvidos pelo fumo dando lugar à deposição dos PAH, numa fase inicial, acumulando-se na tripa e na camada imediatamente abaixo, difundindo-se, a partir daqui, para o interior dos enchidos (Šimko, 2005). Neste contexto, o tipo de tripa exerce uma influência determinante, pois as suas características interferem tanto com a aderência dos PAH à superfície, como com a sua passagem para o interior dos produtos. A este respeito Djinovic *et al.* (2008a) e García-Falcón e Simal-Gándara (2005) haviam já reportado resultados a confirmar aquela difusão dos compostos. Mais recentemente, Ledesma *et al.* (2014) relacionaram o grau de difusão do BaP com o processo de fumagem e secagem propriamente dito. Na opinião destes autores, após seis dias de fumagem os componentes do fumo formam uma barreira protectora

que impede a passagem do BaP pela tripa. Como tal, a sua absorção só terá lugar caso se verifique a fragilização da tripa decorrente, por exemplo, de períodos de secagem excessivos.

## 2.5. CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo de incidência permitem, em primeiro lugar, perceber a forma como a grande diversidade das práticas seguidas pelos vários fabricantes se pode reflectir na contaminação dos produtos com PAH, em particular quando se trata de produtores de zonas geográficas distintas. Claramente, os produtos Transmontanos distinguiram-se pelos elevados níveis de contaminação em oposição aos enchidos Alentejanos. Neste sentido, os resultados apresentam, para os primeiros, um cenário preocupante em virtude da presença de grandes quantidades de PAH carcinogénicos e que, na nossa opinião, se devem inteiramente às condições de fumagem. Esta é uma situação que poderá ser colmatada através da revisão integral dos procedimentos relativos à secagem e/ou fumagem, com o intuito de reduzir drasticamente os níveis de contaminantes, em especial daqueles que apresentam actividade carcinogénica, como forma de proteger os consumidores. O melhor arejamento do fumeiro, ou um regime de fumagem indirecto (que será tratado no Capítulo 3) e períodos de fumagem mais curtos são algumas das possibilidades. Compreensivelmente, este tipo de alterações poderá representar um esforço considerável devido às práticas tecnológicas enraizadas e aos hábitos de consumo desta região. Todavia, importa salientar que, tal como atestam os resultados obtidos para as amostras procedentes do Alentejo, o fabrico de produtos de salsicharia tradicional com baixos teores de PAH é possível, sem prejuízo para a sua qualidade.

Por outro lado, os resultados obtidos revelam a necessidade de dar continuidade a esta investigação, nomeadamente através da caracterização do perfil de PAH em produtos de outros fabricantes e de outras regiões além das que aqui foram abordadas.

### 3.

#### EFEITO DO TEOR DE GORDURA, TIPO DE TRIPA E REGIME DE FUMAGEM NO TEOR EM PAH EM PRODUTOS DE SALSICHARIA

---

*Adaptado de:*

**Gomes, A., Santos, C., Almeida, J., Elias, M., & Roseiro, L. C. (2013).** Effect of fat content, casing type and smoking procedures on PAHs contents of Portuguese traditional dry fermented sausages. *Food and Chemical Toxicology*, *58*, 369-374.

### 3.1. INTRODUÇÃO

O grau de contaminação dos alimentos com PAH varia consideravelmente em função das suas características intrínsecas bem como das condições de processamento. Apesar de os PAH se acumularem maioritariamente à superfície dos produtos, devido à sua natureza lipofílica, eles podem difundir-se para as camadas interiores (Šimko, 2005). A velocidade da migração é, por sua vez, determinada pela actividade da água e pelo teor de gordura dos produtos (Martorell *et al.*, 2010). Ainda neste contexto, a presença de barreiras constitui também um factor determinante (García-Falcón e Simal-Gándara, 2005). Exemplos disso são a tripa e a pele, que existem no chouriço de carne e no bacon, respectivamente. Ambos constituem um obstáculo à penetração dos PAH, interferindo desta forma com a sua migração para as camadas internas dos produtos (Djinovic *et al.*, 2008a).

A presença de PAH em produtos de salsicharia, e no chouriço de carne em particular, surge com a exposição ao fumo, cuja composição varia consideravelmente em função do tipo de madeira utilizado e da humidade nela contida. A quantidade de oxigénio disponível e a temperatura de combustão influenciam também de forma decisiva a quantidade e perfil de PAH encontrados (Guillén *et al.*, 2000c). As elevadas temperaturas de combustão (Maga, 1988) e a utilização de madeiras inadequadas, como as madeiras macias (Guillén *et al.*, 2000c; Stumpe-Vīksna *et al.*, 2008a), são reconhecidos como os principais factores responsáveis pela acumulação de PAH com 5 ou mais anéis aromáticos (McGrath *et al.*, 2003), habitualmente designados por PAH pesados. Pela sua estabilidade e toxicidade, este conjunto de PAH são particularmente preocupantes comparativamente aos PAH leves (Wenzl *et al.*, 2006; Plaza-Bolaños *et al.*, 2010). Com vista à redução desses compostos indesejáveis, têm vindo a ser desenvolvidas estratégias alternativas às comumente praticadas, como é o caso do controlo da localização dos produtos no fumo (Roseiro *et al.*, 2011). Uma outra opção consiste na utilização de geradores de fumo externos, em que o fumo é filtrado e os PAH removidos, previamente à sua introdução na câmara de fumagem (Duedahl-Olesen *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2010).

Devido às trocas que podem ocorrer entre o material que a compõem e os alimentos (Šimko *et al.*, 2004), a embalagem é assumidamente um aspecto fulcral, no que respeita à sua qualidade e segurança. Muito embora este facto tenha habitualmente uma conotação negativa, sabe-se actualmente que o filme das embalagens tem a capacidade para absorver compostos indesejáveis, designadamente os PAH (Šimko, 2005). Neste âmbito têm sido publicados diversos estudos que demonstram que alguns tipos de embalagem, como as PET (*polyethylene terephthalate*, politereftalato de etileno) e as LDPE (*low density polyethylene*, polietileno de baixa densidade), podem contribuir positivamente para a remoção dos PAH a partir da matriz dos alimentos (Chen e Chen, 2005; Šimko *et al.*, 2006).

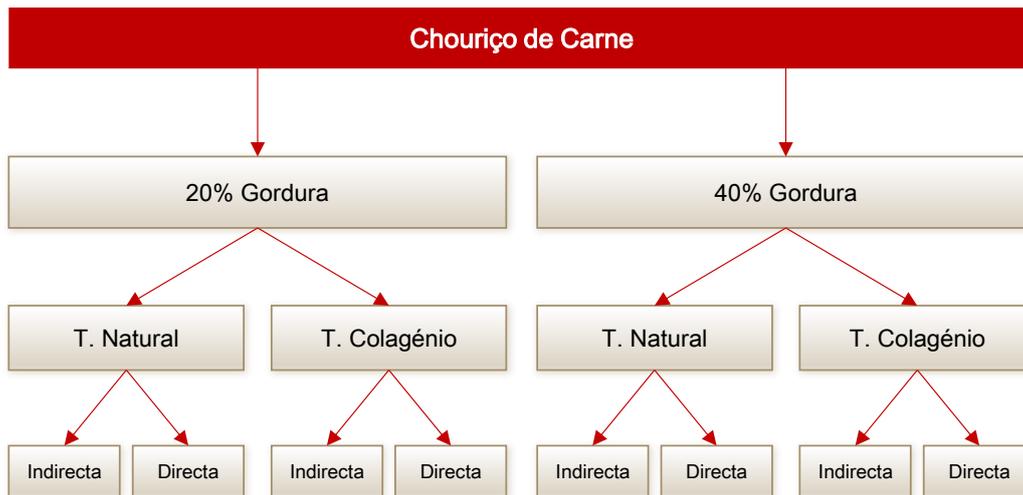
Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA), a carne e os produtos cárneos são uma das categorias que mais contribuem para a exposição alimentar dos consumidores europeus aos PAH (EFSA, 2008b). Estudos desenvolvidos em produtos de salsicharia nacional revelaram níveis de contaminação com benzo[*a*]pireno (BaP) reduzidos (Roseiro *et al.*, 2011; Elias *et al.*, 2014). Também a nível europeu, as análises de produtos cárneos têm evidenciado a presença destes contaminantes em quantidades inferiores a 5 µg/kg (EFSA, 2008a). No entanto, maiores níveis de PAH como os reportados no capítulo anterior podem ocorrer o que, ao somar ao consumo frequente de produtos de salsicharia, pode representar a ingestão de quantidades apreciáveis deste composto.

A investigação considerada neste capítulo teve, por isso, como principal objectivo avaliar a influência de várias alternativas ao processo de fabrico de produtos de salsicharia portugueses, com vista à redução dos níveis de PAH encontrados nesses produtos. Para o efeito foram considerados dois factores entendidos como primordiais: o teor de gordura e o tipo de tripa. Por outro lado, considerando que é frequente a utilização de um obstáculo metálico por parte dos produtores (como forma de prevenir a ocorrência de incêndios provocados pela escorrência de gordura dos produtos sobre a chama), foram testados dois regimes de fumagem. Por fim, foi ainda estudado o efeito da embalagem dos produtos obtidos sobre os níveis de PAH, tanto num modelo líquido como no chouriço de carne.

## 3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental do presente trabalho pode ser dividido em duas grandes vertentes: por um lado avaliar a influência do processamento tecnológico do chouriço de carne na acumulação de PAH e por outro estudar a evolução destes contaminantes químicos ao longo do armazenamento dos produtos. Para o estudo relativo à tecnologia de processamento, tal como se apresenta na Figura 20, foram testados dois teores de gordura (20 e 40%), dois tipos de tripa (natural e colagénio), bem como dois regimes de fumagem (exposição indirecta e directa ao fumo). No que respeita ao armazenamento foram estudadas duas temperaturas: temperatura ambiente (20 °C) e refrigeração (4 °C). Adicionalmente foi levado a cabo um ensaio-piloto onde foi avaliada a remoção dos PAH a partir do meio líquido para a embalagem. Assim, testaram-se dois meios líquidos com polaridades distintas, água e azeite, que foram conservados às mesmas temperaturas usadas para o armazenamento do chouriço de carne (4 e 20 °C).



**Figura 20.** Delineamento experimental para o processamento de chouriço de carne para análise da influência do teor de gordura, tipo de tripa e regime de fumagem.

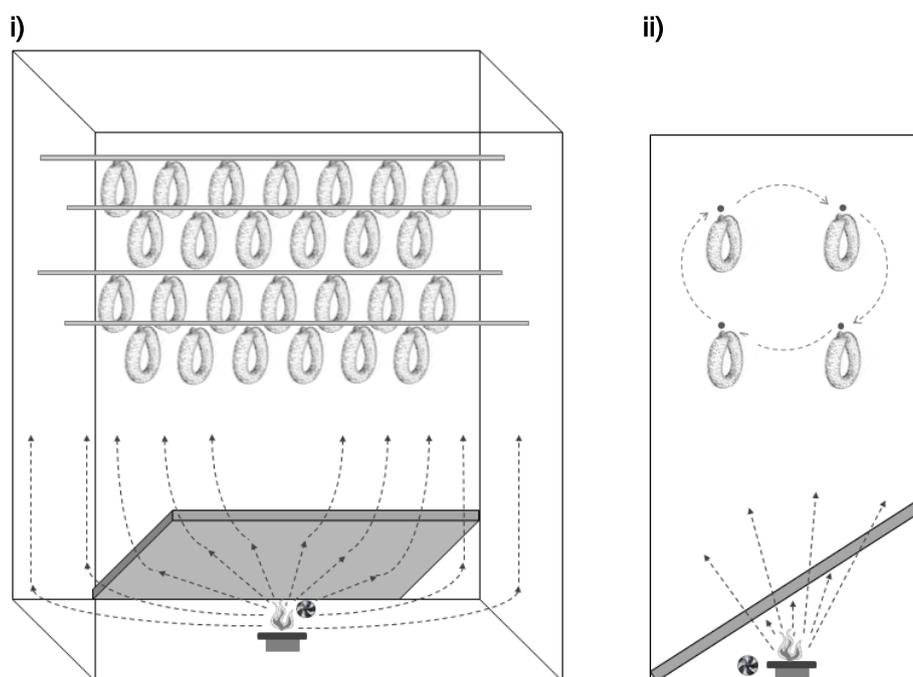
### 3.2.2. Produção de chouriço de carne à escala piloto

O chouriço de carne foi produzido com recurso a equipamento à escala piloto. Após a picagem da carne e da gordura (adquiridas no mercado), foram adicionados os restantes ingredientes: massa de pimentão (3,5%), massa de alho (3%), água (2,5%), sal (1%), sais nitritados Palatinata Cure (0,25%) que continham na sua composição  $\text{NaNO}_3$  (4,9%) e  $\text{KNO}_2$  (5%), e antioxidante Jabarot (0,15%).

A secagem do chouriço de carne decorreu alternadamente em câmara de ambiente controlado (6 °C e 80% de humidade relativa) e em câmara de fumagem (com produção de fumo controlada) onde os produtos permaneciam por períodos de 4h/dia. Esta fase prolongou-se por um período de sensivelmente 8 dias, até que fossem atingidas aproximadamente 35% de quebras no teor de humidade do produto.

A distinção entre os dois regimes de fumagem, indirecto e directo, foi feita utilizando no primeiro caso uma barreira, que consistiu numa chapa de aço inoxidável, colocada de forma a cobrir a placa sobre a qual ocorria a combustão da madeira e, assim, impedir a ascensão directa do fumo (Figura 21 i). O fumo foi gerado, sem produção de chama, a partir de madeira de azinho (*Quercus ilex L.*). Por forma a assegurar a igual exposição de todos os produtos ao fumo, a localização das varas dentro da câmara foi diariamente alterada de acordo com o esquema representado na Figura 21 ii). Imediatamente após a conclusão do processamento, os produtos foram embalados sob vácuo em sacos Cryovac BB4L (LDPE) termossoldados. Estes sacos são habitualmente utilizados para a embalagem e conservação de produtos de salsicharia tradicional na unidade onde foi conduzido o presente estudo. Foram considerados três momentos de análise, produto final (“PF”) e após 1 e 3 meses de armazenamento (“1M” e “3M”, respectivamente). Durante o período de armazenamento, com o objectivo de avaliar o efeito da temperatura na evolução dos

teores de PAH, metade das amostras foram conservadas à temperatura ambiente e a outra metade mantida sob refrigeração. Em ambos os casos, as amostras foram mantidas ao abrigo da luz, para impedir a fotodegradação dos PAH. Depois de se ter procedido à colheita das amostras, estas foram congeladas e conservadas a uma temperatura de -80 °C até ao momento da sua análise.



**Figura 21.** Representação gráfica do posicionamento das varas com os enchidos, placa de aquecimento (fonte de calor), ventoinha e barreira de inox (utilizada apenas na fumagem indirecta) na câmara de fumagem: i) vista frontal, ii) vista lateral.

### 3.2.3. Extracção e análise cromatográfica dos PAH no chouriço de carne

Os procedimentos analíticos seguidos para a determinação dos PAH em estudo (no invólucro e na massa do enchido) encontram-se descritos em detalhe na secção 2.2.3 do presente trabalho. A quantificação de PAH no produto inteiro teve por base a contribuição relativa da tripa (entre 1 e 2%) e da massa do enchido.

### 3.2.4. Preparação e embalagem das amostras de água e azeite contaminadas com PAH

Para que a superfície de contacto fosse idêntica entre todas as amostras foram preparados pequenos sacos quadrados de LDPE Cryovac BB4L, com 10 x 10 cm, medidos pelo interior da termosoldadura. Cada um dos sacos continha 50 g de água ou 50 g de azeite previamente adicionados de 250 µL de solução-mãe da mistura de PAH. A solução-mãe continha 0,25 µg de antraceno (AN); 0,50 µg de fluoranteno (FA); 0,25 µg de pireno (PY); 0,25 µg de benz[*a*]antraceno (BaA); 0,25 µg de criseno (CHR); 0,25 µg de benzo[*b*]fluoranteno (BbFA);

0,25 µg de benzo[*k*]fluoranteno (BkFA); 0,25 µg de benzo[*a*]pireno (BaP); 0,50 µg de dibenzo[*a,h*]antraceno (DBahA) e 0,50 µg de benzo[*ghi*]perileno (BghiP).

Depois de devidamente selados, os sacos com o meio líquido contaminado foram conservados ao abrigo da luz a 4 e 20 °C, até à determinação dos PAH que ocorreu após 1h, 2h, 24h (1 dia), 48h (2 dias), 96h (4 dias), 216h (9 dias), 384h (16 dias), 720h (30 dias). O “t = 0” correspondeu, no meio líquido, à água ou azeite imediatamente após a sua contaminação. No que respeita à embalagem, o “t = 0” correspondeu ao filme de LDPE sem que este tenha contactado com o meio líquido contaminado com os PAH. Cada uma das amostras foi preparada em triplicado, correspondendo, no total, a 48 amostras para a água e um número idêntico para o azeite.

### **3.2.4. Extração e análise cromatográfica dos PAH contidos no meio líquido e na embalagem**

Para a determinação dos PAH no meio apolar (azeite) foram saponificados cerca de 4 g de azeite, de acordo com os procedimentos já descritos na secção 2.2.3. Já para a fracção polar (água), cerca de 25 g de água foram extraídos com três porções de 50 mL de h-hexano (Panreac, Espanha). Previamente à análise das embalagens, para aquelas que continham a água contaminada, foram secas com papel absorvente e de seguida cortadas em pequenos pedaços, com cerca de 1 cm. A extração foi feita, em triplicado, com 150 mL de n-hexano sob agitação durante 2h. Após este período, o extracto contendo os PAH foi filtrado (para remover os pedaços de filme) e evaporado. Em qualquer dos casos, o resíduo resultante foi ressuscitado em 3 mL de acetoneitrilo (Panreac, Espanha) para posterior análise no sistema HPLC, de acordo com as condições descritas na mesma secção do presente trabalho. Relativamente às embalagens LDPE utilizadas para armazenar o azeite, estas não foram analisadas, devido à dificuldade em remover toda a gordura aderida à superfície da embalagem, facto que poderia comprometer os resultados obtidos, ou até mesmo danificar a coluna utilizada para a separação cromatográfica.

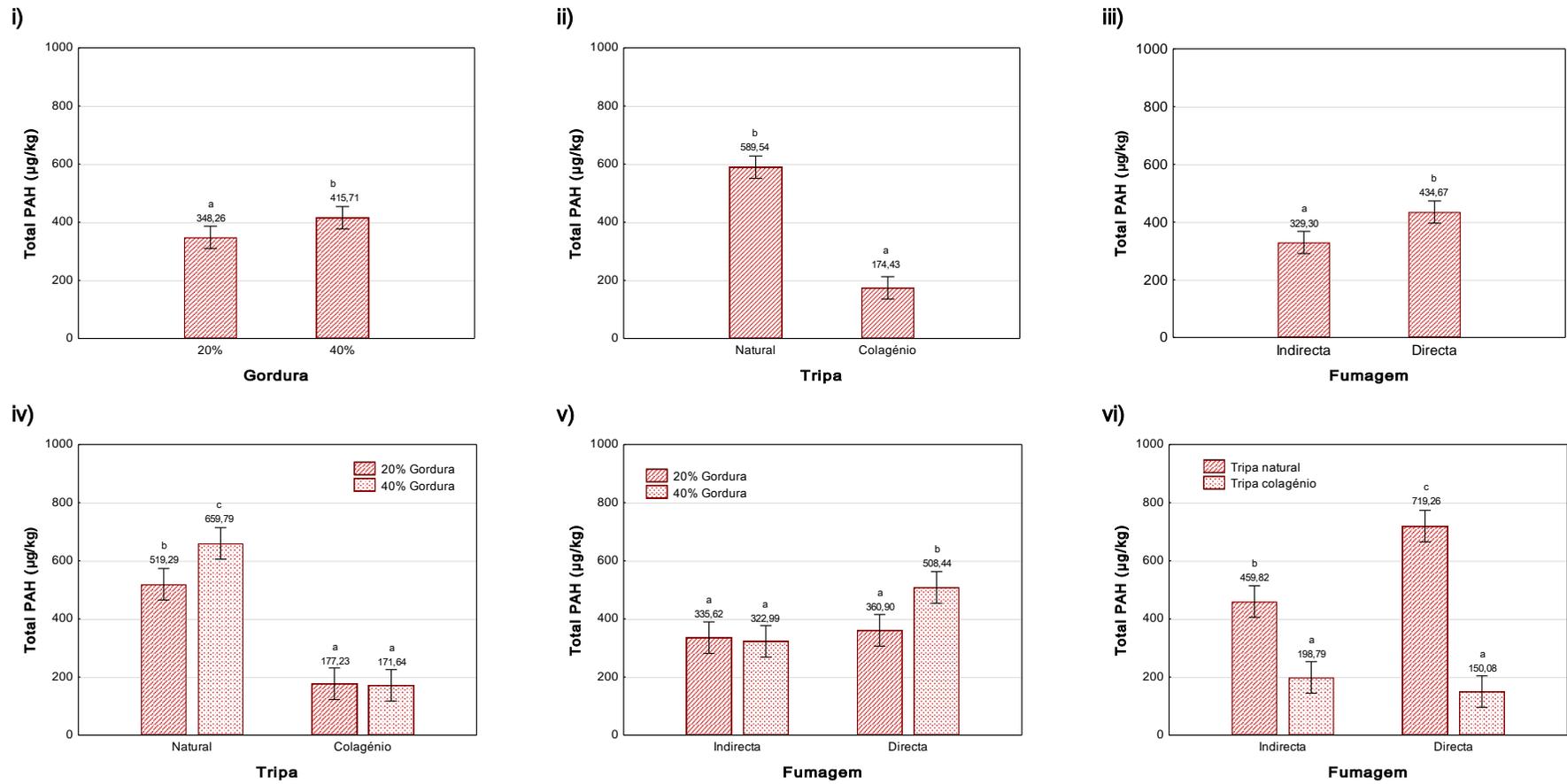
### **3.2.5. Análise estatística**

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi realizado por meio de análise de variância (Factorial ANOVA) com o *software* Statistica 10 (StatSoft Inc, 1984-2011). As diferenças entre amostras foram determinadas de acordo com o teste de Tukey (*Honest Significant Difference*, HSD) ajustado para um nível de significância de 0,05. Os parâmetros avaliados foram relacionados entre si por meio de correlações de Pearson, igualmente ajustadas para um nível de significância de 0,05.

## 3.3. RESULTADOS

### 3.3.1. Perfil de PAH em chouriço de carne

Na Figura 22 são apresentados os resultados relativos à influência dos factores isolados testados e respectivas interacções sobre o total de PAH. Considerando apenas os factores individuais, verificou-se que quer o teor de gordura, tipo de tripa ou regime de fumagem, revelaram exercer uma influência significativa ( $p < 0,05$ ) nos níveis de contaminação (Figura 22 i, ii, iii; Tabela A.1 do Apêndice) detectados. O tipo de tripa foi, no entanto, o mais preponderante tendo conduzido às maiores discrepâncias entre resultados. No que ao tipo de invólucro diz respeito, verificou-se que independentemente da quantidade de gordura adicionada e do processo de fumagem implementado, a tripa de colagénio foi a que mais contribuiu para a redução do teor total de PAH. Como se observa pela Figura 22 ii) e pela Tabela A.1 (cf. Apêndice), a produção de chouriço de carne com tripa de colagénio permitiu em média reduzir o teor total de PAH em cerca de três vezes, comparativamente aos produtos fabricados com a tripa natural. No produto inteiro (tripa + interior) com elevado teor de gordura e sujeito a fumagem directa, o teor total de PAH médio variou de 147,23 a 869,66  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 23), sendo que a principal causa para uma variação tão alargada se ficou a dever ao efeito da tripa. No final do processamento as amostras com invólucro de colagénio foram as que, manifestamente, apresentaram os menores teores totais de PAH, com valores entre 147,23 e 201,53  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 23). A influência do tipo de tripa foi transversal aos três grupos de PAH considerados: PAH leves (com excepção do BaA), PAH pesados e indicador PAH4. Os produtos fabricados com baixo teor de gordura e tripa natural, por exemplo, registaram 468,63 e 567,41  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de PAH leves (fumagem indirecta e directa, respectivamente), enquanto os seus homólogos com tripa de colagénio não foram além de 201,33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabela 15). Para estes mesmos produtos, a tripa de colagénio permitiu uma redução ( $p < 0,05$ ) do nível de PAH pesados de 1,09 para 0,20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  quando sujeitos a um regime de fumagem indirecto, e de 1,46 para 0,71  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , no caso em que estiveram expostos directamente à origem do fumo. Relativamente a este conjunto de PAH, verificou-se uma única excepção nas amostras com 40% de gordura e fumagem indirecta (Tabela 15) que se ficou a dever à presença de DBaA em maiores quantidades (cerca do dobro). Apesar dos PAH pesados terem sido analisados tanto na tripa como no interior dos produtos (mistura de carne e gordura), para o segundo, estes ocorreram sempre em níveis abaixo do limite de quantificação. Para tal, contribuiu o facto de os PAH depositados à superfície dos produtos, durante a fase de secagem/fumagem, migrarem para as camadas internas em concentrações inferiores.



**Figura 22.** Efeito dos factores principais e respectivas interacções de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores em PAH (µg/kg) determinados no chouriço de carne.

Barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 0,95. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

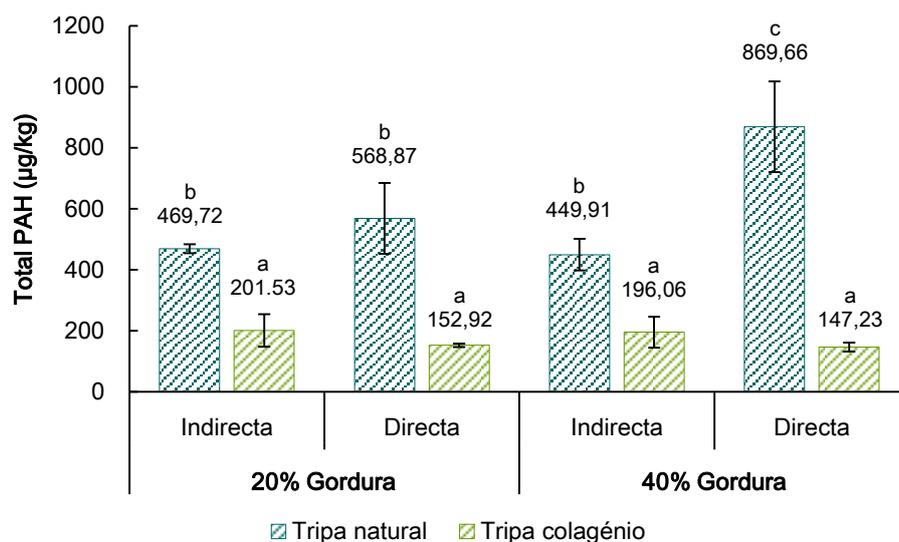
(i) Gordura, (ii) Tripa, (iii) Fumagem, (iv) Gordura x Tripa, (v) Gordura x Fumagem e (vi) Fumagem x Tripa (vi).

**Tabela 15.** Teores médios em PAH (em µg/kg, sob a forma média ± DP) no chouriço de carne.

	20% Gordura				40% Gordura			
	<i>T. natural</i>		<i>T. colagénio</i>		<i>T. natural</i>		<i>T. colagénio</i>	
	Indirecta	Directa	Indirecta	Directa	Indirecta	Directa	Indirecta	Directa
<i>ACL</i>	177,45 <sup>b,c</sup> ± 8,40	272,46 <sup>c,d</sup> ± 46,88	130,67 <sup>a,b</sup> ± 55,42	53,08 <sup>a</sup> ± 4,15	146,45 <sup>a,b</sup> ± 24,32	342,20 <sup>d</sup> ± 57,99	85,44 <sup>a,b</sup> ± 9,25	42,67 <sup>a</sup> ± 0,37
<i>NA</i>	102,45 <sup>b</sup> ± 0,85	90,35 <sup>a,b</sup> ± 21,72	22,17 <sup>a</sup> ± 8,75	28,80 <sup>a,b</sup> ± 0,03	93,43 <sup>a,b</sup> ± 1,69	246,10 <sup>c</sup> ± 62,84	43,11 <sup>a,b</sup> ± 20,09	38,98 <sup>a,b</sup> ± 7,67
<i>AC</i>	57,26 <sup>b</sup> ± 1,72	64,16 <sup>b,c</sup> ± 8,34	15,83 <sup>a</sup> ± 2,94	23,48 <sup>a</sup> ± 0,57	76,95 <sup>c</sup> ± 4,63	117,77 <sup>d</sup> ± 3,90	22,36 <sup>a</sup> ± 4,14	20,23 <sup>a</sup> ± 2,32
<i>FL</i>	70,89 <sup>b</sup> ± 2,13	71,17 <sup>b</sup> ± 10,41	10,99 <sup>a</sup> ± 2,35	17,55 <sup>a</sup> ± 0,27	74,34 <sup>b</sup> ± 6,54	99,26 <sup>c</sup> ± 2,45	16,37 <sup>a</sup> ± 4,41	16,00 <sup>a</sup> ± 0,40
<i>PHE</i>	28,86 <sup>d</sup> ± 0,19	32,05 <sup>d</sup> ± 1,63	8,40 <sup>a</sup> ± 0,04	11,82 <sup>b</sup> ± 0,27	25,36 <sup>c</sup> ± 1,30	29,19 <sup>d</sup> ± 2,16	9,11 <sup>a,b</sup> ± 0,27	9,13 <sup>a,b</sup> ± 0,33
<i>AN</i>	3,32 <sup>b</sup> ± 0,02	4,18 <sup>c</sup> ± 0,21	0,75 <sup>a</sup> ± 0,00	1,16 <sup>a</sup> ± 0,03	3,33 <sup>b</sup> ± 0,21	5,68 <sup>d</sup> ± 0,55	0,82 <sup>a</sup> ± 0,03	0,74 <sup>a</sup> ± 0,03
<i>FA</i>	10,51 <sup>c</sup> ± 0,17	12,54 <sup>d</sup> ± 0,36	4,05 <sup>a</sup> ± 0,05	5,69 <sup>a</sup> ± 0,02	11,39 <sup>c,d</sup> ± 0,67	7,90 <sup>b</sup> ± 1,39	5,38 <sup>a</sup> ± 0,08	4,61 <sup>a</sup> ± 0,25
<i>PY</i>	12,01 <sup>b,c</sup> ± 0,08	13,79 <sup>c</sup> ± 0,48	4,40 <sup>a</sup> ± 0,06	6,23 <sup>a</sup> ± 0,10	10,08 <sup>b</sup> ± 0,56	10,73 <sup>b</sup> ± 1,65	5,75 <sup>a</sup> ± 0,06	5,40 <sup>a</sup> ± 0,23
<i>BaA</i>	1,99 <sup>a</sup> ± 0,03	2,18 <sup>a</sup> ± 0,11	3,49 <sup>a</sup> ± 0,27	3,30 <sup>a</sup> ± 0,07	6,30 <sup>b,c</sup> ± 0,27	7,92 <sup>c</sup> ± 1,23	5,73 <sup>b</sup> ± 1,08	7,40 <sup>b,c</sup> ± 0,16
<i>CHR</i>	3,88 <sup>e</sup> ± 0,07	4,52 <sup>f</sup> ± 0,17	0,57 <sup>a</sup> ± 0,02	1,10 <sup>b</sup> ± 0,22	1,58 <sup>c,d</sup> ± 0,00	1,89 <sup>d</sup> ± 0,12	1,01 <sup>a,b</sup> ± 0,04	1,27 <sup>b,c</sup> ± 0,16
<i>BbFA</i>	0,20 <sup>d</sup> ± 0,00	0,30 <sup>s</sup> ± 0,00	0,06 <sup>a</sup> ± 0,00	0,17 <sup>b</sup> ± 0,00	0,19 <sup>c</sup> ± 0,00	0,26 <sup>f</sup> ± 0,00	0,19 <sup>c,d</sup> ± 0,00	0,21 <sup>e</sup> ± 0,00
<i>BkFA</i>	0,05 <sup>d</sup> ± 0,00	0,07 <sup>e</sup> ± 0,00	ND	0,04 <sup>c</sup> ± 0,00	0,03 <sup>b</sup> ± 0,00	0,06 <sup>d</sup> ± 0,00	0,04 <sup>c</sup> ± 0,00	0,04 <sup>c</sup> ± 0,00
<i>BaP</i>	0,32 <sup>e</sup> ± 0,00	0,31 <sup>e</sup> ± 0,01	0,09 <sup>a</sup> ± 0,00	0,21 <sup>b</sup> ± 0,00	0,19 <sup>b</sup> ± 0,00	0,27 <sup>d</sup> ± 0,00	0,23 <sup>c</sup> ± 0,00	0,24 <sup>c</sup> ± 0,00
<i>DBahA</i>	0,35 <sup>c</sup> ± 0,03	0,58 <sup>d</sup> ± 0,03	0,05 <sup>a</sup> ± 0,01	0,21 <sup>b</sup> ± 0,02	0,17 <sup>b</sup> ± 0,00	0,24 <sup>b</sup> ± 0,08	0,39 <sup>c</sup> ± 0,03	0,22 <sup>b</sup> ± 0,00
<i>BghiP</i>	0,06 <sup>c,d</sup> ± 0,02	0,05 <sup>b,c,d</sup> ± 0,00	ND	0,05 <sup>b,c,d</sup> ± 0,02	0,05 <sup>b,c,d</sup> ± 0,00	0,08 <sup>d</sup> ± 0,01	0,04 <sup>b,c</sup> ± 0,01	0,02 <sup>a,b</sup> ± 0,00
<i>IP</i>	0,11 <sup>f</sup> ± 0,00	0,15 <sup>g</sup> ± 0,00	ND	0,05 <sup>b</sup> ± 0,00	0,06 <sup>c</sup> ± 0,00	0,11 <sup>f</sup> ± 0,00	0,07 <sup>e</sup> ± 0,00	0,07 <sup>d</sup> ± 0,00
<i>PAH leves<sup>1</sup></i>	468,63 <sup>b</sup> ± 14,68	567,41 <sup>b</sup> ± 116,60	201,33 <sup>a</sup> ± 53,01	152,21 <sup>a</sup> ± 5,54	449,22 <sup>b</sup> ± 51,88	868,64 <sup>c</sup> ± 148,70	195,10 <sup>a</sup> ± 50,94	146,43 <sup>a</sup> ± 14,56
<i>PAH pesados<sup>2</sup></i>	1,09 <sup>d</sup> ± 0,06	1,46 <sup>e</sup> ± 0,02	0,20 <sup>a</sup> ± 0,02	0,71 <sup>b</sup> ± 0,00	0,70 <sup>b</sup> ± 0,00	1,02 <sup>c,d</sup> ± 0,12	0,96 <sup>c</sup> ± 0,06	0,79 <sup>b</sup> ± 0,01
<i>PAH4<sup>3</sup></i>	6,38 <sup>b,c</sup> ± 0,04	7,32 <sup>c,d</sup> ± 0,27	4,21 <sup>a</sup> ± 0,25	4,77 <sup>a,b</sup> ± 0,29	8,26 <sup>c,d</sup> ± 0,27	10,35 <sup>e</sup> ± 1,35	7,17 <sup>c,d</sup> ± 1,12	9,12 <sup>d,e</sup> ± 0,32

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

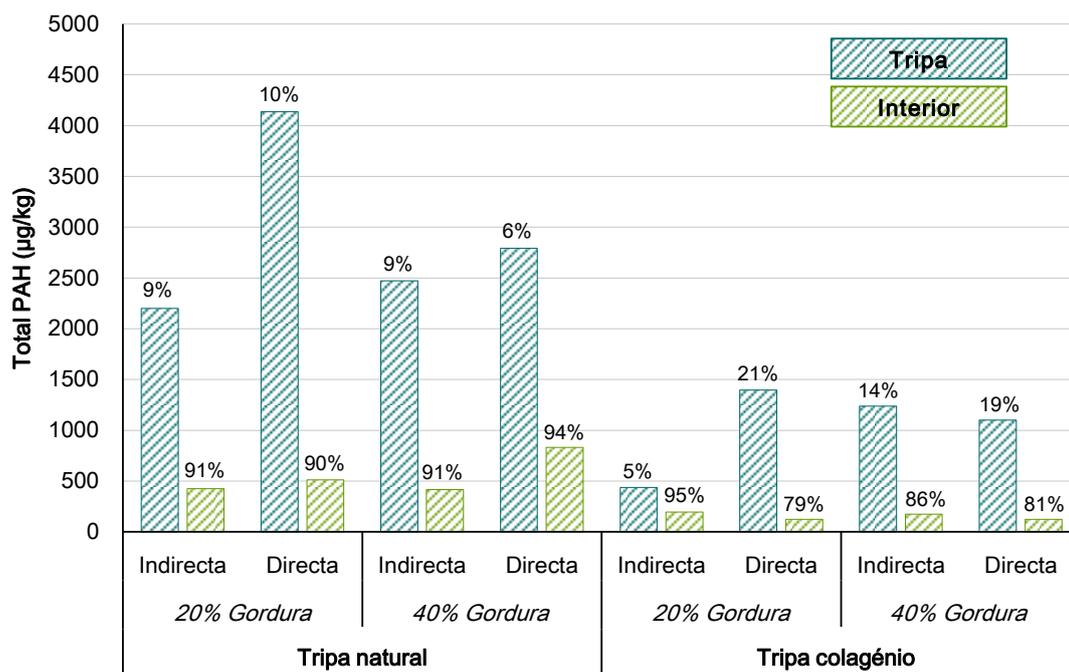
<sup>1</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR. <sup>2</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBahA, BghiP e IP. <sup>3</sup> O teor em PAH4 foi determinado a partir da soma dos teores de BaA, CHR, BbFA e BaP.



**Figura 23.** Teor total em PAH no produto inteiro em função do teor de gordura, tipo de tripa e regime de fumagem (resultados expressos em µg/kg). Barras de erro correspondem ao desvio-padrão. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Em termos relativos, a tripa representou apenas 1 - 2% do total da massa do chouriço de carne produzido. Contudo, a quantidade de PAH aqui detectados é consideravelmente ( $p < 0,05$ ) superior à que se registou na parte interna destes produtos e que representou em média entre 5 - 21% do total de PAH do produto inteiro. Note-se que o perfil e teor em PAH detectados no invólucro do chouriço de carne são determinados pela deposição que ocorre ao longo da fase de fumagem, bem como pela velocidade à qual aqueles compostos migram para as camadas internas. A tripa de colagénio, tal como se demonstra na Figura 24, apresentou sempre menores níveis de contaminação comparativamente aos registados para a tripa natural. Este facto não resultou, contudo, em maiores níveis de PAH nas camadas internas, o que leva a crer que terá havido uma menor deposição destes compostos na tripa sintética relativamente à tripa natural. Por outro lado, os resultados evidenciam ainda maiores contribuições relativas da tripa de colagénio para o total de PAH do produto inteiro. Em média a tripa de colagénio contribuiu com 5 a 21% do total de 16 PAH estudados (Figura 24), fruto da menor penetração destes compostos nas camadas internas, enquanto a tripa natural registou entre 6 e 10%, facto que é revelador da maior permeabilidade desta última.

A tecnologia de fumagem apresentou igualmente um elevado impacto ( $p < 0,05$ ) no teor dos PAH estudados (com excepção para o FA), com realce para os compostos com cinco ou mais anéis aromáticos, como o BbFA, BkFA, BaP, DBahA e IP. Quando as duas tecnologias são comparadas entre si verifica-se que, a remoção do obstáculo que impede a ascensão directa do fumo, redundou na maior acumulação de PAH. Para os produtos cheios em tripa natural, este procedimento originou entre 33% e 45% mais de PAH (teor total). Neste caso, o BbFA, por exemplo, aumentou ( $p < 0,05$ ) de 0,20 para 0,30 µg/kg resultante da fumagem directa (Tabela 15).



**Figura 24.** Teor total em PAH na tripa e no interior do chouriço de carne, bem como a contribuição relativa (expressa em %) de cada um deles para os níveis de contaminação no produto inteiro.

Embora de forma menos preponderante, o teor de gordura, teve igualmente um importante efeito ( $p < 0,05$ ) nos níveis de contaminação com PAH (Figura 22). As tendências obtidas nem sempre foram consistentes, dependendo do tipo de tripa e do regime de fumagem seguido. Contudo, a influência da quantidade de gordura adicionada foi mais evidente nas amostras produzidas com tripa natural e directamente expostas à origem do fumo, para as quais se detectaram as maiores concentrações de PAH (869,66 µg/kg). Todavia, para alguns PAH leves como o NA, AC, FL, FA, PY, BaA e CHR, o efeito do teor de gordura sobrepôs-se ao regime de fumagem, destacando-se como o segundo factor mais importante (Tabela A.1 do Apêndice).

Os factores, como se mostra na Figura 22 e na Tabela A.1 do Apêndice, também interagiram entre si para a maioria dos PAH estudados, com especial ênfase para a interacção entre o teor de gordura e tipo de tripa, nomeadamente no que respeita aos PAH pesados como IP, BbFA e BaP. Para estes compostos, teores de gordura mais elevados resultaram em diferentes níveis de contaminação dependendo do tipo de tripa utilizado. Para os produtos fabricados com invólucro de colagénio, foram detectados níveis de contaminação significativamente ( $p < 0,05$ ) mais elevados na formulação com 40% de gordura, em oposição ao que se registou para os homólogos cheios em tripa natural.

O efeito da interacção entre o teor de gordura e o tipo de fumagem, foi mais óbvio no caso do BbFA e IP, onde as amostras sujeitas a fumagem directa obtiveram os teores de PAH mais elevados, independentemente do teor de gordura. A utilização de um obstáculo revelou contribuir de forma positiva para a redução ( $p < 0,05$ ) da contaminação, encontrando-se os níveis mais

elevados na formulação com maior teor de gordura. Por outro lado, de entre as várias interações, esta foi a única que influenciou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o indicador PAH4 (Tabela 15). Para este grupo em particular, não foram detectadas diferenças em consequência da fumagem directa/indirecta das amostras com menor quantidade de gordura. Apesar disto, a combinação com 40% de gordura adicionada e fumagem directa contribuíram sistematicamente para maiores níveis de PAH4.

A interacção entre o tipo de tripa e regime de fumagem, foi do conjunto das interacções duplas analisadas, a que teve menor impacto, ainda assim, influenciou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) 11 dos 16 compostos detectados, em especial o IP e BbFA (Tabela A.1 do Apêndice). Em termos gerais a concentração de PAH leves não foi afectada pelas diferentes opções de fumagem quando a tripa sintética foi utilizada. Importa ainda salientar que os teores de PAH mais elevados foram encontrados no chouriço de carne que combinou tripa natural e exposição directa à origem do fumo.

Na medida em que o chouriço de carne foi fabricado com a combinação simultânea de um teor de gordura, tipo de tripa e regime de fumagem específico, do ponto de vista estatístico, a interacção tripla dos factores, foi também analisada no presente trabalho. A Figura 23 reflecte a forma como a interacção tripla dos factores em estudo afectou o teor total de PAH no chouriço de carne produzido. Quando o invólucro natural foi utilizado, foram detectados teores mais elevados ( $p < 0,05$ ) destes contaminantes, em particular quando foram adicionados 40% de gordura e foi seguido um regime de fumagem directo. Em contrapartida, aqueles que foram produzidos com tripa sintética não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ), independentemente do teor de gordura e regime de fumagem.

Do conjunto de PAH detectados neste estudo, aqueles com 2 e 3 anéis aromáticos, tais como o ACL, NA, AC, FL e PHE foram sempre detectados, com a sua soma a corresponder, no mínimo a 86% do teor total de PAH. Os PAH pesados, por sua vez, foram sempre encontrados em pequenas quantidades (entre 0,20 e 1,46  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) sem nunca excederem 0,5% do total em PAH detectados, no produto inteiro, independentemente do tipo de amostra (Tabela 15). De entre os compostos pesados detectados, DBaA e BaP sobressaíram com os teores mais elevados (0,58 e 0,32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente).

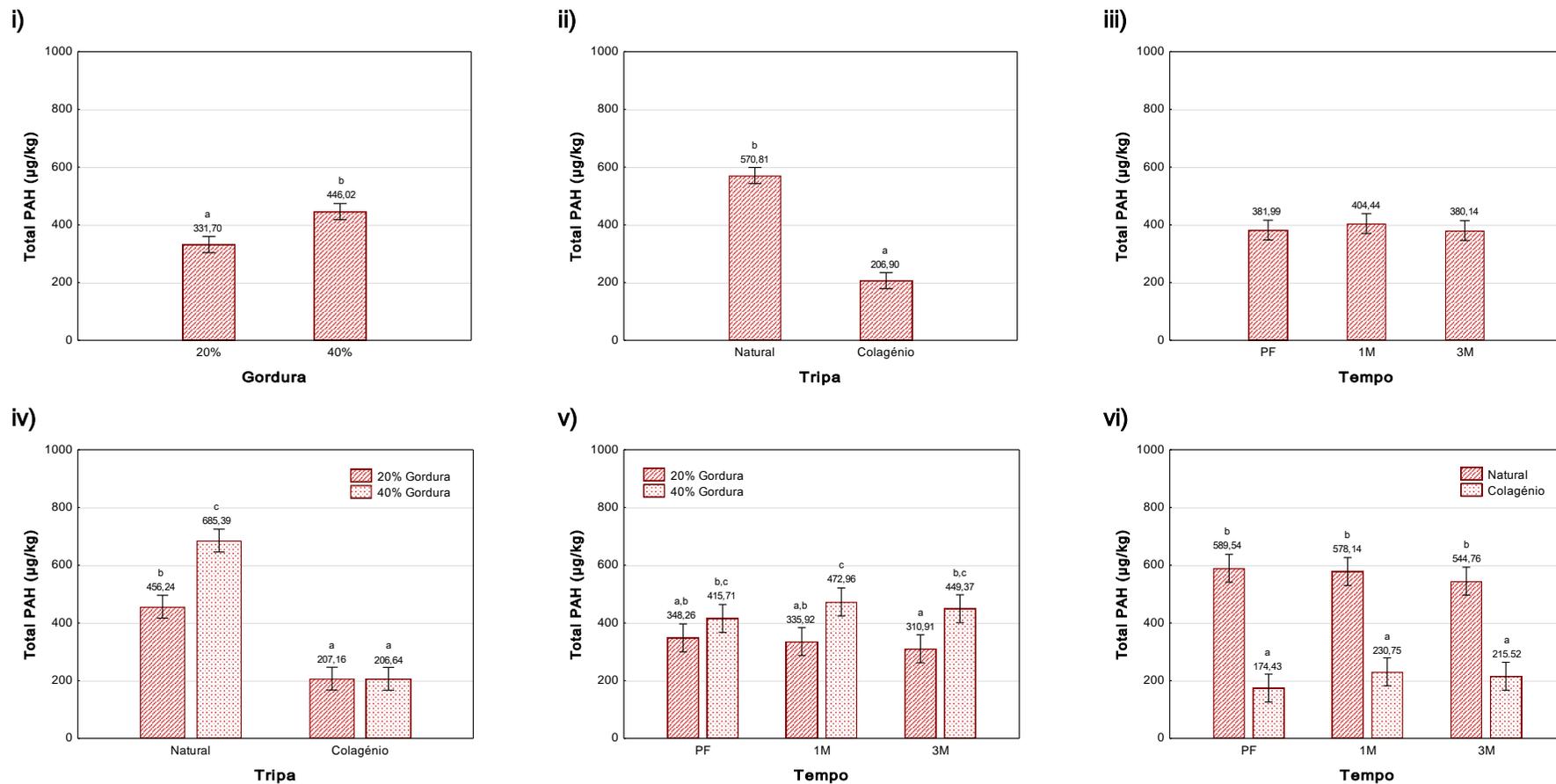
Os teores em PAH4 variaram entre 4,21 e 10,35  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dos quais, o BaA e CHR, ambos PAH leves, foram os que se apresentaram em maior quantidade (Tabela 15). Uma vez mais, o chouriço de carne com 40% de gordura produzido com tripa natural e submetido a um regime de fumagem directo foi o que registou maiores níveis de contaminação com PAH4.

### **3.3.2. Evolução do teor em PAH no chouriço de carne durante o armazenamento**

Uma vez concluída a fase de processamento, na qual os produtos se encontram expostos ao fumo e durante a qual ocorre a acumulação de PAH, estes podem sofrer uma diminuição durante

o armazenamento. Actualmente, a sua migração para o material que compõe a embalagem, para as camadas internas ou até mesmo a fotodegradação estão identificadas como sendo algumas das causas que podem resultar no decréscimo do teor destes contaminantes químicos. Em particular este estudo incidiu sobre as duas primeiras hipóteses. Por estar directamente em contacto com o material da embalagem bem como com as camadas internas do chouriço de carne, a tripa é um elemento fundamental na transição dos PAH entre estes dois meios. Adicionalmente, a gordura presente na massa destes produtos facilita a penetração destes compostos, protegendo-os da radiação e, conseqüentemente da fotodegradação. No seguimento do estudo da influência do processamento tecnológico, desde logo se afigurou crucial avaliar a extensão do efeito do teor de gordura e tipo de tripa na sua evolução ao longo do tempo. Paralelamente, a temperatura de conservação e o tempo de armazenamento foram igualmente considerados. Tendo em conta o elevado número de variáveis consideradas, tornou-se necessário efectuar uma abordagem inicial por meio de *One-Way* ANOVA, para avaliar a influência isolada de cada uma delas. À excepção da temperatura de conservação, que não revelou qualquer influência nos teores de qualquer um dos compostos em estudo ( $p > 0,05$ ), esta análise preliminar permitiu confirmar a influência do teor de gordura, tipo de tripa e tempo de armazenamento nos níveis de PAH. Com base nestes resultados foi então efectuada a ANOVA factorial, onde se incluíram três variáveis: teor de gordura, tipo de tripa e tempo de armazenamento e as respectivas interacções.

À semelhança do que foi já demonstrado anteriormente para o processamento, ao longo do armazenamento foi clara a influência ( $p < 0,05$ ) devida ao tipo de tripa utilizada bem como do teor de gordura adicionado relativamente ao teor em PAH detectados. Uma vez mais, menores níveis de contaminação foram encontrados no chouriço de carne produzido em tripa de colagénio. Já a influência do teor de gordura só se evidenciou naqueles produtos em que a tripa natural foi usada. Para ambos os factores, a tendência verificada surge na sequência dos resultados já reportados para o produto final ("PF"). Assim, uma vez atingidos 3 meses de armazenamento a soma de PAH nos produtos com invólucro de colagénio corresponderam a 221,73 e 209,31  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nas formulações magra e gorda, respectivamente, enquanto no chouriço com tripa natural os enchidos homólogos ascenderam a 400,08 e 689,44  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 26). Em contrapartida, a soma dos 16 PAH não foi afectada pelo tempo de armazenamento (Figura 25, Tabela A.2 do Apêndice). De facto, como se demonstra na Figura 26, o teor total de PAH manteve-se globalmente estável durante os 3 meses, independentemente do tipo de produto considerado. Também a tripa e massa do chouriço de carne não registaram alterações no somatório dos 16 PAH ao longo deste período. Um cenário bem diferente é perceptível quando se considera o indicador PAH4 (Figura 27), que sofreu uma redução expressiva ( $p < 0,05$ ) logo no primeiro mês, momento a partir do qual estabilizou.



**Figura 25.** Efeito dos factores principais e respectivas interações de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores em PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) determinados no chouriço de carne.

Barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

(i) Gordura, (ii) Tripa, (iii) Tempo, (iv) Gordura x Tripa, (v) Gordura x Tempo, (vi) Tempo x Tripa” (vi).

**Tabela 16.** Teores médios em PAH (em µg/kg, sob a forma média ± DP) no chouriço de carne.

	20% Gordura					
	<i>T. natural</i>			<i>T. colagénio</i>		
	PF	1 M	3 M	PF	1 M	3 M
<i>ACL</i>	224,96 <sup>c,d,e</sup> ± 59,10	188,46 <sup>b,c</sup> ± 26,03	180,93 <sup>b,c</sup> ± 62,97	91,87 <sup>a</sup> ± 55,19	105,68 <sup>a,b</sup> ± 38,16	109,56 <sup>a,b</sup> ± 29,35
<i>NA</i>	96,40 <sup>b</sup> ± 15,96	60,56 <sup>a,b</sup> ± 13,96	45,96 <sup>a,b</sup> ± 21,74	25,48 <sup>a</sup> ± 6,84	38,18 <sup>a</sup> ± 18,57	34,91 <sup>a</sup> ± 13,65
<i>AC</i>	60,71 <sup>d,e</sup> ± 6,78	42,18 <sup>c,d</sup> ± 7,07	37,37 <sup>b,c</sup> ± 12,98	19,65 <sup>a,b</sup> ± 4,47	26,30 <sup>a,b,c</sup> ± 22,33	27,25 <sup>a,b,c</sup> ± 23,58
<i>FL</i>	71,03 <sup>b,c</sup> ± 7,17	64,87 <sup>b,c</sup> ± 14,26	53,35 <sup>b</sup> ± 15,41	14,27 <sup>a</sup> ± 3,77	24,03 <sup>a</sup> ± 7,67	21,03 <sup>a</sup> ± 6,06
<i>PHE</i>	30,46 <sup>d</sup> ± 2,00	53,10 <sup>f</sup> ± 7,20	43,30 <sup>e</sup> ± 11,76	10,11 <sup>a,b</sup> ± 1,80	16,48 <sup>a,b,c</sup> ± 1,33	16,93 <sup>a,b</sup> ± 3,36
<i>AN</i>	3,75 <sup>b</sup> ± 0,47	10,93 <sup>d</sup> ± 1,62	8,21 <sup>c</sup> ± 2,90	0,96 <sup>a</sup> ± 0,21	3,11 <sup>a,b</sup> ± 0,23	3,18 <sup>a,b</sup> ± 0,58
<i>FA</i>	11,52 <sup>c,d</sup> ± 1,09	13,37 <sup>d</sup> ± 1,08	12,92 <sup>d</sup> ± 2,65	4,87 <sup>a</sup> ± 0,86	4,00 <sup>a</sup> ± 0,59	4,14 <sup>a</sup> ± 1,12
<i>PY</i>	12,90 <sup>a,b</sup> ± 0,98	10,54 <sup>a,b</sup> ± 0,67	10,97 <sup>a,b</sup> ± 2,21	5,31 <sup>a</sup> ± 0,96	3,38 <sup>a</sup> ± 0,56	3,46 <sup>a</sup> ± 0,78
<i>BaA</i>	2,09 <sup>c</sup> ± 0,13	1,38 <sup>b,c</sup> ± 0,46	1,29 <sup>b,c</sup> ± 0,35	3,40 <sup>d</sup> ± 0,21	0,35 <sup>a</sup> ± 0,17	0,39 <sup>a</sup> ± 0,11
<i>CHR</i>	4,20 <sup>e</sup> ± 0,36	2,97 <sup>d</sup> ± 0,95	4,86 <sup>e</sup> ± 1,93	0,84 <sup>a,b</sup> ± 0,31	0,73 <sup>a,b</sup> ± 0,15	0,64 <sup>a</sup> ± 0,19
<i>BbFA</i>	0,25 <sup>b,c</sup> ± 0,05	0,13 <sup>a,b,c</sup> ± 0,11	0,14 <sup>a,b,c</sup> ± 0,03	0,11 <sup>a,b</sup> ± 0,04	0,06 <sup>a</sup> ± 0,01	0,07 <sup>a</sup> ± 0,00
<i>BkFA</i>	0,06 <sup>f</sup> ± 0,01	0,02 <sup>c,d</sup> ± 0,00	0,03 <sup>d,e</sup> ± 0,01	0,02 <sup>b,c,d</sup> ± 0,00	ND	0,01 <sup>a,b</sup> ± 0,00
<i>BaP</i>	0,32 <sup>d</sup> ± 0,01	0,27 <sup>c,d</sup> ± 0,11	0,20 <sup>b,c,d</sup> ± 0,07	0,15 <sup>a,b,c</sup> ± 0,06	0,11 <sup>a,b</sup> ± 0,05	0,06 <sup>a</sup> ± 0,02
<i>DBahA</i>	0,46 <sup>f</sup> ± 0,12	0,15 <sup>c,d</sup> ± 0,06	0,15 <sup>c,d</sup> ± 0,06	0,13 <sup>b,c,d</sup> ± 0,09	0,03 <sup>a,b</sup> ± 0,01	0,01 <sup>a</sup> ± 0,00
<i>BghiP</i>	0,06 <sup>a,b</sup> ± 0,01	0,17 <sup>c,d</sup> ± 0,07	0,18 <sup>d</sup> ± 0,08	0,02 <sup>a</sup> ± 0,00	0,03 <sup>a,b</sup> ± 0,00	0,04 <sup>a,b</sup> ± 0,01
<i>IP</i>	0,13 <sup>b</sup> ± 0,02	0,23 <sup>c</sup> ± 0,11	0,23 <sup>c</sup> ± 0,10	0,02 <sup>a</sup> ± 0,00	0,03 <sup>a</sup> ± 0,01	0,06 <sup>a,b</sup> ± 0,02
<i>PAH leves</i> <sup>1</sup>	518,02 <sup>b,c</sup> ± 80,17	448,36 <sup>b</sup> ± 63,80	399,15 <sup>b</sup> ± 121,65	176,77 <sup>a</sup> ± 37,85	222,25 <sup>a</sup> ± 81,17	221,49 <sup>a</sup> ± 71,60
<i>PAH pesados</i> <sup>2</sup>	1,28 <sup>e</sup> ± 0,20	0,97 <sup>d,e</sup> ± 0,57	0,93 <sup>c,d,e</sup> ± 0,16	0,46 <sup>a,b</sup> ± 0,27	0,26 <sup>a</sup> ± 0,03	0,24 <sup>a</sup> ± 0,21

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

<sup>1</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR. <sup>2</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBahA, BghiP e IP.

Tabela 16. (Continuação)

	40% Gordura					
	<i>T. natural</i>			<i>T. colagénio</i>		
	PF	1 M	3 M	PF	1 M	3 M
<i>ACL</i>	244,32 <sup>c,d,e</sup> ± 110,67	274,48 <sup>e</sup> ± 39,67	263,41 <sup>d,e</sup> ± 105,86	64,05 <sup>a</sup> ± 23,19	104,08 <sup>a,b</sup> ± 16,00	89,73 <sup>a</sup> ± 24,62
<i>NA</i>	169,77 <sup>c</sup> ± 90,30	160,22 <sup>c</sup> ± 23,70	165,55 <sup>c</sup> ± 93,09	41,05 <sup>a</sup> ± 14,66	68,33 <sup>a,b</sup> ± 27,47	44,52 <sup>a,b</sup> ± 6,65
<i>AC</i>	97,36 <sup>f</sup> ± 21,70	73,45 <sup>e</sup> ± 10,54	75,87 <sup>e</sup> ± 22,09	21,30 <sup>a,b</sup> ± 3,39	10,91 <sup>a</sup> ± 10,67	13,71 <sup>a</sup> ± 13,70
<i>FL</i>	86,80 <sup>c,d</sup> ± 13,84	108,73 <sup>d</sup> ± 20,12	94,14 <sup>d</sup> ± 46,18	16,18 <sup>a</sup> ± 2,99	26,10 <sup>a</sup> ± 2,78	24,38 <sup>a</sup> ± 1,35
<i>PHE</i>	27,28 <sup>d</sup> ± 2,62	53,98 <sup>f</sup> ± 10,31	50,51 <sup>e,f</sup> ± 10,04	9,12 <sup>a</sup> ± 0,29	17,28 <sup>b,c</sup> ± 1,75	19,22 <sup>c</sup> ± 2,62
<i>AN</i>	4,50 <sup>b</sup> ± 1,29	10,33 <sup>c,d</sup> ± 1,71	11,80 <sup>d</sup> ± 5,40	0,78 <sup>a</sup> ± 0,05	2,94 <sup>a,b</sup> ± 0,24	3,03 <sup>a,b</sup> ± 0,44
<i>FA</i>	9,65 <sup>b,c</sup> ± 2,10	11,96 <sup>c,d</sup> ± 2,03	11,07 <sup>b,c,d</sup> ± 0,89	5,00 <sup>a</sup> ± 0,44	4,06 <sup>a</sup> ± 1,37	8,62 <sup>b</sup> ± 4,59
<i>PY</i>	10,41 <sup>a,b</sup> ± 1,22	9,43 <sup>b</sup> ± 2,11	13,80 <sup>c</sup> ± 8,83	5,57 <sup>a</sup> ± 0,24	3,07 <sup>a</sup> ± 0,43	3,95 <sup>a</sup> ± 0,65
<i>BaA</i>	7,11 <sup>e</sup> ± 1,20	1,27 <sup>b,c</sup> ± 0,90	0,92 <sup>a,b</sup> ± 0,55	6,57 <sup>e</sup> ± 1,14	0,62 <sup>a,b</sup> ± 0,42	0,67 <sup>a,b</sup> ± 0,50
<i>CHR</i>	1,73 <sup>b,c</sup> ± 0,18	2,33 <sup>c,d</sup> ± 1,31	1,72 <sup>b,c</sup> ± 0,67	1,14 <sup>a,b</sup> ± 0,18	0,98 <sup>a,b</sup> ± 0,19	0,95 <sup>a,b</sup> ± 0,57
<i>BbFA</i>	0,23 <sup>b,c</sup> ± 0,04	0,26 <sup>c</sup> ± 0,23	0,20 <sup>a,b,c</sup> ± 0,10	0,20 <sup>a,b,c</sup> ± 0,01	0,22 <sup>b,c</sup> ± 0,11	0,22 <sup>b,c</sup> ± 0,15
<i>BkFA</i>	0,04 <sup>e</sup> ± 0,01	0,01 <sup>a,b,c</sup> ± 0,00	ND	0,04 <sup>e</sup> ± 0,00	0,01 <sup>a,b,c</sup> ± 0,00	ND
<i>BaP</i>	0,23 <sup>b,c,d</sup> ± 0,04	0,25 <sup>c,d</sup> ± 0,21	0,19 <sup>b,c,d</sup> ± 0,17	0,23 <sup>b,c,d</sup> ± 0,01	0,18 <sup>a,b,c</sup> ± 0,07	0,17 <sup>a,b</sup> ± 0,06
<i>DBahA</i>	0,21 <sup>d,e</sup> ± 0,06	0,08 <sup>a,b</sup> ± 0,09	0,01 <sup>a</sup> ± 0,00	0,30 <sup>e</sup> ± 0,09	0,03 <sup>a</sup> ± 0,00	0,01 <sup>a</sup> ± 0,00
<i>BghiP</i>	0,06 <sup>a,b</sup> ± 0,02	0,12 <sup>b,c,d</sup> ± 0,08	0,12 <sup>b,c,d</sup> ± 0,06	0,03 <sup>a,b</sup> ± 0,01	0,08 <sup>a,b,c</sup> ± 0,02	0,05 <sup>a,b</sup> ± 0,01
<i>IP</i>	0,09 <sup>a,b</sup> ± 0,02	0,05 <sup>a,b</sup> ± 0,02	0,11 <sup>a,b</sup> ± 0,06	0,07 <sup>a,b</sup> ± 0,00	0,09 <sup>a,b</sup> ± 0,03	0,07 <sup>a,b</sup> ± 0,02
<i>PAH leves<sup>1</sup></i>	658,93 <sup>c,d</sup> ± 233,97	706,18 <sup>d</sup> ± 104,87	688,81 <sup>d</sup> ± 255,89	170,76 <sup>a</sup> ± 37,57	238,37 <sup>a</sup> ± 31,20	208,78 <sup>a</sup> ± 23,13
<i>PAH pesados<sup>2</sup></i>	0,86 <sup>b,c,d</sup> ± 0,18	0,77 <sup>b,c,d</sup> ± 0,56	0,63 <sup>a,b,c,d</sup> ± 0,31	0,88 <sup>c,d,e</sup> ± 0,09	0,61 <sup>a,b,c,d</sup> ± 0,30	0,525 <sup>a,b,c</sup> ± 0,30

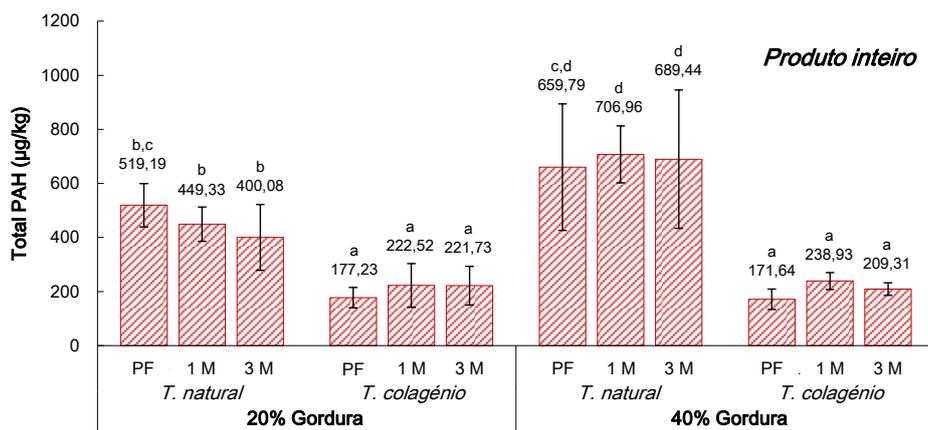
Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

<sup>1</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR. <sup>2</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBahA, BghiP e IP.

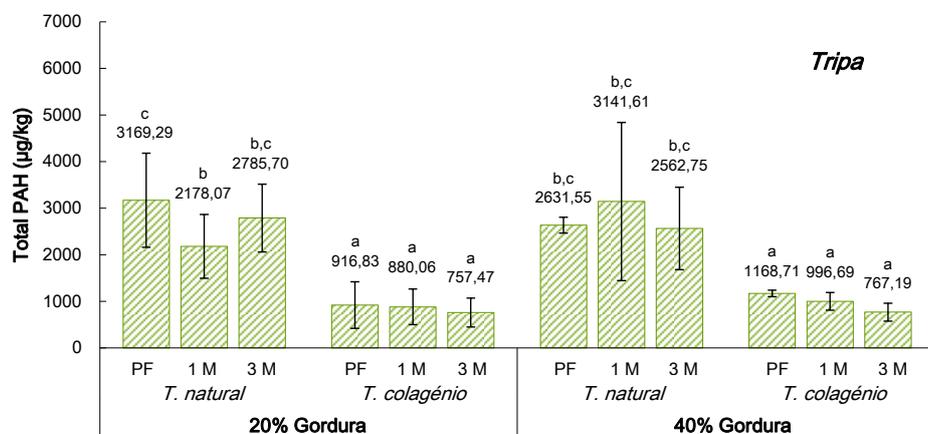
Em termos globais, depois de 1 mês de armazenamento, o chouriço de carne revelou uma quebra no teor em PAH4 em cerca de 70% relativamente ao teor inicial (amostras “PF”), impulsionada principalmente pelo BaA, que dos 4 compostos, foi o que globalmente esteve presente em maiores quantidades e cuja diminuição foi sempre superior a 87%. A única excepção compreendeu os produtos com 20% de gordura e tripa natural, que nos dois meses que se seguiram registaram uma recuperação para níveis próximos dos iniciais (6,49 µg/kg, Figura 27). Esta evolução é o reflexo do incremento registado no teor em CHR que, neste produto em particular, foi o composto mais abundante do conjunto dos PAH4. Nos restantes casos, o teor em PAH4 foi de 1,15 e 2,02 µg/kg no chouriço de carne com tripa de colagénio (nos enchidos com 3 meses de armazenamento contendo 20% e 40% de gordura, respectivamente) e 3,03 µg/kg quando o invólucro natural foi a opção. Os diferentes perfis evolutivos identificados nos produtos com tripa natural podem ser mais facilmente compreendidos atendendo aos dados que constam na Figura 27, onde se mostram os teores em PAH4 determinados separadamente na tripa e na massa do chouriço de carne. Em qualquer dos casos, é evidente a diminuição ( $p < 0,05$ ) dos níveis de contaminação determinados na tripa, por oposição ao registado na massa do chouriço de carne. No caso particular dos produtos com teor de gordura reduzido, estes contaminantes químicos são transferidos da tripa para as camadas internas do chouriço de carne ficando aí retidos.

De resto, o perfil de PAH determinado no “PF” manteve-se inalterado durante o período de armazenamento em análise, onde os compostos leves continuaram a ser claramente os mais abundantes comparativamente aos PAH pesados. De facto, a concentração da maioria dos compostos analisados manteve-se constante. Para aqueles que denotaram alterações, contudo, nem sempre foi possível identificar um padrão comum. Ainda assim, após 3 meses de armazenamento do chouriço de carne, foi detectado um decréscimo ( $p < 0,05$ ) nos teores de BaA, BkFA e DBahA. Para o primeiro dos três compostos, o decréscimo foi notado quer na tripa quer no interior dos produtos (cf. Tabela A.3 e Tabela A.4 do Apêndice). A diminuição do BaA poderá por isso ser atribuída à sua migração para o material da embalagem, seja directamente a partir da tripa ou por meio de difusão do interior para a tripa e desta para a embalagem. Já para os restantes, BkFA e DBahA, uma vez que não foram detectados na camada interna (Tabela A.4 do Apêndice), apenas foi possível comprovar o seu desaparecimento da tripa do chouriço de carne (Tabela A.3 do Apêndice). Neste caso, a evolução registada poderá ser devida à penetração nas camadas internas do chouriço de carne ou à sua passagem para a rede polimérica que compõe embalagem ou a ambas.

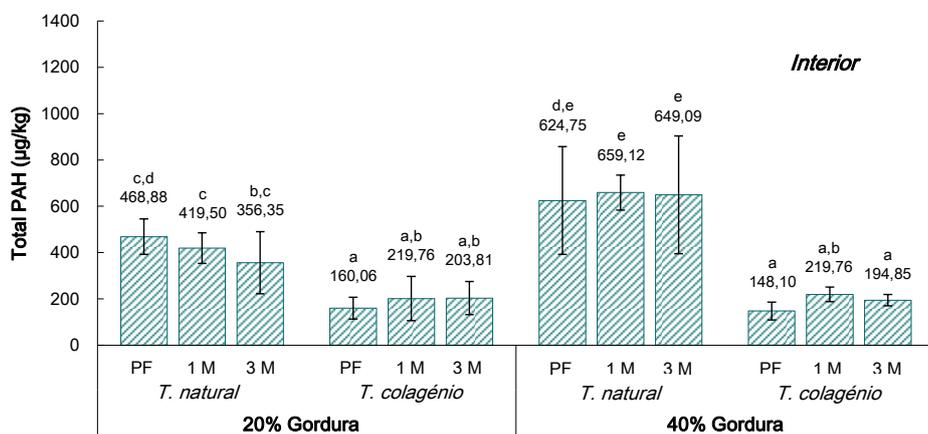
i)



ii)

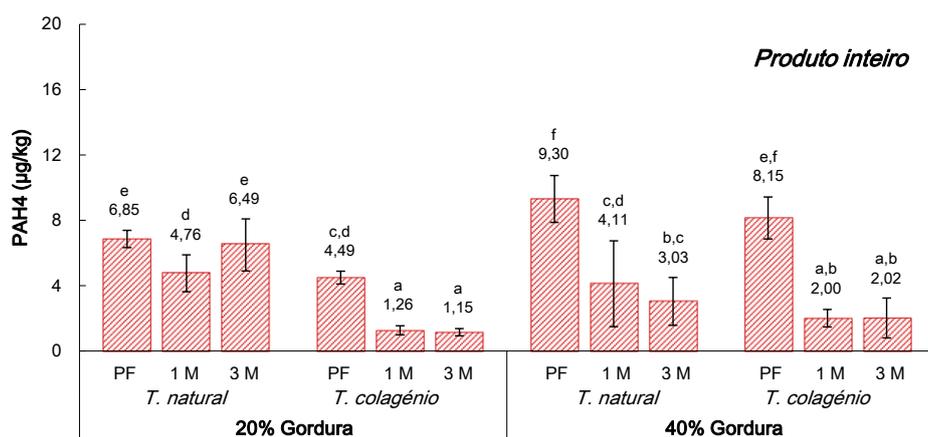


iii)

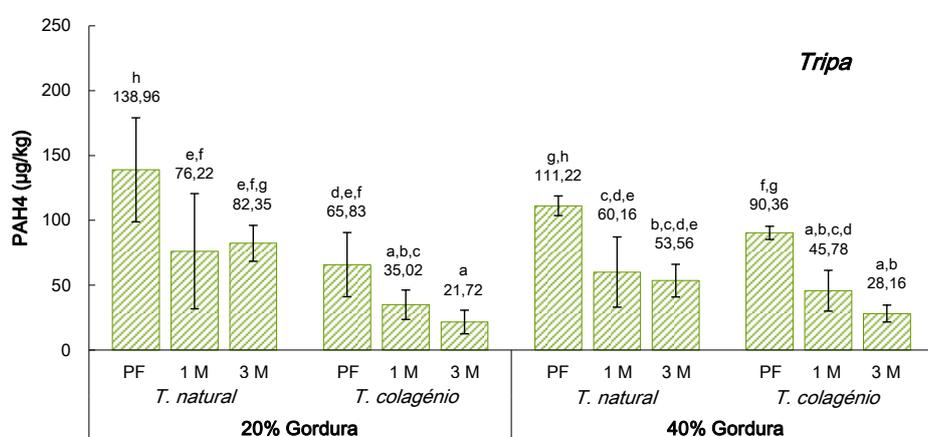


**Figura 26.** Evolução do teor total em PAH (µg/kg) no produto inteiro (i), tripa (ii) e interior do chouriço de carne (iii) durante o armazenamento para as diferentes tecnologias de processamento. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

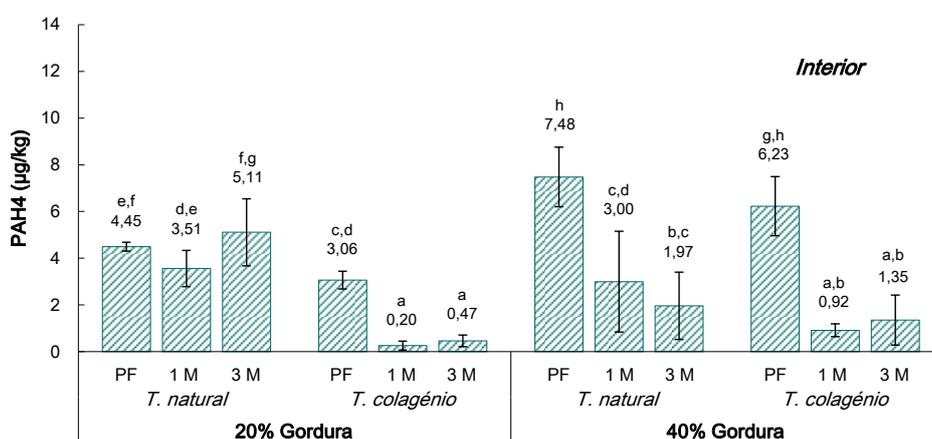
i)



ii)



iii)



**Figura 27.** Evolução do teor do indicador PAH4 (µg/kg) no produto inteiro (i), tripa (ii) e interior do chouriço de carne (iii) durante o armazenamento para as diferentes tecnologias de processamento.

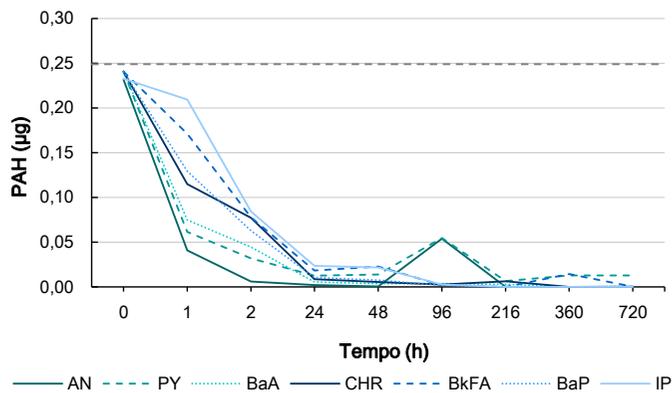
Barras de erro correspondem ao desvio-padrão. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3. Remoção dos PAH contidos em meio líquido para o filme da embalagem

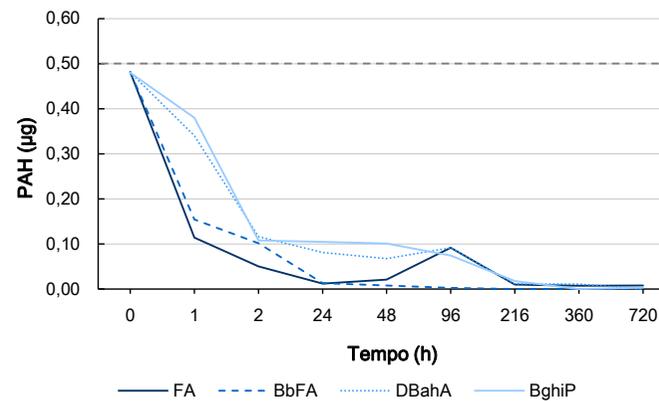
Na Figura 28 são apresentados os resultados relativos à avaliação do processo de migração dos PAH entre um meio líquido e o filme da embalagem (LDPE, *low density polyethylene*). A sua análise evidencia perfis evolutivos distintos em função da polaridade do meio considerado. No que respeita ao meio polar avaliado, a água, verifica-se uma forte diminuição nos níveis de contaminação de cada um dos 11 compostos estudados, em particular nas primeiras 24h de contacto entre o filme e o meio contaminado. De facto neste período foram removidos em média 93% dos contaminantes presentes, tendo mesmo correspondendo ao período de tempo em que se registou o decréscimo mais acentuado. Dependendo do composto em causa, o nível de transferência de PAH variou entre 80% a 99%, determinados para o BghiP e AN, respectivamente. Em termos gerais, a velocidade de migração revelou-se inversamente proporcional à dimensão do composto em causa. Por outras palavras, os PAH leves foram tendencialmente mais rapidamente removidos da água comparativamente aos de maior peso molecular. Verificou-se, por exemplo, que após 24h os teores de AN, FA, PY, BaA, CHR, BbFA e BaP (estes dois últimos são já PAH pesados) foram reduzidos para níveis próximos de 0,01 µg. Este nível só foi atingindo após 96h de armazenamento no caso do BkFA e IP, enquanto para o DBahA e BghiP foram necessárias 216h. Apesar disto, as duas primeiras horas foram especialmente relevantes neste processo de migração. De notar que logo após a primeira hora, o teor em AN, FA, PY, BaA, CHR e BbFA havia já sido reduzido em mais de metade relativamente ao teor de contaminação inicial. O mesmo nível de redução foi atingido nos restantes compostos no final de 2 horas de contacto da água com o filme da embalagem. Resultados similares foram observados para o marcador PAH4, que após as primeiras 24h já havia sido reduzido a cerca de 5% do seu teor inicial.

Os resultados obtidos a partir da determinação dos PAH presentes no material da embalagem após contactar com a água contaminada mostram um progresso sensivelmente contrário ao verificado para o meio líquido. Como se constata pela Figura 28, a massa de PAH absorvidos pela rede polimérica da embalagem aumentou de forma consistente ao longo do tempo, com especial destaque nas primeiras 24h, e para os compostos com menor peso molecular. A complementaridade de resultados aqui encontrada, entre a transição de PAH do meio líquido para o material da embalagem, é reforçada matematicamente por importantes ( $p < 0,001$ ) correlações de Pearson negativas para todos os compostos sem excepção (Tabela A.5 do Apêndice). A correlação mais baixa, mas ainda assim muito significativa ( $p < 0,001$ ) foi determinada para o DBahA ( $r = 0,69$ ), por oposição ao CHR e BaP que foram as mais relevantes ( $r = 0,92$  para ambos os compostos).

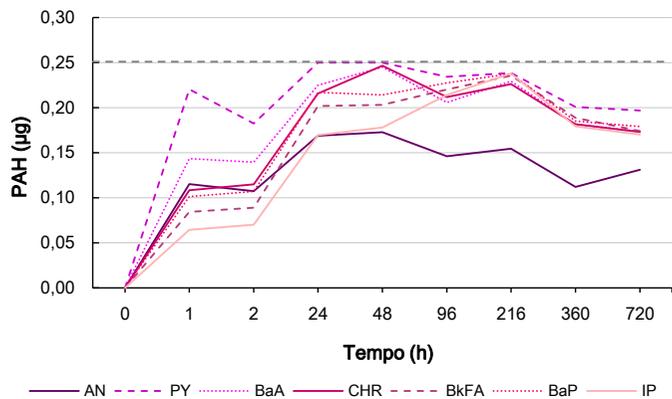
i)



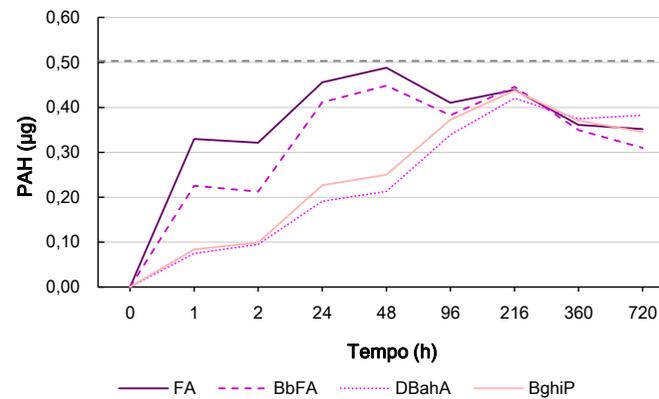
ii)



iii)

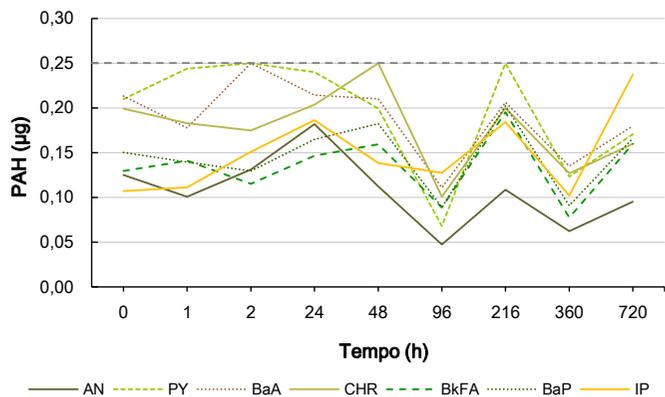


iv)

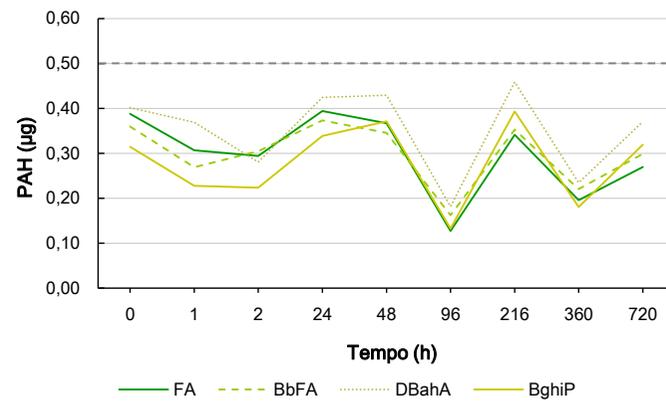


**Figura 28.** Evolução do teor em PAH ( $\mu\text{g}$ ) na água (i e ii), na embalagem (iii e iv) e no azeite (v e vi) e do teor PAH4 na água, na embalagem e no azeite (vii). A linha cinzenta a tracejado corresponde ao teor em PAH adicionado

v)



vi)



vii)

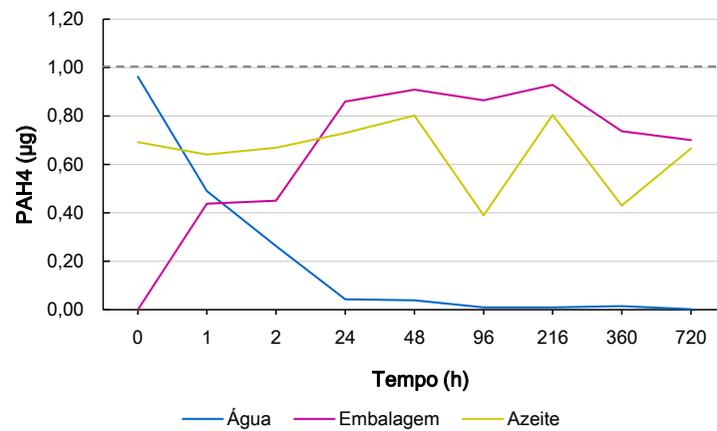


Figura 28. (Continuação)

Contrariamente ao que ocorre no conjunto água-embalagem onde a polaridade entre o meio líquido (água) e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos é diferente entre si, o mesmo não acontece no sistema azeite-embalagem. O facto de se encontrarem inseridos num meio igualmente apolar, para o qual os PAH têm maior afinidade (comparativamente à água), parece ter influenciado decisivamente os resultados, impedindo a sua migração para a embalagem. Através da análise da Figura 28 não é possível distinguir uma tendência que indicie a remoção destes contaminantes do meio líquido. Na verdade, ao longo dos 30 dias (720h) que o azeite contaminado permaneceu acondicionado em LDPE, apenas se registaram algumas alterações, e que ocorreram depois das 48h de armazenamento. Estas oscilações parecem indicar a alternância entre a transferência dos PAH para a embalagem e desta novamente para o azeite.

### 3.4. DISCUSSÃO

O trabalho, cujos resultados são agora apresentados, compreendeu duas grandes vertentes: por um lado, a avaliação do efeito de alguns factores tecnológicos nos teores de PAH, e por outro o estudo da influência da embalagem na remoção destes compostos.

Ainda durante o processamento, o invólucro de colagénio determinou a acumulação de menores níveis de PAH tanto à superfície, na tripa, como nas camadas internas. Das duas tripas testadas, a de colagénio foi assim a que apresentou menor grau de deposição dos PAH contidos no fumo. A este respeito Djinovic *et al.* (2008a) também registaram diferentes taxas de deposição em função do tipo de carne, no caso, carnes de vaca e porco. Pelo facto de conter menores quantidades de gordura, a tripa sintética contribuiu ainda para a menor disseminação dos PAH para o interior do chouriço de carne. Estas observações estão de acordo com o estudo de García-Falcón e Simal-Gándara (2005) que concluíram que em termos relativos, a tripa de colagénio contribuía com maiores teores para o total de PAH detectados no “chorizo” espanhol (tripa + interior), comparativamente à tripa natural. Significa por isso que quando o invólucro sintético é usado, estes contaminantes permanecem maioritariamente à superfície dos enchidos, prevenindo mais eficazmente a migração de PAH para as camadas internas. Para além disso, o chouriço de carne processado com tripa de colagénio apresentou de forma consistente os menores teores destes compostos, independentemente da quantidade de gordura adicionada ou do processo de fumagem, de resto, à semelhança dos dados publicados por Škaljac *et al.* (2014) e Pöhlmann *et al.* (2013). Além disto, a tripa de colagénio apresenta a vantagem adicional de ser mais facilmente removida (por comparação com a tripa natural), facto que permite minimizar consideravelmente a exposição dos consumidores a estes compostos cancerígenos. Por último, a maior retenção dos PAH à superfície propicia a sua remoção por contacto com o material da embalagem ou até mesmo a sua fotodegradação (Šimko, 2005).

No que se refere à quantidade de gordura e ao regime de fumagem seguidos, o seu efeito só foi perceptível quando o chouriço foi cheio em tripa natural. Nestes enchidos, os menores teores de PAH foram detectados quando foram adicionados menores quantidades de gordura e quando não se encontravam directamente expostos à origem do fumo. Os resultados mais encorajadores registaram-se, em particular, quando os produtos combinavam estas duas condições.

Apesar de a gordura ter, nos produtos de salsicharia, benefícios claros ao nível da qualidade tecnológica e sensorial, designadamente ao nível da mastigabilidade, suculência, desenvolvimento de aromas e controlo da velocidade de desidratação (Ruiz, 2007), facilita igualmente a maior acumulação de PAH. Por outro lado, a protecção dos enchidos em relação à sua exposição directa ao fumo contribuiu para que se depositassem menores quantidades de PAH pesados, que por serem menos voláteis são mais facilmente retidos pelo obstáculo colocado sobre a origem de fumo. Roseiro *et al.* (2011) propuseram a hipótese de que a utilização deste tipo de barreiras (fumagem indirecta) poderia interferir com o fluxo ascendente do fumo e, desta forma, reduzir a deposição dos PAH à superfície dos produtos. Na verdade, a importância da utilização de uma barreira física para evitar a exposição directa do chouriço de carne ao fumo (com vista a minimizar a contaminação com PAH, em especial com os compostos mais nocivos), é claramente demonstrado pelos resultados agora apresentados. Além dos benefícios já referidos, a presença desta barreira permite ainda evitar a pirólise da gordura derretida que escorre dos produtos durante a fase de fumagem, a partir da qual há a formação de PAH (Chung *et al.*, 2011; Viegas *et al.*, 2012). Por outro lado, devido ao carácter marcadamente lipofílico dos PAH (Martorell *et al.*, 2010), seria expectável que a adição de maiores quantidades de gordura na formulação promovesse a migração destes compostos para a o interior dos enchidos. Também este facto ficou demonstrado, por exemplo, com os resultados relativos ao grupo PAH4. Ainda assim, do ponto de vista do processamento tecnológico, este foi o factor que menos influenciou os níveis de PAH encontrados no chouriço de carne.

Actualmente são conhecidos vários estudos relativamente ao perfil de PAH em produtos cárneos fumados (Ciecierska e Obiedziński, 2007; Djinic *et al.*, 2008a; Roseiro *et al.*, 2011; Škaljac *et al.*, 2014; Škrbić *et al.*, 2014; Fasano *et al.*, 2016) presentes em diversos tipos de produtos, práticas de fabrico (tipo de madeira, práticas de fumagem) e compostos avaliados. Apesar da grande variedade de condições tecnológicas aplicadas, é consensual a prevalência dos PAH leves sobre os compostos pesados. Os perfis de PAH obtidos no decorrer deste trabalho foram semelhantes aos que foram reportados por Santos *et al.* (2011) cuja investigação incidiu em produtos de salsicharia tradicional característicos da região do Alentejo. Globalmente, o teor em PAH diminuiu com o aumento do peso molecular. Tal como foi demonstrado por Aurore *et al.* (2000), Guillén *et al.* (2000c) e Stumpe-Vīksna *et al.* (2008b), o predomínio de PAH leves pode ser atribuído à composição do fumo, independentemente da madeira usada na combustão e dos procedimentos relativos à fumagem (directa/indirecta), na medida em que estes compostos de menor peso molecular estão habitualmente presentes em maiores quantidades. Neste trabalho, os PAH com até 4 anéis aromáticos representaram em média mais de 99% do total de

contaminantes detectados, não obstante o tipo de amostra, tal havia sido já confirmado por Santos *et al.* (2011). Em contrapartida, os PAH com 5 ou mais anéis aromáticos foram encontrados em níveis reduzidos e, nalguns casos, estiveram ausentes. De assinalar, por exemplo, que o teor mais elevado de BaP detectado foi cerca de 6 vezes inferior ao estipulado pela legislação actual (CE, 2011a), que impõe um limite máximo de 2 µg/kg. Para o chouriço de carne fabricado com tripa natural, aqueles que continham maior teor de gordura evidenciaram menores teores em PAH pesados comparativamente às amostras com menor teor de gordura. Este resultado pode ser atribuído a um efeito de diluição (facto que dificultou a sua detecção em algumas amostras) que resulta da migração da tripa para as camadas internas que, de acordo com García-Falcón e Simal-Gándara (2005), é favorecida por maiores teores de gordura. À semelhança do BaP, os teores do marcador PAH4 detectados cumprem com os limites definidos pela legislação comunitária actual (CE, 2011a), não ultrapassando os 12 µg/kg exigidos.

As condições tecnológicas utilizadas neste ensaio-piloto, para avaliar a influência do teor de gordura, tipo de tripa e regime de fumagem, não reproduzem na íntegra as habitualmente seguidas pela indústria cárnea no fabrico dos produtos de salsicharia, ainda assim os resultados de BaP e PAH4 aqui encontrados estão de acordo com os previamente reportados por Roseiro *et al.* (2011). Por outro lado, com base nos teores de PAH no chouriço de carne produzido, foi ainda realizada uma análise de risco associado ao consumo destes produtos. Para este efeito foi seguida a abordagem recomendada pela EFSA (2008b) para a análise de risco para compostos genotóxicos e carcinogénicos, que tem por base a “margem de exposição” (*margin of exposure*, MOE). De acordo com esta metodologia, valores de MOE mais elevados são indicativos de um menor nível de risco para a saúde dos consumidores. Tendo por base os teores apurados e, um consumo médio de 25 gramas de chouriço de carne por dia, por um indivíduo de cerca 60 kg, a ingestão do chouriço de carne produzido representaria, pela mesma ordem de grandeza, uma dose diária de 0,13 e 4,34 ng.kg<sup>-1</sup>bwday<sup>-1</sup> de BaP e PAH4, o que determinaria um valor de MOE superior a 10000, que corresponde ao valor de referência proposto pela EFSA (2008b). Deste modo, apesar dos teores de PAH aparentemente elevados, o chouriço de carne fabricado no âmbito deste estudo representaria um risco reduzido para a saúde dos consumidores, no que diz respeito aos PAH.

As variações nos teores de PAH habitualmente registadas nos produtos cárneos em função do tempo podem ser distinguidas em duas fases: o processamento e o armazenamento. A primeira caracteriza-se pela deposição e acumulação dos PAH contidos no fumo gerado no processo de secagem. Durante o armazenamento, por sua vez, estes contaminantes podem sofrer um decréscimo em virtude da sua fotodegradação ou adsorção e posterior migração para o interior do material da embalagem (Šimko *et al.*, 1999). O acondicionamento do chouriço de carne sob vácuo promove o contacto entre a rede polimérica do polietileno e os produtos e, em particular com a tripa, onde os PAH se concentram em maior quantidade. Desta forma, os contaminantes aqui depositados, bem como os que se encontram na camada mais superficial, são susceptíveis de serem absorvidos pelo filme da embalagem.

Na literatura existem já alguns estudos que atestam a transferência dos PAH dos alimentos contaminados para o material da embalagem. Os trabalhos de Chen e Chen (2005), Šimko *et al.* (2005) e Skláršová *et al.* (2006), são alguns exemplos. De acordo com Chen e Chen (2005), a capacidade de remoção dos PAH para o plástico é limitada pela difusão dos compostos no meio em que se encontram inicialmente, seguida pela sua afinidade para a superfície do material da embalagem e eventual difusão para o interior da rede polimérica. Nos produtos alimentares e, em particular, no chouriço de carne aqui estudado, a transferência destes contaminantes depende ainda do grau de difusão destes compostos nas camadas internas (Šimko, 2005).

Sendo os PAH compostos de natureza apolar, quando se encontram em meio aquoso, a sua migração é facilitada para a embalagem, impulsionados pelas forças de *van der Waals*, uma vez que estes são transferidos de um meio fortemente polar para o filme do LDPE menos polar. Os resultados obtidos no decurso deste estudo mostram nitidamente que os PAH presentes na água foram rapidamente absorvidos por oposição aos que se encontravam no meio apolar, neste caso simulado pelo azeite. A diferença de polaridades no sistema azeite - embalagem é consideravelmente menor do que o que se verifica entre o sistema água - embalagem. Em certa medida, este efeito pode ser comparado ao que ocorre na tripa, por exemplo. A tripa natural, por conter maior teor de gordura, acumula maiores quantidades destes contaminantes dificultando assim a transferência para a rede polimérica do LDPE. Adicionalmente, o azeite inclui na sua composição um elevado teor em ácidos gordos mono e polinsaturados, que segundo a informação constante no rótulo do azeite utilizado para a realização deste ensaio correspondeu a 75 e 10%, respectivamente. Segundo Šimko *et al.* (2006), os electrões  $\pi$  que participam nas ligações duplas dos ácidos gordos insaturados interagem com os electrões  $\pi$  deslocalizados dos PAH, impedindo a sua migração para o LDPE. Neste contexto, além do teor de gordura dos alimentos, a composição em ácidos gordos parece ser ainda um factor a considerar. Recorde-se que o chouriço de carne produzido com tripa natural que continha maior quantidade de gordura (40%) foi o que revelou maiores níveis de acumulação de PAH no “PF”, mas que apesar disso, no final do armazenamento estes foram substancialmente reduzidos, para níveis inferiores aos que foram encontrados nos produtos homólogos com teor de gordura reduzido. Por sua vez, a massa do chouriço de carne resultante dos produtos que combinaram a tripa natural e teores reduzidos de gordura não observou a mesma tendência. Aparentemente, a gordura constituiu aqui um elemento facilitador da difusão destes contaminantes químicos para as camadas superficiais e posterior passagem para o material da embalagem.

Além dos aspectos mencionados anteriormente, o ensaio no modelo líquido permitiu ainda verificar que a transferência dos PAH é negativamente influenciada pelo aumento da massa molecular destes compostos. De facto, do conjunto dos compostos estudados, o DBahA e o BghiP foram os que apresentaram menores velocidades de transferência da água para a rede polimérica da embalagem. Segundo Chen e Chen (2005) o aumento da dimensão dos compostos faz diminuir a sua solubilidade e coeficientes de difusão no LDPE, o que explica a menor taxa de migração dos PAH pesados que se registou quer no modelo líquido, quer no chouriço de carne.

Muito embora a transferência dos PAH tenha sofrido um forte abrandamento com o aumento do peso molecular, a maior taxa de transferência registou-se durante as primeiras horas de contacto com a embalagem, independentemente do composto em causa. Resultados idênticos foram obtidos por Chen e Chen (2005) bem como por Šimko *et al.* (2004), que também constataram que os PAH são mais rapidamente absorvidos durante as primeiras 24 horas, pois de acordo com Šimko *et al.* (1999) a transferência das moléculas dos PAH inicia-se no momento em que o meio contaminado e o filme da embalagem entram em contacto.

Independentemente das opções tecnológicas seguidas na produção do chouriço de carne, os resultados obtidos revelam que, o teor total de PAH permaneceu inalterado ao longo dos três meses pelos quais se prolongou o armazenamento. Os teores medidos para o conjunto dos 16 PAH em estudo reflectiram em grande medida os níveis determinados no chouriço de carne "PF", logo após a conclusão do processamento. À parte de algumas oscilações, a concentração do total de PAH manteve-se igualmente constante na tripa e nas camadas internas. No chouriço de carne com tripa de colagénio (ambas as formulações) e tripa natural com 40% de gordura, a evolução do indicador PAH4, contudo, caracterizou-se por um decréscimo nos primeiros 30 dias de armazenamento em vácuo. Esta tendência foi observada na tripa e na massa interior, principalmente à custa da diminuição do teor dos PAH leves, o BaA e o CHR. A análise dos PAH contidos nestes dois componentes separadamente permite, desta forma, compreender mais claramente a sua evolução durante o período de armazenamento. O facto da diminuição dos PAH ter sido verificada em ambos os componentes (tripa e interior) prova a transferência destes componentes para o filme da embalagem. Assim sendo, em conjunto, estes resultados demonstram a capacidade de remoção destes compostos não só a partir da tripa, mas igualmente nas camadas mais próximas. Também Chen e Chen (2005) verificaram na sua investigação a remoção dos PAH da pele de pato assada por contacto com o LDPE. Por outro lado, estes resultados corroboram os que foram obtidos para o meio líquido, onde se verificou maior grau de migração dos compostos com menor peso molecular e logo na fase inicial de contacto entre os produtos e a embalagem.

### 3.4. CONCLUSÃO

Do ponto de vista da tecnologia de processamento a escolha do tipo de tripa foi um elemento fundamental, no que respeita ao controlo dos níveis de PAH encontrados no chouriço de carne. A utilização de um invólucro sintético permitiu não só minimizar significativamente os níveis de contaminação, como anular o efeito devido aos restantes factores em estudo: o teor de gordura e o regime de fumagem implementado. Comparativamente à tripa natural, a tripa de colagénio demonstrou ser a melhor barreira para os PAH, na medida em que contribuiu para o menor grau de deposição à superfície e simultaneamente a sua migração para as camadas internas. Apesar

disto, esta demonstrou ser permeável o suficiente por forma a permitir a eliminação de BaA e CHR por contacto com o LDPE no qual o chouriço foi conservado. Ainda assim, considerando que as especificações dos produtos de salsicharia tradicional usualmente obrigam à utilização de tripa natural, a fumagem em que os produtos não se encontrem directamente expostos à origem do fumo, em especial quando associada a teores de gordura reduzidos, constitui uma alternativa de relevo. Em qualquer dos casos, por questões de segurança, é aconselhável a remoção de qualquer tipo de tripa prévia ao consumo deste tipo de produtos.

À luz dos resultados obtidos, a conservação do chouriço de carne sob vácuo revelou-se ser uma mais-valia na remoção de alguns PAH, como o BaA, o CHR, o BkFA e o DBahA.

Por fim, à luz das recomendações da EFSA elaboradas em 2008, os níveis de contaminação de PAH encontrados no chouriço de carne produzidos não representam um risco para a saúde dos consumidores.

## 4.

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PAH EM CONDENSADOS DE FUMO GERADOS  
ATRAVÉS DA COMBUSTÃO DE DIFERENTES MADEIRAS E ESTUDO DO EFEITO  
DA UTILIZAÇÃO DE AROMA DE FUMO EM PRODUTOS DE SALSICHARIA

---

## 4.1. INTRODUÇÃO

A indústria alimentar tem sido alvo de inúmeros avanços tecnológicos, os quais permitiram melhorias apreciáveis em relação ao processamento e à preservação dos alimentos. Com eles, a necessidade de expor os alimentos à acção do fumo visando a conservação dos alimentos, tal como acontecia para os produtos de salsicharia, tem vindo a diminuir progressivamente. Actualmente a fumagem assume maior importância como forma de incorporar aromas e desenvolver a cor característica deste tipo de produtos. Porém, sabe-se hoje que, esta prática é a principal responsável pela presença PAH nestes produtos.

A aplicação de aromas de fumo líquido, por sua vez, tem-se afirmado como uma tecnologia alternativa, com benefícios tanto do ponto de vista da segurança alimentar como da tecnologia de processamento. Estes aromas conferem muitas das propriedades do fumo nomeadamente no que respeita às qualidades sensoriais que veicula, mas igualmente no que respeita às propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Martin *et al.*, 2010). Com o recurso a aromas de fumo líquido é possível suprimir o processo de fumagem por completo ou, alternativamente, potenciar o sabor e aroma tradicionalmente conferido pelo fumo (EFSA, 2007), quando empregue em conjunto com a fumagem. De acordo com Underwood e Shoop (2007), da sua composição fazem parte três grupos principais de compostos: os fenólicos, que podem variar entre 20 e 35%, os carbonilos, entre 10 e 15%, e os ácidos, entre 5 e 12%. Os mesmos autores salientam, todavia, que a preponderância de cada um destes grupos pode variar em função da madeira que lhe deu origem. Os compostos fenólicos, por exemplo, participam significativamente no aroma, bem como nas actividades antioxidativa e antimicrobiana (Soldera *et al.*, 2008; Montazeri *et al.*, 2013; Pöhlmann *et al.*, 2013). Os carbonilos, por sua vez, intervêm ao nível da cor, da textura e, pensa-se, na actividade microbiana (Underwood e Shoop, 2007; Montazeri *et al.*, 2013). Já os ácidos conferem sabor e também alguma actividade antimicrobiana (Rozum, 2009). Além dos aspectos mencionados, o recurso a este ingrediente apresenta vantagens ao nível da segurança química dos produtos, uma vez que contribui para minimizar a presença de compostos tóxicos como os PAH. Em primeiro lugar, porque propicia maior controlo sobre as condições em que se desenrola a pirólise, nomeadamente a temperatura e, conseqüentemente a ocorrência dos PAH pesados (com cinco ou mais anéis aromáticos) que surgem a temperaturas mais elevadas (Roda *et al.*, 1999). Por outro lado, a baixa solubilidade dos PAH em meios aquosos, como o que acontece com os condensados de fumo líquido, simplifica a sua remoção por meio de técnicas de separação de fases ou de filtração (Lingbeck *et al.*, 2014). Assim, a utilização de aromas de fumo líquido incorpora muitos dos benefícios atribuídos ao fumo, nomeadamente no que se refere ao efeito antimicrobiano, actividade antioxidante e características sensoriais, com a vantagem adicional de ser isento de compostos tóxicos. De

referir ainda que esta é uma tecnologia mais ecológica, mais rápida do que a fumagem, com maior facilidade de aplicação e que assegura maior uniformidade do produto final, além de que possibilita ao fabricante controlar mais eficazmente a concentração de fumo aplicada (Meier, 2009; Lingbeck *et al.*, 2014).

Em termos globais, o modo de obtenção dos condensados rege-se pelos mesmos princípios pelos quais o fumo é gerado, isto é, através da combustão incompleta da madeira. Uma das principais diferenças entre as duas metodologias, todavia, reside no facto de na fumagem convencional o fumo ser gerado em câmaras onde está em contacto directo com os produtos suspensos, ao passo que os condensados de fumo são gerados de forma independente. O aroma de fumo líquido, por sua vez, é produzido em reactores, na presença de quantidades limitadas de oxigénio, onde a madeira é sujeita a um calor intenso sem que, no entanto, ocorra a formação de chama. O fumo é de seguida condensado e purificado por forma a eliminar as impurezas tóxicas contidas originalmente no fumo (Lingbeck *et al.*, 2014). Contudo, à semelhança do que sucede com a fumagem convencional, as características do aroma do fumo líquido dependem não só do tipo de madeira, tal como já tivemos oportunidade de referir, e da temperatura a que ocorre a pirólise, mas também do processo de filtragem final (Šimko, 2005). Através da combinação destes factores, o desenvolvimento da tecnologia dos geradores de fumo aliado ao melhor conhecimento das potencialidades na utilização dos condensados permitiu, ao longo das últimas quatro décadas, alargar a variedade de condensados disponíveis no mercado (Rozum, 2009). A versatilidade destes condensados permite a sua aplicação sob diversas formas, designadamente à superfície (por vaporização, por exemplo) e na massa (Borys, 2004).

O trabalho realizado ao longo deste capítulo centrou-se precisamente na tecnologia da produção de condensados de fumo líquido, onde se determinou o teor em PAH resultantes da combustão a 400 e 600 °C de alguns tipos de madeira mais frequentemente utilizados pelos produtores portugueses: o azinho, o sobro, a oliveira, o castanho e o carvalho. Simultaneamente avaliou-se o impacto da utilização de aromas de fumo no perfil de PAH, por meio de um ensaio-piloto que deu lugar à produção de chouriço de carne. Do conjunto de produtos obtidos, metade deles foram sujeitos a fumagem indirecta e os restantes tratados com aroma de fumo. Complementarmente foram testadas duas tecnologias de aplicação deste ingrediente: aspersão à superfície e incorporação na massa do chouriço de carne.

## 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados relativos ao estudo de incidência, discutidos no Capítulo 2, atestam que o teor e perfil de PAH pode ser muito variável em função das condições de fumagem onde o tipo de madeira constitui um factor central, em particular, se considerarmos que nas regiões do Alentejo e de

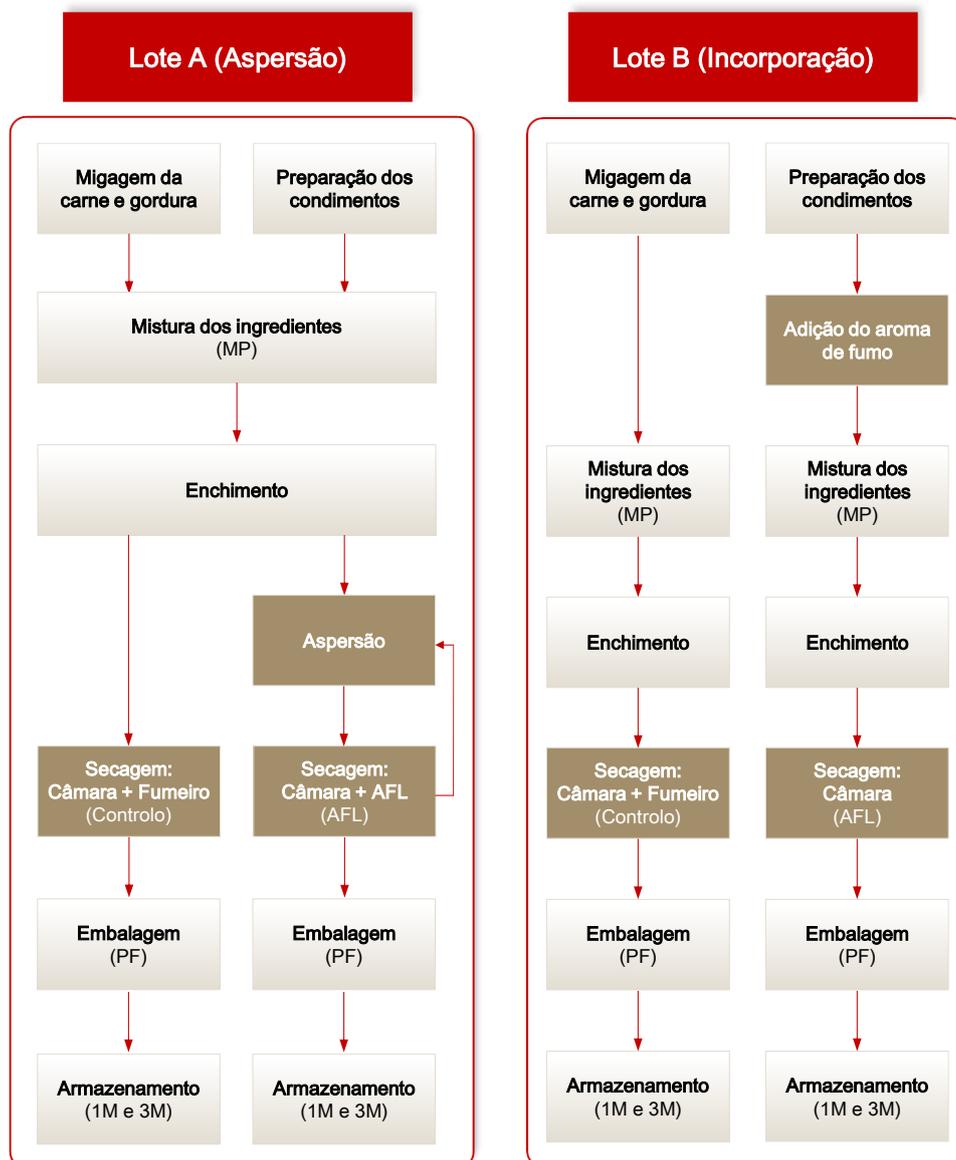
Trás-os-Montes são utilizadas diferentes tipos de madeira. O conhecimento do perfil de PAH gerado aquando da pirólise de cada um dos tipos de madeira no fumeiro constitui, assim, um elemento essencial para a melhor compreensão destes resultados. Os resultados previamente apresentados no Capítulo 3, por seu turno, demonstraram a importância da fumagem indirecta dos produtos como forma de prevenir consideravelmente a sua contaminação com PAH, assim como o invólucro seleccionado e a quantidade de gordura contida na formulação. Dos vários tipos de produtos testados, o chouriço de carne com 40% de gordura, produzido em tripa natural e sujeito a fumagem indirecta foram aqueles que, no nosso entender, proporcionaram a melhor relação entre a segurança (no que aos PAH diz respeito) e aceitabilidade do consumidor, razão pela qual estas foram as opções tecnológicas implementadas na execução deste estudo.

#### 4.2.1. Delineamento experimental

O trabalho descrito integra duas vertentes principais: a comparação do perfil de PAH obtido a partir da combustão de algumas das madeiras, que são frequentemente usadas no processamento de produtos de salsicharia tradicional, e averiguar acerca do impacto da utilização de aromas de fumo nos níveis de PAH.

Para o estudo do perfil de PAH no fumo foram seleccionados cinco tipos de madeira: azinho (*Quercus ilex* L.), sobro (*Quercus suber* L.), oliveira (*Olea europaea* L.), castanho (*Castanea sativa* Mill.) e carvalho (*Quercus faginea* Lam.). As duas primeiras espécies são a escolha mais frequente dos fabricantes da região do Alentejo, enquanto as três últimas são a opção mais usual dos produtores da região de Trás-os-Montes. Por outro lado, atendendo a que no contexto industrial não existe um controlo que permita aos produtores aferir a temperatura a que decorre a combustão, foram consideradas duas temperaturas para a realização da pirólise: 400 °C e 600 °C.

Tendo por base as opções tecnológicas consideradas mais favoráveis e, visando uma vez mais, a redução de PAH presentes, procedeu-se à análise do efeito da utilização de aroma de fumo líquido. Para o efeito foram consideradas duas tecnologias de aplicação: aspersão e incorporação. Porém, para a realização ensaio-piloto foi necessário atender às dimensões reduzidas da câmara de fumagem disponível, sem comprometer a representatividade da amostra. Como tal, a opção considerada assentou no processamento de dois lotes independentes de chouriço de carne, tal como se ilustra na Figura 29. Após a divisão da massa de cada um dos lotes em duas partes iguais, que foram designadas de “Controlo” e “AFL”, a fim de serem processadas e curadas. O chouriço de carne “Controlo” foi processado alternadamente em câmara de ambiente controlado e por exposição ao fumo de azinho (*Quercus ilex* L.). A secagem dos produtos designados por “AFL”, por sua vez, desenvolveu-se exclusivamente em câmara com temperatura e humidade relativa controladas.



**Figura 29.** Processamento de chouriço de carne de acordo com o regime de secagem e metodologias de tratamento testadas.

MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: produtos com 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.

#### 4.2.2. Produção dos condensados de fumo

Os condensados de fumo foram obtidos tendo por base o protocolo experimental descrito por García-Falcón e Simal-Gándara (2005). Para cada um dos tipos de madeira cortaram-se pedaços com cerca de 1 g cada. Estes foram deixados por um período de 24 horas em estufa de secagem ajustada para uma temperatura de 100 °C, a fim de remover a sua humidade, após o qual as amostras foram transferidas para um exsicador até ao momento da sua combustão. Para a pirólise e recolha dos componentes do fumo foi montado um sistema em série, idêntico ao que se encontra esquematizado na Figura 30, composto por uma mufla (MR 170.E, Heraeus,

Alemanha), à qual se encontrava ligado um sistema de recolha dos condensados do fumo que consistia em três frascos lavadores de gases devidamente protegidos da luz (revestidos com papel de alumínio), cada um deles contendo 20 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido à Panreac (Espanha). A circulação do ar e do fumo no sistema foi assegurada por uma bomba de vácuo. Todos os condensados de fumo foram produzidos em triplicado.



**Figura 30.** Representação esquemática do sistema de combustão e recolha dos componentes do fumo.

As amostras de madeira (2 g) foram queimadas na mufla (previamente aquecida durante pelo menos 60 minutos) à temperatura de 400 °C ou 600 °C, sendo esta confirmada com recurso a um termómetro (52 K/J Thermometer, Fluke, Alemanha). Com o objectivo de garantir que todo o fumo era recolhido, o sistema permaneceu em funcionamento por mais 30 minutos após se deixar de observar a existência de fumo no sistema. No final da combustão o conteúdo dos três frascos foi combinado, o sistema lavado com mais 20 mL de DMSO. Os condensados, produzidos em triplicado para cada tipo de amostra, foram depois mantidos em frascos escuros rolhados até ao momento da análise.

#### 4.2.3. Produção do chouriço de carne

Para o fabrico do chouriço de carne, a carne e gordura de porco (ambas adquiridas no mercado) foram picadas e condimentadas com massa de pimentão (3,5%), massa de alho (3%), sal (1%), água (2,5%), sais de cura Palatinata Cure (0,25%) que continham na sua composição  $\text{NaNO}_3$  (4,9%) e  $\text{KNO}_2$  (5%), e antioxidante Jabarot (0,15%). À massa dos enchidos “AFL” do Lote B, adicionaram-se ainda 0,5% de aroma de fumo líquido (Formulab, Portugal). Após a homogeneização da massa, efectuou-se o enchimento, utilizando para o efeito tripa salgada de carneiro.

O processo de secagem das amostras “Controlo” desenrolou-se alternadamente em câmara de ambiente controlado e em câmara de fumagem. Durante os primeiros 6 dias, os parâmetros da câmara de ambiente controlado foram definidos para uma temperatura de 6 °C e humidade relativa de 80%. Após este período inicial, a temperatura foi ajustada para 10 °C e a humidade relativa para 75%. Os enchidos foram expostos à acção do fumo por períodos de 4h/dia por meio

de fumagem indirecta e produção de fumo de azinho (*Quercus ilex* L.). Relativamente aos produtos que seguiram a tecnologia alternativa, a desidratação necessária teve lugar exclusivamente em câmaras de ambiente controlado, seguindo os mesmos parâmetros seguidos para os homólogos fumados, com excepção do chouriço de carne aspergido com aroma de fumo. Neste caso, depois de se proceder à aspersão superficial dos enchidos, estes foram deixados ao ar por cerca de duas horas (antes de serem reintroduzidos na câmara), a fim de eliminar o excesso de humidade resultante. A aspersão dos produtos foi realizada nos 2º, 3º e 7º dias com uma solução diluída a 10% (v/v) de aroma de fumo. Pelo facto de estas amostras denotarem um desenvolvimento de cor inferior ao pretendido, ao 13º, 14º e 15º dias os produtos foram aspergidos duas vezes com a solução de aroma de fumo diluída a 10% (v/v). Neste caso, a segunda aspersão foi realizada após a superfície dos enchidos se encontrar seca. Por fim, ao 17º dia de processamento os produtos foram aspergidos com uma solução a 20% (v/v). A aspersão dos produtos foi efectuada com um aspersor vulgar de plástico, como tal, a solução de aroma foi preparada de fresco imediatamente antes da sua aplicação.

Quando foram atingidas cerca de 35% de perdas no teor de humidade do chouriço de carne (após aproximadamente 17 dias de secagem), os produtos foram embalados sob vácuo em sacos Cryovac BB4L (LDPE, acrónimo da designação inglesa *low density polyethylene*). Para este ensaio foram considerados três momentos de análise distintos: produto final (“PF”) e durante o armazenamento, mais concretamente, depois de 1 e 3 meses (designados “1M” e “3M”, respectivamente). Durante o armazenamento, todos os produtos foram mantidos ao abrigo da luz, sob refrigeração (4 °C), sendo de seguida congelados a uma temperatura de -80 °C até ao momento da sua análise.

#### **4.2.4. Extracção e análise cromatográfica dos PAH nos condensados de fumo**

Para a extracção dos PAH, 5 mL de condensado de fumo foram saponificados em refluxo, durante 1 hora, com 5,6 g de KOH e 5 mL de água e 45 mL de metanol. Ao extracto resultante adicionaram-se 50 mL de mistura de metanol/água (80:20, v/v) e extraiu-se com porções de 50 mL de n-hexano. Combinaram-se as fracções orgânicas que se evaporaram até à secura sob vácuo num evaporador rotativo (Laborota 4001, Heidolph, Schwabach, Alemanha), após o que se ressuspendeu o resíduo com 1 mL de n-hexano que foi então aplicado no topo de uma coluna Sep-Pak Silica Plus Long Cartridge de 55-105 µm (Waters, Milford, MA), e os PAH eluídos com 10 mL de n-hexano. O extracto foi mais uma vez evaporado à secura sob vácuo, sendo por fim ressuspendido em 3 mL de acetonitrilo. Todos os condensados foram extraídos em triplicado. A análise cromatográfica do extracto foi realizada de acordo com os procedimentos descritos na secção 2.2.3.

A determinação do teor em PAH contidos no aroma de fumo usado para o fabrico do chouriço de carne foi realizada, em triplicado, seguindo o mesmo protocolo experimental agora descrito para os condensados de fumo.

Na análise dos condensados de fumo, o acenaftileno (ACL), naftaleno (NA), acenafteno (AC), fluoreno (FL), fenantreno (PHE) e antraceno (AN) apresentaram taxas de recuperação inferiores a 60%. Por esta razão, para a avaliação de PAH nos condensados de fumo e no aroma de fumo foram considerados apenas o fluoranteno (FA), pireno (PY), benz[*a*]antraceno (BaA), criseno (CHR), benzo[*b*]fluoranteno (BbFA), benzo[*k*]fluoranteno (BkFA), benzo[*a*]pireno (BaP), dibenzo[*a,h*]antraceno (DBahA), benzo[*ghi*]perileno (BghiP) e indeno[1,2,3-*cd*]pireno (IP).

#### 4.2.5. Extração e análise cromatográfica dos PAH no chouriço de carne

A extração e posterior quantificação dos PAH no chouriço de carne foi realizada em triplicado, seguindo o protocolo analítico descrito na secção 2.2.3 desta dissertação.

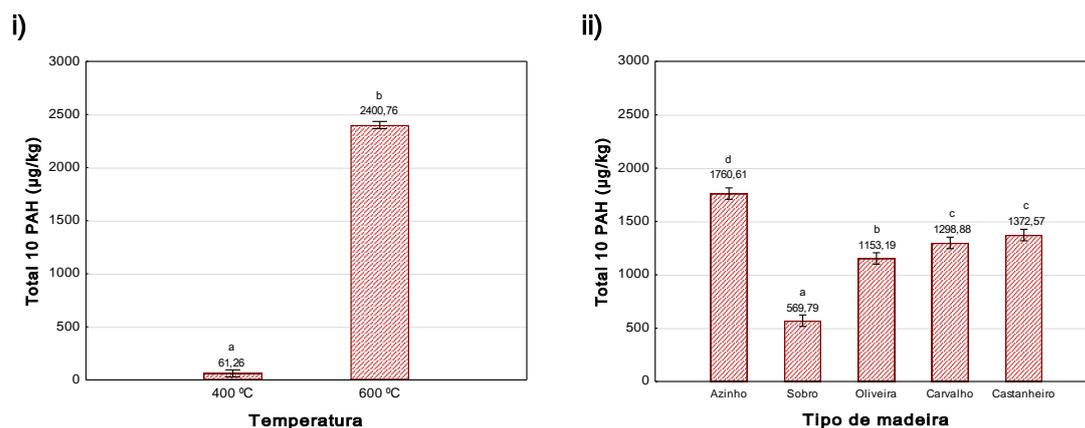
#### 4.2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por meio de análise de variância factorial (Factorial ANOVA). No que concerne aos condensados de fumo consideraram-se duas variáveis: o tipo de madeira (azinho, sobro, oliveira, carvalho e castanho) e a temperatura (400 °C e 600 °C). No chouriço de carne, por sua vez, a tecnologia (aspersão e incorporação), tipo de amostra (“Controlo” e “AFL”) e tempo de armazenamento (“PF”, “1M” e “3M”) foram as variáveis dependentes consideradas. Em qualquer dos casos, as diferenças significativas entre as médias foram determinadas segundo o teste *Honest Significant Differences* (HSD Tukey), definido para um nível de  $p < 0,05$ . As relações entre os factores foram estabelecidas com base na análise de componentes principais (ACP). A análise estatística foi efectuada no *software* Statistica 10 (StatSoft Inc, 1984-2011).

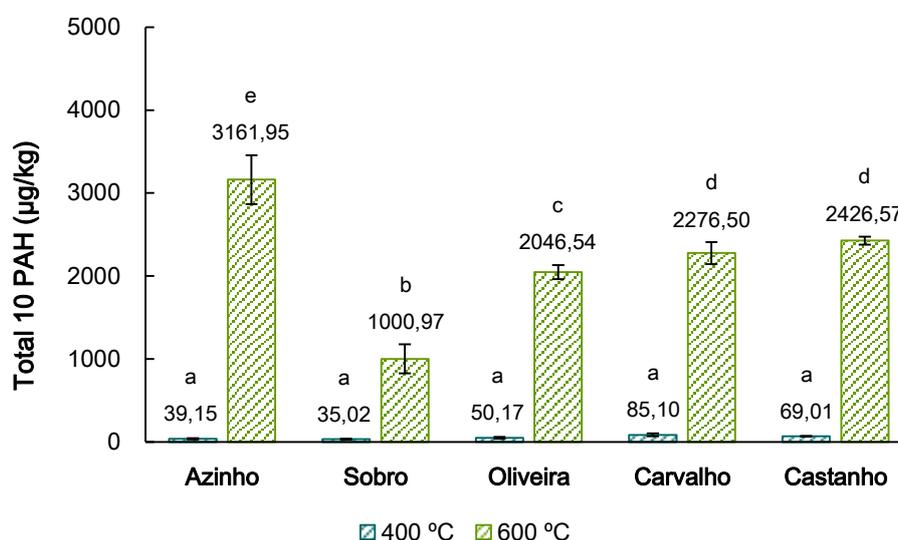
### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Perfil de PAH nos condensados de fumo

A análise de variâncias, cujos resultados são apresentados na Figura 31 e Tabela A.6 do Apêndice, mostram a existência de diferenças muito significativas ( $p < 0,001$ ) no teor em PAH em função do tipo de madeira e da temperatura de combustão. Ainda que se tenha registado uma elevada significância associada aos dois factores individuais e à sua interacção, a temperatura destacou-se como sendo o mais preponderante na composição dos condensados de fumo, no que se relaciona com o teor em PAH. A combustão da madeira a temperaturas elevadas (600 °C), teve como principal consequência o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) destes contaminantes como se comprova pela Figura 32 e pela Tabela 17.



**Figura 31.** Efeito dos factores principais considerados na análise de variância dos teores dos 10 PAH (µg/kg) determinados nos condensados de fumo. Barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (i) Temperatura e (ii) Madeira.



**Figura 32.** Teor total dos 10 PAH (µg/kg) determinados nos condensados de fumo produzidos. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

No conjunto dos compostos estudados, o BghiP e o IP, foram especialmente afectados. De acordo com dados da Tabela 17 verifica-se que, nos extractos produzidos a baixa temperatura (400 °C) o IP apenas foi encontrado nos condensados do castanheiro (0,02 µg/kg), por oposição aos homólogos produzidos a 600 °C, cujos níveis foram repetidamente próximos, ou até mesmo, superiores a 100 µg/kg. Uma situação análoga foi identificada para o BghiP nestes últimos condensados para os quais se quantificaram entre 8,37 e 12,93 µg/kg (sobro e azinho, respectivamente) e 73,37, 82,73 e 87,79 µg/kg (na oliveira, carvalho e castanheiro, respectivamente), sendo que nos condensados produzidos a baixa temperatura o teor médio máximo foi de 0,48 µg/kg (carvalho). Em termos gerais, o incremento da temperatura em 200 °C culminou num incremento pronunciado tanto dos compostos que compõem o indicador PAH4

(entre 10 e 200 vezes, no carvalho e azinho, respectivamente), bem como dos compostos designados pesados (onde o aumento verificado oscilou entre 200 e mais de 1000 vezes, verificados no sobre e azinho, pela mesma ordem).

O tratamento estatístico evidenciou ainda efeitos muito significativos ( $p < 0,001$ ) dependendo da madeira testada, bem como à respectiva interacção dos factores. Em qualquer dos casos, as maiores diferenças registaram-se quase exclusivamente nos condensados de fumo gerados à temperatura mais elevada. A partir da Figura 32, onde se mostram os teores totais médios dos 10 PAH determinados para os vários condensados obtidos a 600 °C, verifica-se que os tipos de madeira podem ser ordenados, por ordem crescente de contaminação, da seguinte forma: sobre < oliveira < carvalho < castanho < azinho. A referida sequência foi notada não apenas para o somatório dos 10 PAH analisados, mas igualmente para a generalidade dos compostos individuais. Quando são consideradas somente as madeiras usadas tradicionalmente na região do Alentejo, ou seja, o azinho e o sobre, verifica-se que o primeiro originou maiores quantidades de PAH (3161,95 µg/kg), comparativamente ao segundo (1000,97 µg/kg). Na verdade, os condensados produzidos a partir da pirólise de azinho a 600 °C apresentaram, reiteradamente, níveis de contaminação superiores ( $p < 0,05$ ) às restantes madeiras avaliadas, onde apenas o BghiP e IP foram excepção. Esta evidência mostrou-se transversal à maioria dos compostos individuais, mas também aos grupos considerados, nomeadamente no que se refere aos PAH pesados, que no azinho totalizaram mais de 900 µg/kg (Tabela 17). Apesar deste facto, os teores de BghiP e IP detectados no azinho revelaram-se significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) aos da oliveira, carvalho e castanho. Nos restantes condensados obtidos a 600 °C, os teores médios de PAH pesados variaram entre 284,24 e 688,52 µg/kg quantificados no sobre e castanho, pela mesma ordem. No que respeita às madeiras habitualmente usadas em Trás-os-Montes, estas apresentaram teores totais de PAH intermédios, relativamente ao azinho e sobre, onde se quantificaram 2046,54; 2276,50 e 2426,57 µg/kg quantificados na oliveira, carvalho e castanho, respectivamente. De resto, para os condensados resultantes da combustão a 400 °C, as únicas diferenças foram determinadas para os teores BaA, decorrentes da combustão de carvalho e castanho (43,50 e 43,81 µg/kg, respectivamente) que, como o demonstra a Tabela 17, se superiorizaram ( $p < 0,05$ ) aos níveis médios das restantes amostras (que variaram entre 2,16 e 16,92 µg/kg quantificados, pela mesma ordem, nos condensados de azinho e oliveira).

**Tabela 17.** Teores médios em PAH (em µg/kg, sob a forma média ± DP) nos condensados de fumo líquido.

	Azinho		Sobro		Oliveira		Carvalho		Castanho	
	400 °C	600 °C	400 °C	600 °C	400 °C	600 °C	400 °C	600 °C	400 °C	600 °C
<i>FA</i>	14,54 <sup>a</sup> ± 2,84	1027,17 <sup>e</sup> ± 169,35	14,48 <sup>a</sup> ± 1,60	323,34 <sup>b</sup> ± 17,54	19,73 <sup>a</sup> ± 3,04	665,65 <sup>c</sup> ± 21,57	25,66 <sup>a</sup> ± 3,05	716,71 <sup>c,d</sup> ± 68,90	14,64 <sup>a</sup> ± 0,52	774,57 <sup>d</sup> ± 20,40
<i>PY</i>	20,63 <sup>a</sup> ± 3,58	716,53 <sup>e</sup> ± 71,04	12,18 <sup>a</sup> ± 0,95	191,74 <sup>b</sup> ± 17,46	8,67 <sup>a</sup> ± 0,31	575,47 <sup>c</sup> ± 5,37	10,32 <sup>a</sup> ± 2,47	658,08 <sup>d</sup> ± 55,23	6,77 <sup>a</sup> ± 0,17	664,15 <sup>d</sup> ± 12,86
<i>BaA</i>	2,16 <sup>a</sup> ± 0,26	278,38 <sup>f</sup> ± 29,42	4,07 <sup>a</sup> ± 0,46	107,08 <sup>c</sup> ± 34,55	16,92 <sup>a</sup> ± 7,55	134,45 <sup>d</sup> ± 14,85	43,50 <sup>b</sup> ± 11,56	152,05 <sup>d,e</sup> ± 5,84	43,81 <sup>b</sup> ± 4,00	156,73 <sup>e</sup> ± 4,30
<i>CHR</i>	1,14 <sup>a</sup> ± 0,29	210,99 <sup>d</sup> ± 42,37	2,95 <sup>a</sup> ± 0,54	94,57 <sup>b</sup> ± 24,58	4,70 <sup>a</sup> ± 0,20	121,72 <sup>c</sup> ± 16,79	3,99 <sup>a</sup> ± 0,92	133,96 <sup>c</sup> ± 2,91	2,73 <sup>a</sup> ± 0,26	142,60 <sup>c</sup> ± 5,65
<i>BbFA</i>	ND	161,83 <sup>d</sup> ± 29,46	0,36 <sup>a</sup> ± 0,52	60,38 <sup>b</sup> ± 21,43	ND	65,52 <sup>b,c</sup> ± 7,77	0,26 <sup>a</sup> ± 0,23	72,08 <sup>b,c</sup> ± 0,64	ND	77,65 <sup>c</sup> ± 1,95
<i>BkFA</i>	ND	75,45 <sup>e</sup> ± 16,56	0,15 <sup>a</sup> ± 0,22	26,86 <sup>b</sup> ± 9,44	ND	41,96 <sup>c</sup> ± 3,40	0,28 <sup>a</sup> ± 0,24	48,00 <sup>c,d</sup> ± 0,62	ND	51,56 <sup>d</sup> ± 0,77
<i>BaP</i>	0,20 <sup>a</sup> ± 0,04	171,78 <sup>e</sup> ± 38,73	0,15 <sup>a</sup> ± 0,15	55,82 <sup>b</sup> ± 23,81	ND	114,86 <sup>c</sup> ± 6,86	ND	133,35 <sup>c,d</sup> ± 0,95	ND	140,92 <sup>d</sup> ± 2,88
<i>DBahA</i>	0,48 <sup>a</sup> ± 0,14	411,74 <sup>d</sup> ± 127,23	0,69 <sup>a</sup> ± 0,25	103,12 <sup>b</sup> ± 56,58	ND	125,32 <sup>b,c</sup> ± 10,49	0,52 <sup>a</sup> ± 0,61	149,14 <sup>b,c</sup> ± 2,92	1,04 <sup>a</sup> ± 0,51	181,06 <sup>c</sup> ± 5,66
<i>BghiP</i>	ND	12,93 <sup>c</sup> ± 2,56	ND	8,37 <sup>b</sup> ± 3,24	ND	73,37 <sup>d</sup> ± 3,32	0,48 <sup>a</sup> ± 0,54	82,73 <sup>e</sup> ± 2,17	ND	89,79 <sup>f</sup> ± 1,00
<i>IP</i>	ND	95,16 <sup>c</sup> ± 22,16	ND	29,69 <sup>b</sup> ± 12,31	ND	128,22 <sup>d</sup> ± 11,80	ND	130,40 <sup>d</sup> ± 1,32	ND	147,55 <sup>e</sup> ± 4,87
<i>4 PAH leves<sup>1</sup></i>	38,47 <sup>a</sup> ± 6,80	2233,07 <sup>e</sup> ± 214,48	33,67 <sup>a</sup> ± 3,39	716,73 <sup>b</sup> ± 59,36	50,02 <sup>a</sup> ± 10,57	1497,29 <sup>c</sup> ± 49,08	83,47 <sup>a</sup> ± 16,82	1660,80 <sup>d</sup> ± 132,82	67,95 <sup>a</sup> ± 3,55	1738,05 <sup>d</sup> ± 41,95
<i>PAH pesados<sup>2</sup></i>	0,68 <sup>a</sup> ± 0,17	928,89 <sup>e</sup> ± 2235,80	1,35 <sup>a</sup> ± 0,94	284,24 <sup>b</sup> ± 116,57	ND	549,25 <sup>c</sup> ± 36,55	1,55 <sup>a</sup> ± 1,57	615,70 <sup>c,d</sup> ± 0,94	1,13 <sup>a</sup> ± 0,49	688,52 <sup>d</sup> ± 8,22
<i>PAH4<sup>3</sup></i>	3,51 <sup>a</sup> ± 0,53	822,98 <sup>e</sup> ± 131,56	7,53 <sup>a</sup> ± 1,22	317,85 <sup>b</sup> ± 104,00	21,62 <sup>a</sup> ± 7,37	436,55 <sup>c</sup> ± 46,26	47,84 <sup>a</sup> ± 11,81	491,44 <sup>c,d</sup> ± 9,50	46,54 <sup>a</sup> ± 4,06	517,89 <sup>d</sup> ± 13,59

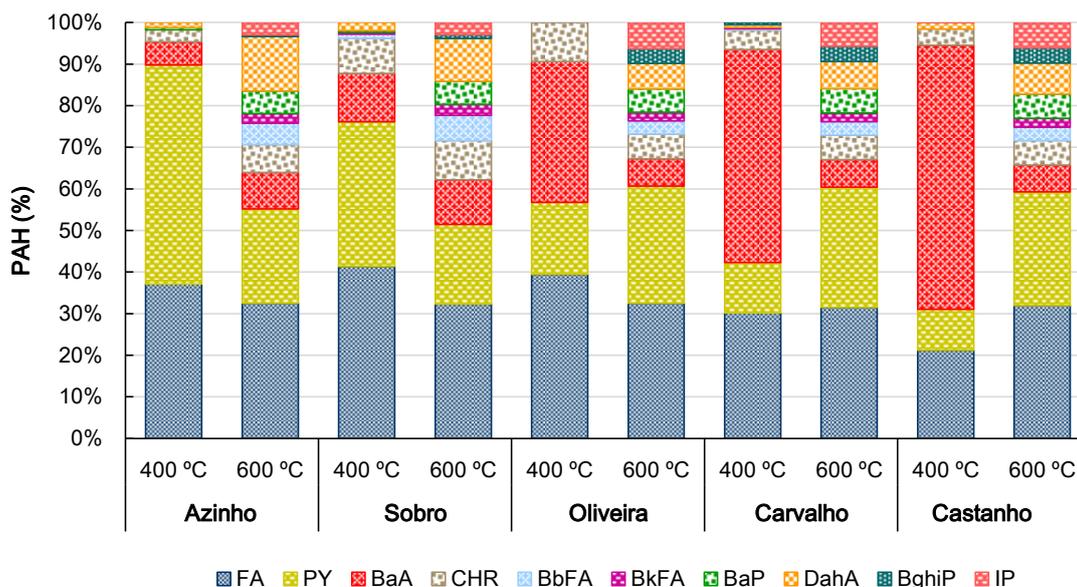
Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

<sup>1</sup> O teor em PAH leves corresponde ao conjunto dos teores individuais de FA, PY, BaA e CHR.

<sup>2</sup> O teor em PAH pesados corresponde ao conjunto dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBahA, BghiP e IP.

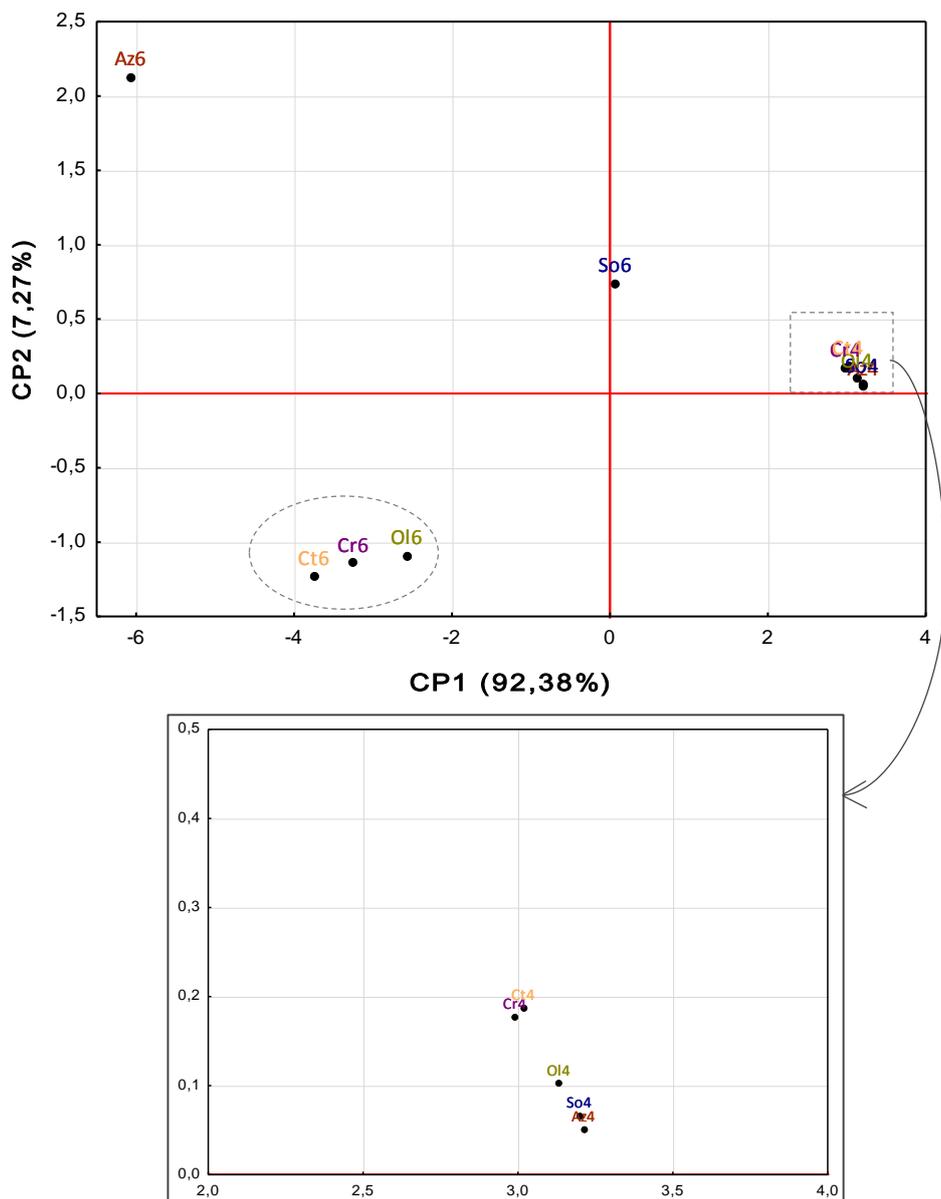
<sup>3</sup> O teor em PAH4 corresponde ao conjunto dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

A contribuição relativa de cada um dos PAH para o teor total dos 10 PAH, consiste também num aspecto de grande interesse, sendo por isso também considerada nesta análise. Os resultados obtidos estão representados na Figura 33. Os condensados produzidos a baixas temperaturas denotaram uma grande preponderância dos compostos denominados leves (entre 96 e 100%), sendo que o FA, PY e BaA foram os compostos que mais se destacaram. No caso do azinho, por exemplo, o PY sozinho equivaleu a aproximadamente 53% (20,63 µg/kg, Tabela 17) do total de PAH quantificado. Já no sobro e na oliveira, em termos relativos, o mais abundante foi o FA com 41% (14,48 µg/kg) e 39% (19,73 µg/kg), respectivamente. O BaA, por sua vez, apresentou geralmente uma grande prevalência nos condensados produzidos a partir das madeiras tipicamente transmontanas em geral, mas em particular no carvalho (51%) e no castanho (63%), onde este revelou ser o contaminante mais abundante. Nestes condensados, o teor em BaA oscilou entre 16,92 e 43,50 µg/kg (pela mesma ordem na oliveira e carvalho). Nos condensados de azinho e sobro gerados a baixa temperatura, os níveis médios deste contaminante equivaleram, pela mesma ordem, a 2,16 e 4,07 µg/kg. Em contrapartida, quando a pirólise da madeira decorreu a 600 °C, por sua vez, os teores de BaA ascenderam a 278,38; 107,08; 134,45; 152,05 e 156,73 µg/kg no azinho, sobro, oliveira, carvalho e castanho, respectivamente. Relativamente aos PAH pesados, o DBaA, quando presente nos condensados obtidos a 400 °C, foi o que se encontrou em maiores quantidades, contribuindo com cerca de 1 a 2% do conjunto dos 10 PAH. Nos condensados produzidos a 600 °C, o teor relativo dos PAH pesados aumentou consideravelmente ( $p < 0,05$ ) passando a representar entre 27 e 29%, independentemente da madeira utilizada. Também aqui o DBaA se destacou, sendo globalmente o mais prevalente, com teores entre 103,12 e 411,74 µg/kg (sobro e azinho, respectivamente) representando entre 7 e 10% do teor total de PAH. Como evidencia a Figura 33 este composto mostrou-se mais prevalente nas madeiras alentejanas (azinho e sobro), comparativamente às transmontanas (oliveira, carvalho e castanho). Na verdade, no caso da oliveira, o IP com 128,22 µg/kg superou o DBaA com 125,32 µg/kg, correspondendo a mais de 6% do total de PAH. Quantidades assinaláveis ( $p < 0,05$ ) de BaP foram igualmente determinadas nos condensados de fumo produzidos a 600 °C, relativamente aos homólogos obtidos a baixa temperatura. Para estes últimos, de facto, o BaP só foi identificado no azinho e no sobro (0,20 e 0,15 µg/kg). No que se refere aos condensados cuja pirólise decorreu à temperatura mais elevada o BaP totalizou 171,78, 55,82, 114,86, 133,35, 140,92 µg/kg (Tabela 17, pela mesma ordem, no azinho, sobro, oliveira, carvalho e castanho).



**Figura 33.** Perfil de PAH dos condensados de fumo.

Da análise de componentes principais (ACP) extraíram-se 2 componentes principais (CP) que, no total, descrevem 99,65% da variância verificada (Figura 34), sendo que o CP1 explica 92,38% da variação constatada. Este componente integra todos os PAH estudados e respectivos grupos (leves, pesados, PAH4 e total), com excepção do BghiP que integra a CP2 (7,27%). Efectivamente, a projecção apresentada na Figura 34, permite constatar que a CP1 explica o grau de contaminação dos condensados, sendo que este diminui com o aumento da abcissa. A referida projecção destaca ainda a forte correlação entre os condensados de oliveira, carvalho e castanho gerados a 600 °C, bem como a semelhança encontrada nos condensados produzidos a 400 °C, independentemente da madeira considerada.



**Figura 34.** Projecção da análise de componentes principais para os condensados de fumo produzidos. As abreviaturas que designam as amostras são compostas por duas letras que identificam o tipo de madeira: Az (azinho), So (sobro), Ol (oliveira), Cr (carvalho) e Ct (castanho) e, por último, o algarismo 4 ou 6 que corresponde à temperatura da combustão (400 °C e 600 °C, respectivamente).

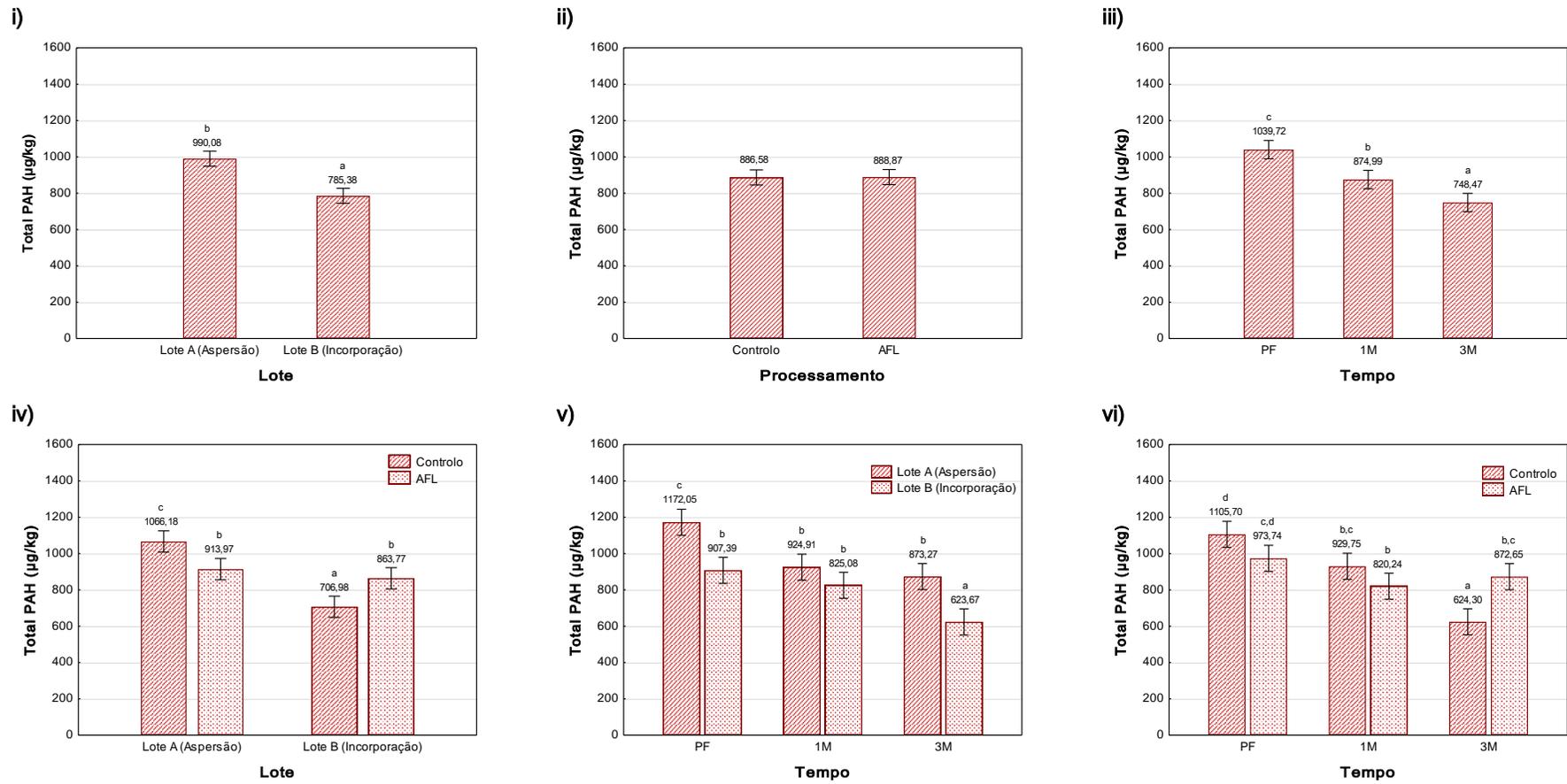
#### 4.3.2. Perfil de PAH no chouriço de carne

Do conjunto de 10 PAH estudados no aroma de fumo usado para o processamento dos enchidos apenas se identificaram 4 PAH todos eles leves: FA (215,93 µg/kg), PY (134,54 µg/kg), BaA (31,79 µg/kg) e CHR (10,13 µg/kg).

O tratamento estatístico efectuado considerou as diferenças relacionadas com o processamento de lotes independentes (nomeadamente devido às características da matéria-prima e do processo de secagem, Lotes A e B), a tecnologia de processamento (“Controlo” e “AFL”) e do tempo de armazenamento (“PF”, “1M” e “3M”). Da Figura 35 e da Tabela A.7 (do Apêndice)

constam os dados relativos à significância de cada um destes factores e respectivas interacções (de 1ª e 2ª ordem) sobre todos os PAH estudados, com excepção do DBahA e do BghiP que nunca foram detectados nas nossas amostras. De acordo com estes dados, em termos globais, tanto os três factores individuais como as suas interacções revelaram ter um efeito significativo ( $p < 0,05$ ).

O tipo de processamento, no entanto, demonstrou ser o mais preponderante para a generalidade dos PAH estudados, mas em especial para o AN, AC, PHE, CHR e PY, por ordem decrescente de importância. Os enchidos processados com aroma de fumo líquido ("PF") apresentaram de forma bastante consistente teores de PAH inferiores ( $p < 0,05$ ) aos homólogos fumados. No caso do AN, por exemplo, esta tecnologia alternativa permitiu reduzir em 1,90 µg/kg no "PF" do Lote A (mais de 70%) e 5,79 µg/kg no lote B (cerca de 83%) relativamente às amostras "Controlo" que continham, pela mesma ordem 2,69 e 7,01 µg/kg (Tabela 18). No que respeita ao AC, o nível de contaminação diminuiu em cerca de 77 e 100% nos lotes B e A, respectivamente. Já no caso dos PAH pesados as diferenças entre as amostras "Controlo" e "AFL" mostraram-se ainda mais acentuadas ( $p < 0,05$ ). Sempre que as amostras foram processadas com aroma de fumo não foram detectados quaisquer PAH pesados, por oposição aos produtos expostos ao fumo que totalizaram 0,20 µg/kg no Lote A e 0,63 µg/kg no Lote B, como se atesta na Tabela 18. Relativamente ao BaA e o CHR, a utilização desta metodologia revelou-se igualmente benéfica na medida em que possibilitou a redução do primeiro entre 0,55 e 0,60 µg/kg e do último entre 0,51 e 1,24 µg/kg. A tendência aqui verificada impulsionou uma importante redução do teor em PAH4 de 1,82 para 0,61 µg/kg no Lote A e de 2,81 para 0,54 µg/kg.



**Figura 35.** Efeito dos factores principais e respectivas interacções de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores em PAH (µg/kg) determinados no chouriço de carne.

Barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

(i) Lote, (ii) Processamento, (iii) Tempo, (iv) Lote x Processamento, (v) Lote x Tempo e (vi) Processamento x Tempo (vi).

Os resultados mostram diferenças ( $p < 0,05$ ) notórias entre os dois lotes de produção tanto nas amostras processadas com aroma de fumo líquido, bem como nas que tinham sido sujeitas a fumagem. De entre os catorze compostos identificados no produto final sujeito a fumagem (“Controlo\_PF”), para dez deles, os teores mais elevados ( $p < 0,05$ ) foram detectados naquelas do Lote B. Deste grupo fazem parte não só alguns PAH leves (AC, FL, PHE, AN, PY e CHR), mas também PAH pesados (BkFA, BaP, IP). As maiores discrepâncias, todavia, surgiram nos compostos de menor peso molecular, como o AC e PHE. Quando os teores destes dois compostos nas amostras “Controlo” são comparados verifica-se que os níveis de AC e PHE no Lote B (43,94 e 30,13  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , pela mesma ordem) superaram, respectivamente, em cerca de dezoito e doze vezes, aqueles que foram quantificados no Lote A (2,32 e 2,40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , pela mesma ordem). No que respeita aos PAH pesados, as maiores diferenças ( $p < 0,05$ ) registaram-se no teor BaP que, no Lote A, correspondeu a 0,07  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , enquanto no Lote B estes ascenderam a 0,33  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Por sua vez, através da comparação dos resultados obtidos para as duas metodologias utilizadas para a aplicação do aroma de fumo líquido, observa-se que a incorporação deste ingrediente directamente na massa originou menores ( $p < 0,05$ ) teores de NA e ACL, com consequências directas sobre os níveis de PAH leves e total de PAH, que seguiram a mesma tendência. Para o NA, por exemplo, quantificaram-se menos 149,24  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , enquanto o ACL registou uma diminuição de 80,24  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cujo somatório perfaz menos 229,48  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , que em termos relativos corresponde a cerca de 20% do total de PAH quantificados nas amostras onde o aroma de fumo líquido foi aplicado à superfície.

Relativamente ao tempo de armazenamento, o seu efeito ( $p < 0,05$ ) fez-se notar sobre todos os PAH estudados, com excepção do PY. Como se mostra na Tabela 18, os dados recolhidos demonstram que o tempo de armazenamento teve um efeito positivo na redução do grau de contaminação das amostras. De facto, as maiores alterações ( $p < 0,05$ ) nos níveis do total de PAH foram determinadas pelo tempo de armazenamento, mas apenas nas amostras sujeitas a fumagem. Para ambos os lotes processados o teor total de PAH foi substancialmente reduzido após um período de armazenamento de três meses. No caso do Lote A, e de acordo com os dados que constam da Tabela 18 o decréscimo foi de 398,85  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (de 1262,61  $\mu\text{g}/\text{kg}$  quantificados no “PF” para 863,61  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), enquanto no Lote B foi 558,59  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (inicialmente de 953,52  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para 394,93  $\mu\text{g}/\text{kg}$  no final dos três meses). No que aos compostos individuais diz respeito, o AC foi uma vez mais o mais afectado, tal como se verificou, por exemplo nos produtos “Controlo” do Lote B, para os quais se registou uma diminuição próxima de 90% (de 43,94  $\mu\text{g}/\text{kg}$  no “PF” para 4,89  $\mu\text{g}/\text{kg}$  após 3 meses de armazenamento, Tabela 18). Este efeito estendeu-se também aos PAH de elevado peso molecular os quais frequentemente, após 3 meses de armazenamento, ou até por vezes mais cedo, deixaram de ser detectados nas amostras. Este foi, aliás, o caso do BbFA, BkFA e IP nas amostras “Controlo” do Lote A que embora tenham sido detectados logo após a conclusão do processamento (0,08; 0,02 e 0,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente), já não foram identificados nos produtos após 1 e 3 meses de armazenamento.

Entre as interações, observou-se geralmente um efeito ( $p < 0,05$ ) positivo promovendo a redução do nível de contaminação dos produtos. Para a interação “Lote x Produto”, as diferenças encontradas entre as amostras “Controlo” e “AFL” acentuaram-se nos produtos do Lote B, alavancadas pelos maiores níveis de PAH determinados nas amostras sujeitas a fumagem. No que respeita à interação “Lote x Tempo”, quando se detectaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no produto final (“PF”) entre os dois lotes, estas tenderam a diminuir ao longo do tempo, em resultado do decréscimo mais acentuado dos enchidos do Lote B relativamente ao Lote A. De igual forma, a interação “Produto x Tempo” reflectiu-se na redução das diferenças encontradas entre os produtos “Controlo” e “AFL”, suportada pelo decréscimo mais acentuado do teor em PAH quantificado nos primeiros. Considerando que cada amostra analisada resulta da combinação simultânea de um lote, tipo de processamento e tempo de armazenamento específicos, a interação tripla foi também estudada e a sua significância incluída na Tabela A.7 incluída no Apêndice. Com base nos dados que constam da Tabela 18, foi possível identificar um padrão comum para o AC, PHE, AN, CHR, BbFA e PAH pesados com as amostras “AFL” e “Controlo” a apresentarem níveis razoavelmente estáveis ao longo do período de armazenamento, muito embora os primeiros se mostrem tendencialmente menos contaminados. Já no chouriço de carne “Controlo” do Lote B, além de teores de PAH significativamente ( $p < 0,05$ ) mais elevados no “PF”, este denotou uma redução substancial dos seus níveis de contaminação.

**Tabela 18.** Evolução do teor em PAH (em µg/kg, sob a forma média ± DP) ao longo do tempo de armazenamento.

	Lote A (Aspersão)					
	"Controlo"			"AFL"		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
<i>ACL</i>	373,85 <sup>d</sup> ± 49,73	324,89 <sup>c,d</sup> ± 61,96	229,60 <sup>a,b</sup> ± 50,97	376,25 <sup>d</sup> ± 34,49	283,81 <sup>b,c</sup> ± 39,08	272,98 <sup>b,c</sup> ± 16,58
<i>NA</i>	825,68 <sup>f</sup> ± 80,38	697,20 <sup>e,f</sup> ± 39,69	578,74 <sup>c,d,e</sup> ± 128,58	673,91 <sup>d,e,f</sup> ± 24,83	483,89 <sup>c,d</sup> ± 43,92	574,84 <sup>c,d,e</sup> ± 40,95
<i>AC</i>	2,59 <sup>a</sup> ± 0,74	2,22 <sup>a</sup> ± 0,42	2,96 <sup>a,b</sup> ± 1,47	ND	ND	ND
<i>FL</i>	38,09 <sup>c</sup> ± 1,39	33,57 <sup>c</sup> ± 3,41	34,09 <sup>c</sup> ± 6,11	21,84 <sup>b</sup> ± 0,25	1,46 <sup>a</sup> ± 0,07	23,31 <sup>b</sup> ± 0,44
<i>PHE</i>	4,95 <sup>b,c</sup> ± 0,98	2,41 <sup>a,b</sup> ± 0,47	2,90 <sup>a,b</sup> ± 1,48	0,29 <sup>a,b</sup> ± 0,01	0,57 <sup>a</sup> ± 0,10	0,61 <sup>a</sup> ± 0,02
<i>AN</i>	2,69 <sup>b</sup> ± 0,18	2,41 <sup>b</sup> ± 0,02	2,82 <sup>b</sup> ± 0,19	0,79 <sup>a</sup> ± 0,05	0,59 <sup>a</sup> ± 0,05	0,80 <sup>a</sup> ± 0,06
<i>FA</i>	9,14 <sup>e,f</sup> ± 0,04	4,93 <sup>b</sup> ± 0,05	7,87 <sup>e,f</sup> ± 0,24	6,05 <sup>b,c,d</sup> ± 1,24	4,76 <sup>b</sup> ± 1,57	7,45 <sup>c,d,e</sup> ± 1,20
<i>PY</i>	3,75 <sup>b</sup> ± 0,11	3,43 <sup>b</sup> ± 0,68	3,56 <sup>b</sup> ± 0,15	1,74 <sup>a</sup> ± 0,12	1,59 <sup>a</sup> ± 0,29	2,26 <sup>a</sup> ± 0,04
<i>BaA</i>	0,89 <sup>f</sup> ± 0,04	0,51 <sup>c,d</sup> ± 0,07	0,48 <sup>b,c,d</sup> ± 0,03	0,34 <sup>a,b,c,d</sup> ± 0,05	0,61 <sup>d,e,f</sup> ± 0,26	0,49 <sup>c,d</sup> ± 0,16
<i>CHR</i>	0,78 <sup>d,e</sup> ± 0,05	0,68 <sup>c,d</sup> ± 0,05	0,56 <sup>c,d</sup> ± 0,03	0,27 <sup>a,b</sup> ± 0,02	0,23 <sup>a,b</sup> ± 0,04	0,21 <sup>a,b</sup> ± 0,02
<i>BbFA</i>	0,08 <sup>b</sup> ± 0,01	ND	ND	ND	ND	ND
<i>BkFA</i>	0,02 <sup>b</sup> ± 0,00	ND	ND	ND	ND	ND
<i>BaP</i>	0,07 <sup>a</sup> ± 0,01	0,06 <sup>a</sup> ± 0,00	0,05 <sup>a</sup> ± 0,01	ND	ND	ND
<i>IP</i>	0,03 <sup>b</sup> ± 0,00	ND	ND	ND	ND	ND
<i>PAH leves</i> <sup>1</sup>	1262,42 <sup>d</sup> ± 131,53	1072,26 <sup>c,d</sup> ± 103,50	863,57 <sup>b,c</sup> ± 187,71	1081,48 <sup>c,d</sup> ± 57,79	777,51 <sup>b</sup> ± 82,79	882,93 <sup>b,c,d</sup> ± 39,28
<i>PAH pesados</i> <sup>2</sup>	0,20 <sup>c</sup> ± 0,02	0,06 <sup>a,b</sup> ± 0,00	0,05 <sup>a,b</sup> ± 0,01	ND	ND	ND
<i>PAH<sub>4</sub></i> <sup>3</sup>	1,82 <sup>d,e</sup> ± 0,04	1,25 <sup>c,d</sup> ± 0,12	1,09 <sup>b,c</sup> ± 0,03	0,61 <sup>a,b</sup> ± 0,04	0,84 <sup>a,b,c</sup> ± 0,27	0,70 <sup>a,b,c</sup> ± 0,18
<i>Total PAH</i>	1262,61 <sup>d</sup> ± 131,51	1072,32 <sup>c,d</sup> ± 103,50	863,61 <sup>b,c</sup> ± 187,71	1081,48 <sup>c,d</sup> ± 57,79	777,51 <sup>b</sup> ± 82,79	882,93 <sup>b,c</sup> ± 39,28

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

<sup>1</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

<sup>2</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, e IP.

<sup>3</sup> O teor em PAH<sub>4</sub> foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

Tabela 18. (Continuação)

	Lote B (Incorporação)					
	"Controlo"			"AFL"		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
<i>ACL</i>	322,56 <sup>c,d</sup> ± 24,49	346,79 <sup>c,d</sup> ± 17,18	186,04 <sup>a</sup> ± 24,41	296,01 <sup>b,c,d</sup> ± 5,44	295,37 <sup>b,c,d</sup> ± 15,68	295,93 <sup>b,c,d</sup> ± 12,86
<i>NA</i>	432,49 <sup>c</sup> ± 23,21	275,05 <sup>a,b</sup> ± 15,54	109,00 <sup>a</sup> ± 12,70	524,67 <sup>c,d,e</sup> ± 3,00	520,67 <sup>c,d,e</sup> ± 73,39	517,77 <sup>c,d,e</sup> ± 55,11
<i>AC</i>	44,48 <sup>e</sup> ± 1,53	34,91 <sup>d</sup> ± 3,18	6,20 <sup>b</sup> ± 1,91	10,10 <sup>c</sup> ± 1,33	11,95 <sup>c</sup> ± 1,55	11,30 <sup>c</sup> ± 0,66
<i>FL</i>	99,00 <sup>f</sup> ± 0,38	82,22 <sup>e</sup> ± 9,91	59,17 <sup>d</sup> ± 6,68	19,97 <sup>b</sup> ± 1,65	21,26 <sup>b</sup> ± 1,04	23,39 <sup>b</sup> ± 0,42
<i>PHE</i>	30,13 <sup>f</sup> ± 1,90	27,65 <sup>f</sup> ± 1,91	19,07 <sup>e</sup> ± 3,83	7,75 <sup>c,d</sup> ± 0,37	8,64 <sup>d</sup> ± 0,16	8,24 <sup>c,d</sup> ± 0,16
<i>AN</i>	7,01 <sup>e</sup> ± 0,72	5,84 <sup>d</sup> ± 0,46	4,37 <sup>c</sup> ± 0,87	0,99 <sup>a</sup> ± 0,03	1,16 <sup>a</sup> ± 0,06	1,08 <sup>a</sup> ± 0,01
<i>FA</i>	9,83 <sup>f</sup> ± 1,31	8,40 <sup>e,f</sup> ± 0,43	5,63 <sup>b,c</sup> ± 1,40	2,36 <sup>a</sup> ± 0,02	2,21 <sup>a</sup> ± 0,08	1,97 <sup>a</sup> ± 0,40
<i>PY</i>	5,08 <sup>c</sup> ± 0,71	4,33 <sup>b,c</sup> ± 0,27	3,70 <sup>b</sup> ± 1,06	1,72 <sup>a</sup> ± 0,11	1,49 <sup>a</sup> ± 0,10	2,05 <sup>a</sup> ± 0,47
<i>BaA</i>	0,83 <sup>e,f</sup> ± 0,13	0,56 <sup>d,e</sup> ± 0,12	0,60 <sup>d,e,f</sup> ± 0,19	0,22 <sup>a,b,c</sup> ± 0,09	0,14 <sup>a</sup> ± 0,03	0,19 <sup>a,b</sup> ± 0,02
<i>CHR</i>	1,48 <sup>a</sup> ± 0,23	1,10 <sup>f</sup> ± 0,09	0,99 <sup>e,f</sup> ± 0,30	0,08 <sup>a</sup> ± 0,02	0,09 <sup>a</sup> ± 0,02	0,44 <sup>b,c</sup> ± 0,01
<i>BbFA</i>	0,17 <sup>c</sup> ± 0,04	0,07 <sup>b</sup> ± 0,02	ND	ND	ND	ND
<i>BkFA</i>	0,05 <sup>c</sup> ± 0,01	0,02 <sup>b</sup> ± 0,01	0,01 <sup>a</sup> ± 0,01	ND	ND	ND
<i>BaP</i>	0,33 <sup>c</sup> ± 0,04	0,22 <sup>b</sup> ± 0,02	0,16 <sup>b</sup> ± 0,11	ND	ND	ND
<i>IP</i>	0,08 <sup>c</sup> ± 0,02	0,02 <sup>a,b</sup> ± 0,02	ND	ND	ND	ND
<i>PAH leves</i> <sup>1</sup>	952,90 <sup>b,c</sup> ± 54,16	786,85 <sup>b</sup> ± 173,59	394,76 <sup>a</sup> ± 22,53	863,89 <sup>b,c</sup> ± 5,18	862,97 <sup>b,c</sup> ± 87,52	862,36 <sup>b,c</sup> ± 67,27
<i>PAH pesados</i> <sup>2</sup>	0,63 <sup>e</sup> ± 0,11	0,33 <sup>d</sup> ± 0,06	0,17 <sup>b,c</sup> ± 0,12	ND	ND	ND
<i>PAH</i> <sup>3</sup>	2,81 <sup>f</sup> ± 0,43	1,96 <sup>e</sup> ± 0,23	1,75 <sup>d,e</sup> ± 0,61	0,30 <sup>a</sup> ± 0,11	0,23 <sup>a</sup> ± 0,03	0,63 <sup>a,b</sup> ± 0,03
<i>Total PAH</i>	953,52 <sup>b,c</sup> ± 54,27	787,18 <sup>b</sup> ± 173,53	394,93 <sup>a</sup> ± 22,41	863,89 <sup>b,c</sup> ± 5,18	862,97 <sup>b,c</sup> ± 87,52	862,36 <sup>b,c</sup> ± 67,27

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

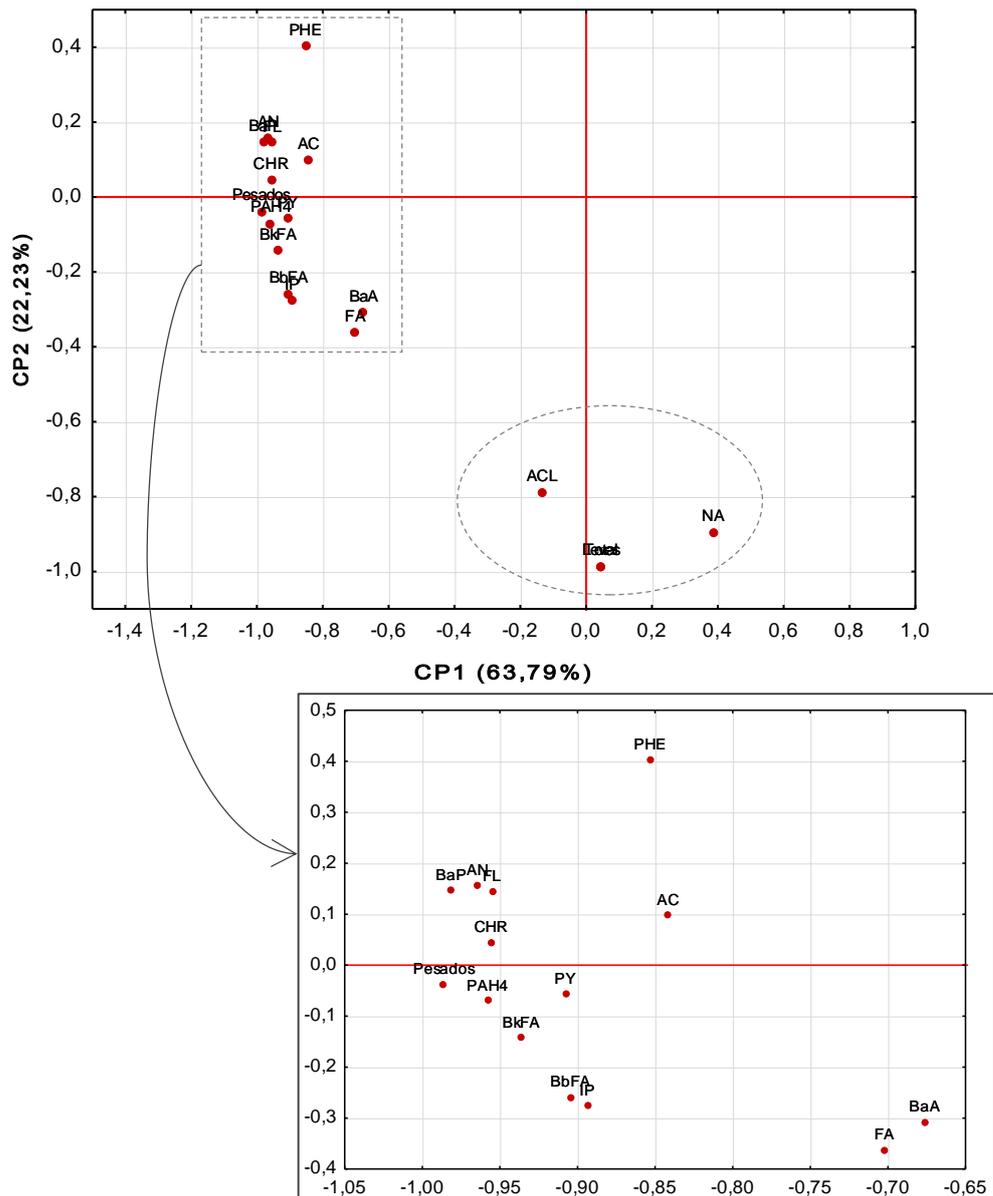
<sup>1</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

<sup>2</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, e IP.

<sup>3</sup> O teor em PAH4 foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

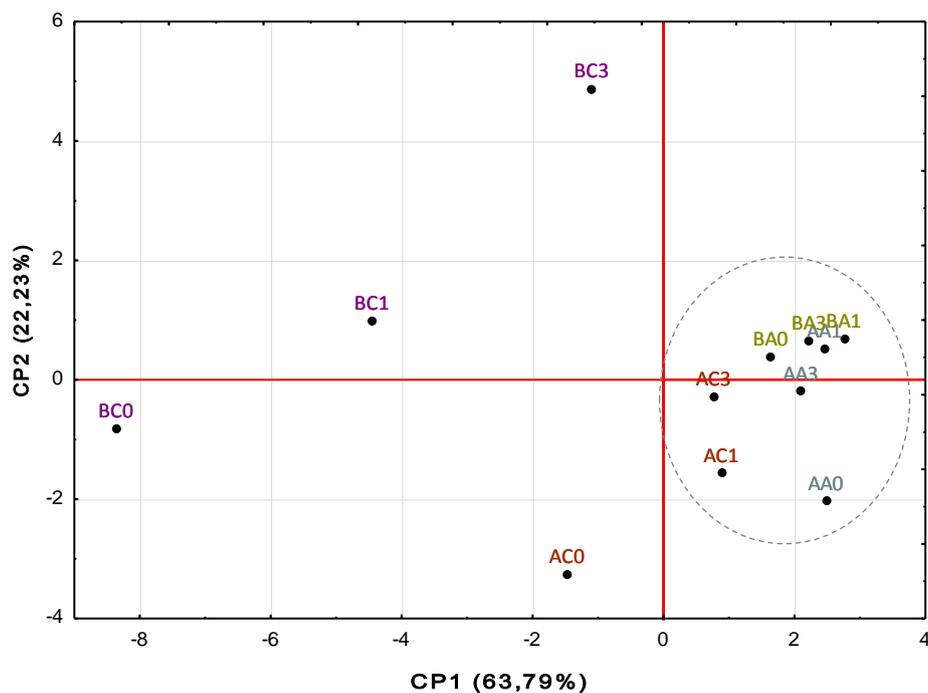
Considerando o conjunto de PAH estudados verificou-se que o ACL (186,04 e 376,25 µg/kg) e o NA (109,00 e 825,68 µg/kg) se destacaram com concentrações claramente superiores às dos restantes compostos correspondendo, pela mesma ordem, entre 26 e 47% e entre 28 e 68%. Em conjunto, estes dois contaminantes totalizaram entre 75 e 99%, sendo por isso aqueles que mais contribuíram para o somatório de todos PAH, bem como para o conjunto dos PAH leves. No que respeita aos PAH leves em geral, estes somaram em média entre 394,76 e 1262,42 µg/kg compreendendo a quase totalidade dos compostos identificados (nunca inferiores a 99,90%), independentemente do processamento seguido. Pelo contrário, os PAH de elevado peso molecular apenas foram detectados nos produtos fumados (amostras “Controlo”). Tal como seria expectável, o teor máximo destes compostos foi determinado no chouriço de carne (“PF”) do Lote B, com o qual coincidiram ainda os teores máximos de BaP e de BbFA. Tal como o atesta a Tabela 18, estes dois compostos foram, entre os PAH com cinco ou mais anéis aromáticos, os mais prevalentes. O BaP com 0,07 e 0,33 µg/kg (Lotes A e B, respectivamente) foi o que se encontrou em maiores quantidades, seguido pelo BbFA, para o qual se quantificaram 0,08 e 0,17 µg/kg (nos Lotes A e B, pela mesma ordem). Independentemente do lote, estes compostos decresceram ( $p < 0,05$ ) progressivamente ao longo do tempo que as amostras permaneceram armazenadas. Os teores mais baixos em BaP coincidiram com os três meses de armazenamento: 0,05 µg/kg no Lote A e 0,16 µg/kg no Lote B. No que respeita ao indicador PAH4, os níveis médios mais elevados foram identificados, uma vez mais, nas amostras “Controlo”. Nestas amostras quantificaram-se no produto final 1,82 e 2,81 µg/kg, nos Lotes A e B, respectivamente. Também aqui se registou uma redução substancial ( $p < 0,05$ ) em cerca de 40% relativamente ao teor inicial para níveis de 1,09 e 1,75 µg/kg, pela mesma ordem nos Lotes A e B. No chouriço de carne produzido com aroma de fumo líquido, o indicador PAH4 encontrou-se em níveis tendencialmente inferiores que permaneceram inalterados ao longo do tempo do armazenamento. Para os produtos onde este ingrediente foi incorporado na formulação (Lote B), os teores médios oscilaram entre 0,23 e 0,63 µg/kg (nas amostras “1M” e “3M”, respectivamente). Já naqueles que foram aspergidos com a solução de aroma de fumo líquido o teor do conjunto PAH4 variou entre 0,08 e 0,44 µg/kg.

A forte correlação do ACL e do NA com o total de PAH, referida anteriormente, é efectivamente suportada pela análise de componentes principais (ACP), cuja projecção é apresentada na Figura 36. A referida análise extraiu dois componentes principais que, no conjunto, explicam 86,96% da variância. A primeira componente principal (CP1) que descreve 64,36% da variação engloba AC, FL, PHE, AN, FA, PY, CHR, BbFA, BkFA, BaP, IP; PAH pesados e PAH4, ao passo que a segunda (CP2) explica 22,60% e compreende precisamente o ACL, NA, PAH leves e total de PAH.



**Figura 36.** Projecção da análise de componentes principais para os PAH avaliados.  
 Leves: somatório dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.  
 Pesados: somatório dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, e IP.  
 PAH4: somatório dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

Efectivamente, o posicionamento dos vários tipos de amostras no plano da projecção de componentes principais reforça esta observação. Com base na análise da Figura 37 confirma-se a elevada correlação entre todas as amostras produzidas com aroma de fumo líquido bem como com os enchidos fumados armazenados por 1 e 3 meses. O chouriço de carne “Controlo” do Lote B, por sua vez, demonstrou ser uma excepção na medida em que este não apresentou qualquer correlação com nenhum outro tipo de amostra.

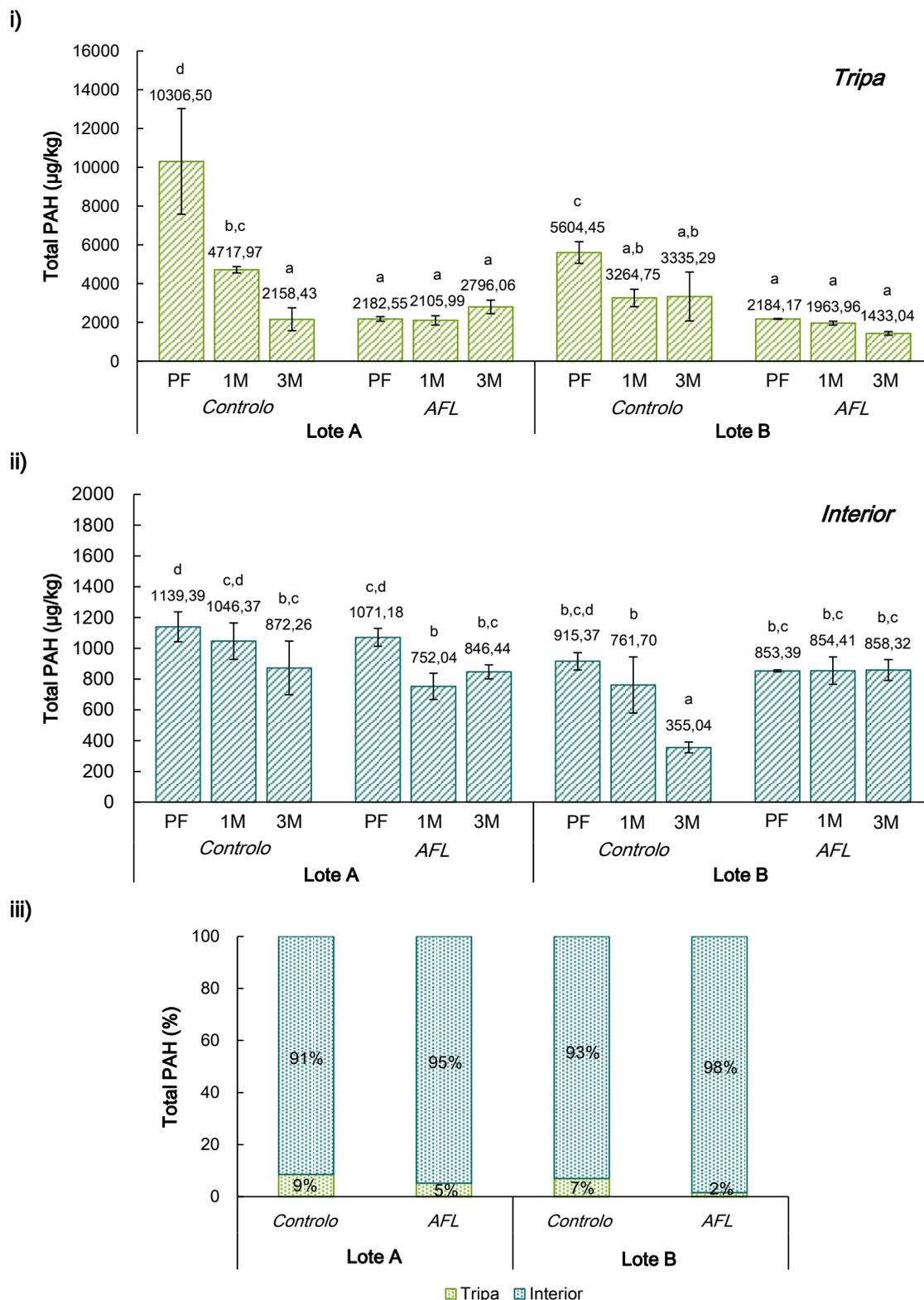


**Figura 37.** Projecção da análise de componentes principais para os diversos tipos de amostras. As abreviaturas que designam as amostras são compostas por três elementos, onde a primeira letra corresponde ao lote (Lotes A e B), a segunda letra ao tipo de processamento (“C” para “Controlo” e “A” para “AFL”) e um número que corresponde ao tempo de armazenamento (0, 1 e 3 para “PF”, “1M” e “3M”, respectivamente).

Na Figura 38 e Figura 39 são apresentados os principais resultados obtidos a partir da análise da massa interior do chouriço de carne e da tripa. Através da análise destes dados, percebe-se que a maior acumulação de PAH ocorre à superfície do enchido, na tripa, pese embora este tenha sido o elemento que menos contribuiu para a contaminação global dos produtos estudados. Facto que, de resto, já tivemos oportunidade de evidenciar, mais concretamente nos Capítulos 2 e 3 desta dissertação. Neste contexto, os invólucros dos produtos “PF” (produto final) sujeitos ao processo de fumagem indirecto destacaram-se pelas maiores ( $p < 0,05$ ) contaminações: 10306,50 e 5604,45  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nos Lotes A e B, pela mesma ordem (Figura 38). Apesar disso, estes teores iniciais sofreram um forte decréscimo ( $p < 0,05$ ) ao longo do armazenamento atingindo níveis equiparáveis aos que se registaram para o chouriço de carne que não foi fumado e para o qual se registaram entre 1433,04 e 2796,06  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (pela mesma ordem, nas amostras “AFL” com 3 meses de armazenamento dos Lotes A e B). A grande variabilidade registada nos invólucros dos enchidos não se reflectiu, porém, nos níveis de contaminação determinados no interior dos produtos, onde as maiores diferenças ( $p < 0,05$ ) se ficaram a dever apenas ao tempo de armazenamento, mas uma vez mais, apenas quando o processo de secagem tradicional foi seguido. Após a conclusão do processamento das amostras do Lote A foram detectados, em média, 1139,39  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , que após três meses foi de apenas 872,26  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . No Lote B, o teor inicial de 915,37  $\mu\text{g}/\text{kg}$  foi reduzido para 355,04  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , atingindo níveis mais baixos do que aqueles que foram encontrados nas amostras processados com aroma de fumo. Em termos globais, o grau de contaminação quantificado na massa do chouriço de

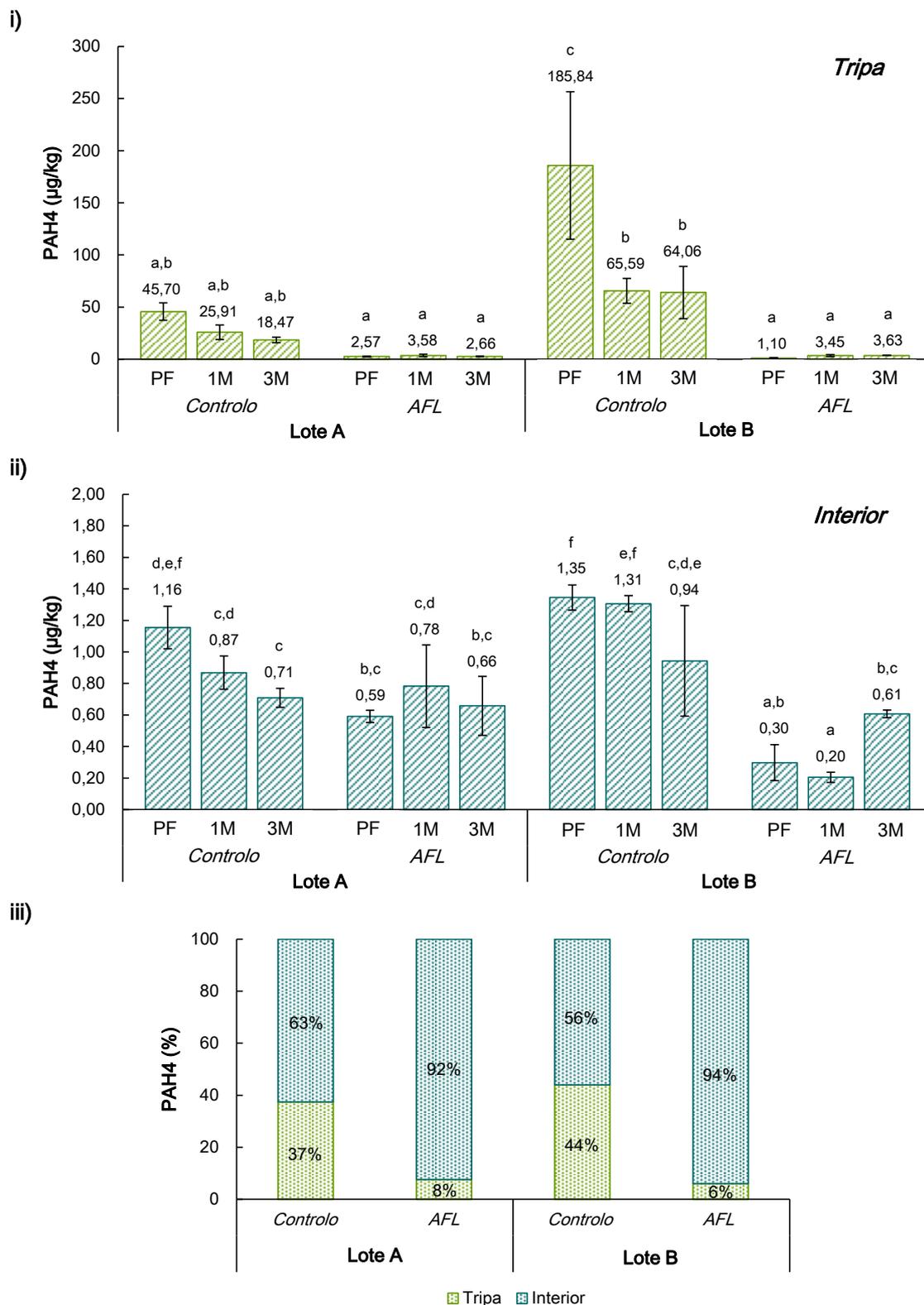
carne AF, mantiveram-se estáveis ao longo do armazenamento, com um teor máximo de 1071,18 µg/kg (Lote A, "PF") e mínimo de 752,04 µg/kg (Lote A, "1M"). Também no que diz respeito ao indicador PAH4, os níveis de contaminação foram mais elevados na tripa comparativamente ao interior. De todos os invólucros analisados, os que foram removidos das amostras "Controlo\_PF" do Lote B foram os que se distinguiram com maior nível de contaminação, ascendendo a 185,84 µg/kg. Ainda que logo após o primeiro mês se tenha registado uma redução assinalável, estes mostraram-se bastante superiores ( $p < 0,05$ ) aos encontrados nas amostras homólogas do Lote A, que continham entre 18,47 e 45,70 µg/kg, bem como das que não foram fumadas, cujos teores nunca atingiram 4 µg/kg. Relativamente à massa dos enchidos, as maiores diferenças foram notadas logo após o processamento ou durante o primeiro mês de armazenado, sendo que o chouriço de carne "Controlo" se apresentou mais contaminado. Também aqui, no final dos três meses de armazenamento, os níveis de contaminação foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) para todos os tipos de amostra estudados, independentemente do lote ou do processo tecnológico seguido. No final do armazenamento os teores finais de PAH4 foram, por esta ordem, de 0,71 e 0,66 µg/kg no chouriço "Controlo" e "AFL" do Lote A, e 0,94 e 0,61 µg/kg nos produtos "Controlo" e "AFL" do Lote B.

À semelhança do que já foi reportado nos capítulos anteriores, os resultados determinados para o produto inteiro reflectiram principalmente os níveis de contaminação presentes na massa do chouriço de carne. Além deste facto, a proporção dos resultados obtidos para estes dois elementos nas amostras "PF", "1M" e "3M" foram bastante similar, razão pela qual foi considerada apenas a sua média. Como se confirma pela Figura 38 e Figura 39 a contribuição relativa da tripa foi, na maior parte dos casos, inferior a 10% do teor em PAH quantificado no produto inteiro. Apenas para o indicador PAH4 as amostras sujeitas a fumagem ("Controlo") apresentaram uma tendência diferente e que se deve à retenção do BbFA e do BaP na tripa. Este facto levou a que a tripa apresentasse uma contribuição superior à registada para as restantes amostras de 37 e 44% nas amostras produzidas nos lotes A e B, respectivamente.



**Figura 38.** Evolução do teor total de PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) na tripa (i) e interior do chouriço de carne (ii) durante o armazenamento para as diversas tecnologias de processamento testadas e contribuição relativa média de cada um destes elementos para o teor em PAH4, determinada a partir das amostras “PF”, “1M” e “3M” (iii).

Barras de erro correspondem ao desvio-padrão. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 39.** Evolução do teor do indicador PAH4 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) na tripa (i) e interior do chouriço de carne (ii) durante o armazenamento para as diversas tecnologias de processamento testadas e contribuição relativa média de cada um destes elementos para o teor em PAH4, determinada a partir das amostras “PF”, “1M” e “3M” (iii).

Barras de erro correspondem ao desvio-padrão. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 4.4. DISCUSSÃO

Na literatura disponível, a madeira seleccionada para a fumação e a temperatura a que decorre a pirólise são, reiteradamente, indicados como factores decisivos para a composição do fumo e, em particular do perfil de PAH (Šimko, 2005; Yurchenko e Mölder, 2005; Duedahl-Olesen *et al.*, 2006; CAC, 2009; Hitzel *et al.*, 2013; Rozentāle *et al.*, 2015). Tóth e Blaas (1972), por exemplo, deram conta de um aumento linear do teor em BaP com o aumento de temperatura de 400 para 1000 °C, assim como Guillén *et al.* (2000c) concluíram que temperaturas entre 530 e 559 °C são as mais adequadas para obter aromas de fumo com teores reduzidos de PAH pesados. Estes últimos autores referem ainda, citando Girard (1991), que temperaturas entre 400 e 600 °C são as ideais para a pirólise. Já García-Falcón e Simal-Gándara (2005) referem a necessidade de que a combustão se processe a temperaturas inferiores a 400 °C e na ausência de chama. Por outro lado, Oberg *et al.* (2012) referem que a ignição do carvalho ocorre a 482 °C. Um estudo desenvolvido por McGrath *et al.* (2003) demonstra ainda que a formação de alguns PAH a partir da celulose atinge o seu ponto máximo a temperaturas entre 550 e 600 °C. Por fim, segundo o regulamento actualmente em vigor (CE, 2003b), a temperatura de produção dos aromas não pode exceder, em caso algum, os 600 °C. Tendo por base toda esta informação, foram seleccionadas duas temperaturas de pirólise: 400 e 600 °C, para investigar a formação de PAH a partir da combustão do azinho, sobreiro, oliveira, carvalho e castanho. De salientar porém que para os cinco tipos de madeira pirolisados a 600 °C ocorreu a formação espontânea de chama.

Os resultados obtidos mostram que a temperatura foi, inequivocamente, o factor de maior relevo no perfil e quantidade de PAH formados. A combustão da madeira à temperatura mais elevada redundou em maiores quantidades de PAH, com especial destaque em alguns PAH pesados, particularmente de BghiP e IP. No entender de Aurore *et al.* (2000), com o aumento da temperatura os compostos existentes no fumo podem reagir entre si culminando na formação de PAH de maior peso molecular. No seu trabalho McGrath *et al.* (2001) referem algumas possibilidades que também explicam este aumento: por via da adição sucessiva de acetileno, ou pela combinação do naftaleno com substratos alifáticos. A combustão a baixas temperaturas, por seu turno, permitiu evitar a presença de alguns PAH pesados, tal como se registou para o IP, ou mantê-los em concentrações globalmente reduzidas. Comparativamente a outros estudos já existentes, os níveis dos PAH estudados nos condensados produzidos a baixa temperatura apresentam-se na mesma ordem de grandeza dos determinados em aromas de fumo comerciais por Gomaa *et al.* (1993); Yabiku *et al.* (1993) e Guillén *et al.* (2000a).

Não obstante a importância atribuída à madeira no que respeita à contaminação dos produtos com PAH, os resultados existentes actualmente são ainda pouco esclarecedores. Alguns estudos, por exemplo, foram realizados em produtos cárneos (salames, salsichas tipo Frankfurt), outros, por sua vez, em condensados de fumo. A isto junta-se o facto da grande diversidade de madeiras testadas, da temperatura a que se efectuou a pirólise, ou até mesmo dos PAH

individuais analisados. Esta heterogeneidade de critérios impede, assim, que se possa estabelecer uma comparação suficientemente robusta. De referir ainda que (com excepção para o carvalho) não são para já conhecidos trabalhos que incidam sobre as madeiras usadas pelos produtores nacionais o que, à luz dos resultados divulgados anteriormente no estudo de incidência (Capítulo 2), confere especial interesse aos dados agora apresentados. No seu relatório a AESA compilou as informações fornecidas pelos laboratórios envolvidos no controlo alimentar, investigação e na indústria, relativos à presença de PAH em alimentos (EFSA, 2008a). Com base nos dados fornecidos, a faia, o carvalho e o amieiro (por ordem decrescente de importância), são os mais utilizados para a produção do fumo por parte dos produtores europeus. Relativamente à faia, a madeira referida como sendo a mais utilizada, Hitzel *et al.* (2013) constataram que a sua substituição por madeira de carvalho, álamo e nogueira resultaria num decréscimo de BaP e PAH4 entre 36 e 55% nos salames. Stumpe-Vīksna *et al.* (2008a) encontraram diferentes níveis de contaminação em carne fumada com diferentes madeiras, sendo que os maiores teores de PAH foram quantificados no abeto (habitualmente classificada como sendo uma madeira branda).

A análise dos resultados demonstra que, em termos gerais, a produção de PAH foi semelhante para os cinco tipos de madeira testados (azinho, sobro, oliveira, carvalho e castanho), com as diferenças a surgirem apenas quando a pirólise se processou a 600 °C. Para esta temperatura o condensado de azinho foi o que apresentou maiores níveis de contaminação, tanto a nível dos compostos individuais como dos grupos considerados (total de PAH, leves, pesados, e PAH4). Esta tendência, de resto, só foi contrariada pelo BghiP e IP, devido aos teores mais elevados detectados na oliveira, carvalho e castanho. Ao invés, dos vários condensados gerados à temperatura mais elevada, o de sobro foi aquele que apresentou consistentemente menores quantidades de PAH. Comparativamente ao trabalho desenvolvido por Guillén *et al.* (2000c) os dados agora apresentados são assumidamente superiores, nomeadamente no carvalho que foi uma das madeiras estudadas por estes autores, mesmo para os condensados de fumo produzidos a 400 °C. Em comum, todavia, devemos salientar a ausência de BaP. Considerando que a temperatura de combustão referida por estes autores variou entre 530 e 559 °C, esta diferença é de alguma forma inesperada. A escolha do tipo de solvente utilizado no presente estudo pode ter sido um possível elemento diferenciador, devido à maior solubilidade dos PAH em dimetilsulfóxido (DMSO), comparativamente à água utilizada pelos referidos autores. A escolha do DMSO baseou-se no facto de se pretender recolher a maior quantidade possível de PAH, para que os resultados reflectissem, de forma tão precisa quanto possível, a composição do fumo a que os produtos estão em contacto durante a fumagem.

A madeira, como se sabe, é composta principalmente por percentagens variáveis de celulose, hemicelulose e lenhina (Simon *et al.*, 2005). Destes três componentes, a ignição da celulose, segundo Babrauskas (2001), é a que ocorre primeiro, seguindo-se a hemicelulose e, por fim a lenhina. O autor acrescenta ainda que as madeiras brandas apresentam proporcionalmente uma fracção menor de hemicelulose e uma fracção maior de lenhina, quando comparadas com as

madeiras duras. Dados recentes parecem indicar a maior capacidade da lenhina para formar PAH relativamente à celulose (Zhou *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015). Assim sendo, a combustão de madeiras mais ricas em lenhina a elevadas temperaturas poderá estar na origem da produção de maiores teores de PAH. Como se mostra na Tabela 19, onde se apresentam os teores de lenhina determinados por diversos autores respeitantes às madeiras avaliadas neste estudo, o castanho e o carvalho, são aqueles que contêm teores mais elevados, facto que pode explicar, por exemplo, as maiores quantidades de BaA verificadas quando a pirólise decorreu a baixa temperatura (400° C). Analogamente, para os condensados obtidos a 600° C, as diferenças nos teores de lenhina existentes em cada uma das madeiras poderá estar na origem das discrepâncias encontradas nos níveis de PAH quantificados. De acordo com os resultados, e com a excepção da madeira de azinho, o aumento dos níveis de contaminação da generalidade dos PAH coincidiram com teores de lenhina sucessivamente maiores.

**Tabela 19.** Composição em lenhina de algumas madeiras (resultados apresentados em base seca).

Nome científico	Nome comum	Lenhina (%)	Referência
<i>Quercus ilex</i> L.	Azinhão	16,3	Eugenio <i>et al.</i> (2006)
<i>Quercus suber</i> L.	Sobro	21,7	Pereira (1988)
<i>Olea europaea</i> L.	Oliveira	23,7	Garcia-Maraver <i>et al.</i> (2013)
<i>Quercus faginea</i> Lam.	Carvalho	24,5	Sousa <i>et al.</i> (2009)
<i>Castanea sativa</i> Mill.	Castanho	31,8	Fengel e Wegener (1989)

Não obstante a elevada heterogeneidade dos trabalhos que têm vindo a ser publicados, os resultados obtidos apresentaram grandes semelhanças ao nível do perfil e das quantidades individuais dos PAH determinados. É este o caso da prevalência dos compostos de menor peso molecular com 2 a 4 anéis aromáticos, em especial do FA e do PY, que também foi constatada por Aurore *et al.* (2000) e Guillén *et al.* (2000b). Resultados similares foram igualmente demonstrados pelas investigações conduzidas por Mcgrath *et al.* (2001), directamente a partir dos vários componentes do fumo, assim como por Goma *et al.* (1993) que avaliaram a presença de PAH em aromas comerciais. De salientar ainda que os níveis de BaP nos condensados gerados a baixa temperatura são equiparáveis também àqueles referidos por Šimko (2002) em aromas de fumo comerciais. Em contrapartida, para os condensados produzidos a 400 °C, os teores de BaA e BaP quantificados ficaram muito abaixo dos níveis encontrados nos condensados produzidos por Aurore *et al.* (2000) a 375 °C. Comparativamente aos resultados reportados por Guillén *et al.* (2000b) em aromas de fumo comerciais, verificamos que os teores de BaA e CHR determinados nas madeiras usadas predominantemente no Alentejo (azinhão e sobro) se mostram tendencialmente inferiores. Observou-se uma tendência idêntica no que respeita aos PAH pesados mas, desta vez, transversal aos 5 tipos de madeira avaliados. Este é de facto um aspecto pertinente, uma vez que a presença de baixas quantidades de BaP, por si só não é condição suficientes para suprimir o risco associado à presença de PAH nocivos para a saúde dos consumidores. Os condensados obtidos da madeira de carvalho a 400 °C são disso

um bom exemplo. Ainda que o BaP e o IP não tenham sido identificados, foi identificada a presença de BbFA, BkFA, DBahA e BghiP, assim como quantidades assinaláveis de BaA.

A legislação actualmente em vigor (CE, 2003b) prevê um teor máximo admissível de BaA e BaP de, respectivamente, 20 e 10 µg/kg nos aromas de fumo. Mesmo não se tratando de condensados de fumo adequados para o processamento de alimentos, a comparação dos resultados com estes limites de referência permite extrair algumas conclusões que importa enfatizar. Por um lado, que a pirólise das madeiras de azinho e sobro, usadas predominantemente na região do Alentejo, oferecem boas garantias de quantidades reduzidas de BaA e BaP, desde que sejam realizadas a baixa temperatura e na ausência de chama. Quando tal não acontece, as quantidades determinadas para estes dois compostos podem exceder os limites de referência entre 5 e até 17 vezes. Na oliveira, carvalho e castanho registou-se um cenário ligeiramente diferente. Se o BaP não foi identificado em nenhum dos condensados produzidos a 400 °C, no que diz respeito ao BaA, por sua vez, determinaram-se a esta temperatura níveis próximos (oliveira) ou até mesmo superiores a 20 µg/kg, como se constatou para o carvalho e para o castanho, situação que se acentuou com o aumento da temperatura. Estes resultados parecem suportar as observações de García-Falcón e Simal-Gándara (2005) que em condições idênticas às agora testadas verificaram que os teores de BaA no carvalho estiveram entre as mais elevadas. De referir ainda que os condensados obtidos a 600 °C denotaram ainda teores de BaP que suplantaram o nível de referência de 10 µg/kg em mais de 10 vezes.

Mesmo depois da remoção dos compostos tóxicos presentes no fumo, os PAH estão presentes na composição dos aromas de fumo. Em particular, os PAH pesados e perigosos para o consumidor foram identificados por vários autores no curso dos seus trabalhos em aromas de fumo comerciais (Gomaa *et al.*, 1993; Yabiku *et al.*, 1993; Guillén *et al.*, 2000a; Šimko, 2002; Jira, 2004; Varlet *et al.*, 2007). Por outro lado, a legislação actual compreende apenas os limites máximos admissíveis para apenas dois compostos, o BaA e o BaP, não especificando quaisquer critérios acerca dos restantes PAH pesados ou do CHR, também considerado carcinogénico. Na óptica da redução da contaminação dos produtos de salsicharia tradicional com PAH realizou-se um ensaio à escala piloto durante o qual foram produzidos dois lotes de chouriço de carne. Para cada um dos lotes a massa do chouriço de carne foi dividida em duas partes iguais, tendo cada uma delas sido tratada de modo independente, uma em fumeiro, segundo um regime de fumagem indirecta, enquanto a outra foi processada com aroma de fumo líquido. Considerando que uma parte assinalável dos PAH se encontra maioritariamente nas camadas superficiais (Ledesma *et al.*, 2014; Ledesma *et al.*, 2015), nomeadamente no invólucro, procedeu-se à aspersão dos enchidos com uma solução diluída de aroma de fumo (enchidos do Lote A). Desta forma seria possível aferir até que ponto esta tecnologia poderia minimizar a presença de PAH através da remoção da tripa e, assim, comparar com as amostras para as quais este aditivo foi incorporado directamente aquando da formulação do chouriço de carne (produtos do Lote B).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, trata-se de um estudo inédito uma vez que não existem na literatura dados disponíveis que permitam conhecer o impacto do processamento com aromas de fumo líquido no teor em PAH acumulados em produtos de salsicharia nacional. Face ao delineamento experimental adoptado, os PAH encontrados no chouriço de carne, tiveram origem em fontes de contaminação distintas dependendo do processo tecnológico seguido. Assim as amostras “Controlo” foram contaminadas por contacto com o fumo ao passo que a contaminação das amostras com aroma de fumo (“AFL”) é veiculada exclusivamente pelo aroma de fumo.

Através da comparação da tecnologia tradicional com a condimentação de aroma de fumo constatou-se uma redução considerável de alguns dos PAH em estudo. Destacamos em particular os PAH pesados (BbFA, BkFA, BaP, e IP) que nunca foram detectados nas amostras “AFL”, facto que só foi possível porque estavam ausentes no aroma de fumo utilizado neste ensaio. Esta evidência traduz-se num claro benefício, acautelando a presença maioritariamente de PAH inócuos. Importantes reduções foram também verificadas em alguns PAH leves, em especial no AN, AC, PHE, CHR e PY. Por outro lado, a aplicação do aroma de fumo por aspersão revelou ser o mais eficaz na prevenção da contaminação dos produtos com estes compostos, pois mesmo que ocorra algum grau de penetração, uma fracção considerável destes compostos permanecerá sempre à superfície (uma vez que a exposição a baixas temperaturas dificulta a sua difusão). Os contaminantes presentes são assim mais facilmente eliminados, por contacto com a embalagem ou pela oxidação promovida pela luz. De notar que, depois de cada aspersão, e antes de serem reintroduzidos na câmara de secagem, estes produtos foram mantidos em sala, para que o excesso de água contido na solução de fumo evaporasse, pelo que poderá ter ocorrido alguma fotodecomposição dos PAH aderidos à superfície (Šimko, 2002). No nosso entender, este é o motivo pelo qual se detectaram maiores quantidades de AC e PHE nos produtos onde o aroma de fumo líquido foi incorporado na massa do chouriço. Durante o armazenamento do chouriço de carne as quantidades de PAH determinadas mantiveram-se globalmente estáveis. De notar apenas a situação particular do CHR nos produtos “AFL” do Lote B que ao fim de 3 meses de armazenamento apresentou um aumento inesperado. Neste caso, a massa dos enchidos funciona como uma barreira protectora que impede a acção da radiação sobre os PAH.

Além dos maiores níveis de contaminação nas amostras designadas por “Controlo”, assinalados anteriormente, registaram-se diferenças no grau de contaminação entre os Lotes A e B. Significa isto que, mesmo quando seguidos procedimentos idênticos, tal como aconteceu neste ensaio, podem surgir diferenças na composição do fumo gerado entre os lotes. Esta observação foi também reiterada pela EFSA (2007) que constatou a existência de diferenças entre vários lotes de aromas de fumo. Uma das razões prováveis está relacionada com o facto de não existir um controlo exacto da temperatura e do tempo de fumagem (FAO/WHO, 2005b), assim como de variações na composição da madeira.

A deposição e adesão dos PAH à tripa durante o período de fumagem ditou que as maiores concentrações de PAH fossem encontradas no invólucro do chouriço de carne, muito embora a sua contribuição para os resultados obtidos se tenham revelado, uma vez mais, diminuta. Percebeu-se, no entanto, que a contribuição relativa da tripa aumentou com o aumento da massa molecular do composto em causa. De facto, os PAH pesados, com excepção do BaP, não foram encontrados no interior dos produtos. Os resultados relativos ao BaP mostram que cerca de 60% do seu teor foram encontrados na massa do chouriço e apenas 40% à superfície. O facto de a fumagem ter sido realizada sob condições controladas (onde a fonte de calor era desligada após toda a madeira ser consumida) contribuiu para que a temperatura da câmara de fumagem se mantivesse em níveis baixos, e para que a progressão dos PAH para o interior fosse retardada, nomeadamente dos compostos com 5 ou mais anéis aromáticos. Na realidade, trabalhos anteriores indicaram que quando os produtos estão sujeitos a temperaturas mais elevadas, existe um maior grau de penetração dos PAH na massa dos produtos (Roseiro *et al.*, 2011). Durante o armazenamento, o decréscimo verificado para a maioria dos PAH foi essencialmente à custa dos compostos retidos à superfície (Tabela A.8 e Tabela A.9 do Apêndice). A análise da evolução do teor em PAH ao longo do armazenamento permite verificar que as amostras fumadas foram as que experimentaram maiores alterações. Estas foram especialmente acentuadas nos produtos do Lote B. O facto das amostras “Controlo” do Lote B terem sido as mais afectadas leva a crer, que a maior quantidade de PAH poderá ter contribuído para impulsionar a dinâmica da sua transferência para o material da embalagem, um facto corroborado também por Guillén *et al.* (2000c).

À semelhança do que já veio a ser exposto nos capítulos precedentes o perfil de PAH encontrado caracterizou-se pela marcada preponderância dos PAH leves relativamente aos compostos de maior peso molecular, cujo somatório se manteve sempre inferior a 1 µg/kg. Em particular, o teor máximo de BaP quantificado correspondeu a 0,33 µg/kg. Os níveis de PAH4 permaneceram igualmente em níveis considerados reduzidos e inferiores a 3 µg/kg. Desta forma, os níveis mantiveram-se consideravelmente abaixo dos teores máximos de BaP e PAH4 (2 e 12 µg/kg, respectivamente) determinados pela regulamentação europeia (CE, 2011a). De igual modo, a avaliação de risco efectuada com base na margem de exposição, MOE, (explicada com maior detalhe no Capítulo 2 deste trabalho) e cujos resultados (Tabela A. 10 do Apêndice) confirmam o baixo risco inerente ao consumo do chouriço de carne produzido neste ensaio.

## 4.5. CONCLUSÃO

O estudo da composição do fumo através da produção de condensados revelou a influência categórica da temperatura nos níveis de PAH gerados e, com ela a necessidade de alertar os produtores para que a fumagem se desenrole a temperaturas tão baixas quanto possível e sem

a presença de chama, como forma de prevenir a formação de PAH nocivos. Mesmo nestas condições, o carvalho e o castanho apresentaram níveis consideráveis de BaA, muito acima dos limites de referência. O recurso a estas madeiras para a fumagem de produtos de salsicharia é, na nossa opinião, desaconselhado, tendo em vista da protecção dos consumidores. Alternativamente, a fumagem com sobro oferece uma garantia adicional na produção de menores quantidades de PAH nocivos, mesmo quando, inadvertidamente, são atingidas temperaturas mais elevadas. Além do mais a sua distribuição cobre grande parte do território continental, facto que o torna facilmente disponível para a maioria dos produtores nacionais.

Já na produção do chouriço de carne, verificou-se que através de um regime de fumagem indirecto sob condições controladas é viável a produção de produtos com baixo teor em PAH, ainda assim não foi possível evitar a presença de PAH pesados. Neste contexto, a utilização de aromas de fumo surgem como uma alternativa que pode contribuir para a melhoria da segurança química do chouriço de carne. Visto que os consumidores se encontram expostos a outras vias de contaminação, além dos produtos de salsicharia, a presença de PAH deve ser prevenida por todos os meios possíveis.

## **5.**

### **INCIDÊNCIA DE AMINAS BIOGÉNICAS EM PRODUTOS DE SALSICHARIA TRADICIONAL PORTUGUESA**

---

## 5.1. INTRODUÇÃO

As aminas biogénicas (AB) definem-se como compostos azotados de baixo peso molecular, biologicamente activas, formadas maioritariamente a partir da descarboxilação dos aminoácidos precursores, sendo encontradas numa grande variedade de alimentos. A reacção de descarboxilação consiste na remoção do grupo carboxilo existente nos aminoácidos, como resultado da actividade enzimática de descarboxilases de origem microbiana, sendo este mecanismo responsável pela formação da triptamina,  $\beta$ -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e tiramina, designando-se estas por aminas exógenas. São excepções, as aminas endógenas, espermidina e espermina, e por vezes a putrescina quando se encontra em quantidades reduzidas, que não dependem da actividade descarboxilativa microbiana na medida em que ocorrem naturalmente nos alimentos (Moinard *et al.*, 2005; Larqué *et al.*, 2007).

A ingestão de alimentos contaminados com AB, em especial por consumidores mais sensíveis, pode assim resultar em efeitos adversos (Bover-Cid *et al.*, 2014). Os sintomas habitualmente reportados incluem dores de cabeça e alterações gastrointestinais, devido às actividades psicoactiva e vasoactiva que se manifestam nomeadamente através de alterações ao nível dos neurotransmissores e da pressão arterial (Stadnik e Dolatowski, 2010). Para além destes efeitos toxicológicos, sabe-se ainda, que as AB são precursores das *N*-nitrosaminas, reconhecidas como potentes compostos cancerígenos (De Mey *et al.*, 2014).

Os produtos de salsicharia, quer pelas suas características quer pelo seu processamento, podem conter quantidades consideráveis de AB. A carne utilizada como matéria-prima nos enchidos constitui uma importante fonte de aminoácidos precursores (Predrag *et al.*, 2011) em consequência da proteólise que se desenvolve ao longo do processamento, enquanto que a microflora que se desenvolve durante a fermentação fornece as enzimas descarboxilases necessárias à formação das aminas (de Las Rivas *et al.*, 2008). Assim, a aminogénese nos enchidos depende em simultâneo dos factores que se relacionam com a proteólise e com o desenvolvimento microbiano que ocorre, seja durante o processamento como posteriormente na fase de armazenamento. De acordo com a bibliografia, destaca-se a qualidade microbiológica da matéria-prima, a adição de culturas de arranque, a formulação, a temperatura de processamento e o armazenamento como factores decisivos para a aminogénese. Muito embora as causas que conduzem à formação de AB sejam genericamente conhecidas, desconhece-se o grau de preponderância de cada uma delas, na medida em que concorrem em simultâneo uma série de factores que interagem entre si. O perfil e teor em AB são, desta forma, determinados em função do equilíbrio que resulta dessa interacção de factores. Esta complexidade reflecte-se inevitavelmente numa grande variabilidade ao nível dos teores de aminas presentes nos alimentos, sendo possível encontrar na literatura resultados muito diferenciados (Ruiz-Capillas *et al.*, 2007b; Stadnik e Dolatowski, 2010; Latorre-Moratalla *et al.*, 2012; Rabie *et al.*, 2014).

A salsicharia tradicional portuguesa é muito rica, sendo possível encontrar no mercado nacional uma grande variedade de produtos com características muito distintas entre si, onde os aspectos culturais assumem um papel fundamental. Concomitantemente, as condições de processamento são, por esta razão, igualmente diversificadas, com impacto directo na formação e acumulação de AB nos produtos.

À data, são ainda insuficientes os trabalhos onde seja feita uma avaliação global da presença destes contaminantes químicos nos produtos de salsicharia tradicional portuguesa. Neste contexto, o presente capítulo apresenta o trabalho desenvolvido com o objectivo de avaliar a incidência de AB em produtos de salsicharia recolhidos em duas das regiões com maior preponderância ao nível de produção nacional: Alentejo e Trás-os-Montes. Para o efeito foram seleccionados alguns produtos que se pretendem representativos dos padrões de consumo dos portugueses, onde se incluem o chouriço de carne, morcela, cacholeira, paio de migos, chouriço mouro, painho, moura, alheira, chouriço doce e salpicão. Visou-se igualmente correlacionar os níveis de AB detectados, com alguns dos parâmetros físico-químicos frequentemente apontados como decisivos para a sua acumulação nos produtos, entre os quais se destaca o pH e o teor de proteína.

## 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1. Amostragem

Os produtos incluídos neste trabalho, bem como o número de amostras analisadas, podem ser consultados na Tabela 20. Todos os produtos que integraram este estudo, foram recolhidos junto de salsicharias locais (cinco produtores de cada uma das regiões), tendo sido imediatamente congelados à sua chegada ao laboratório a uma temperatura de -80 °C para posterior análise. Importa salientar que, até ao momento da recolha das amostras para o presente estudo, não houve qualquer tipo de controlo sobre o período e/ou condições de armazenamento dos produtos.

**Tabela 20.** Amostragem de produtos de salsicharia tradicional em função do tipo de produto e região de origem.

Produto	Diâmetro (cm)	Constituinte principal	Número de amostras
<i>Alentejo</i>			
Chouriço de carne	2	Carne	10
Morcela	2	Sangue	12
Cacholeira	2	Sangue	6
Chouriço mouro	2	Sangue	4
Painho	4	Carne	10
Paio de migos	10	Carne	6
Total	-	-	48
<i>Trás-os-Montes</i>			
Chouriço de carne	2	Carne	10
Morcela	2	Sangue	2
Moura	2	Sangue	8
Alheira	2	Carne	8
Chouriço doce	2	Sangue	2
Salpicão	6	Carne	12
Total	-	-	42

### 5.2.2. Parâmetros físico-químicos e indicadores de proteólise

O pH das amostras foi medido com base nos procedimentos experimentais definidos pela ISO 2917 (1999), tendo as respectivas leituras sido efectuadas num potenciómetro 654 pH Meter (Metrohm Herisau, Suíça) equipado com eléctrodo de vidro (Mettler Toledo, Suíça).

O azoto total utilizado para a quantificação do teor em proteína foi determinado com base no método de Kjeldahl num sistema automático Kjeltac 1035/38 (Foss, Dinamarca).

O extracto para a determinação das fracções azotadas, nomeadamente para o azoto não proteico (ANP), azoto dos aminoácidos livres (AAL) e azoto básico volátil total (ABVT), foi obtido de acordo com os procedimentos descritos na Norma Portuguesa NP 3442 (1999). Assim, 25 g de amostra foram homogeneizadas na presença de 90 mL de água destilada e de 25 mL de solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) a 25% (p/v), com recurso a um Polytron PT 3100 (Kinematica AG, Suíça). Após 2h a 4 °C, o extracto foi filtrado para balão volumétrico de 200 mL e o volume aferido com água. O ANP foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando entre 20 a 50 mL de extracto.

Para a quantificação do teor de AAL foi seguido o protocolo previsto na norma NP 3443 (1990). A 25 mL de extracto previamente neutralizados com solução aquosa de NaOH 1,5 N, foram adicionados 10 mL de formaldeído a 40% (v/v) (Fluka, E. U. A.) e novamente neutralizados com recurso a NaOH (0,02 N).

A determinação do teor em ABVT baseou-se no método de microdifusão de Conway descrito na norma NP 1848 (1987). Os resultados finais das fracções azotadas ANP, AAL e ABVT são expressos em mg/g, enquanto o teor de proteína é expresso em percentagem. Foram ainda calculados o índice de proteólise (PI, da designação inglesa *proteolysis index*), com base na razão entre o ANP e o azoto total assim como, o ratio AAL/ANP, ambos expressos em percentagem.

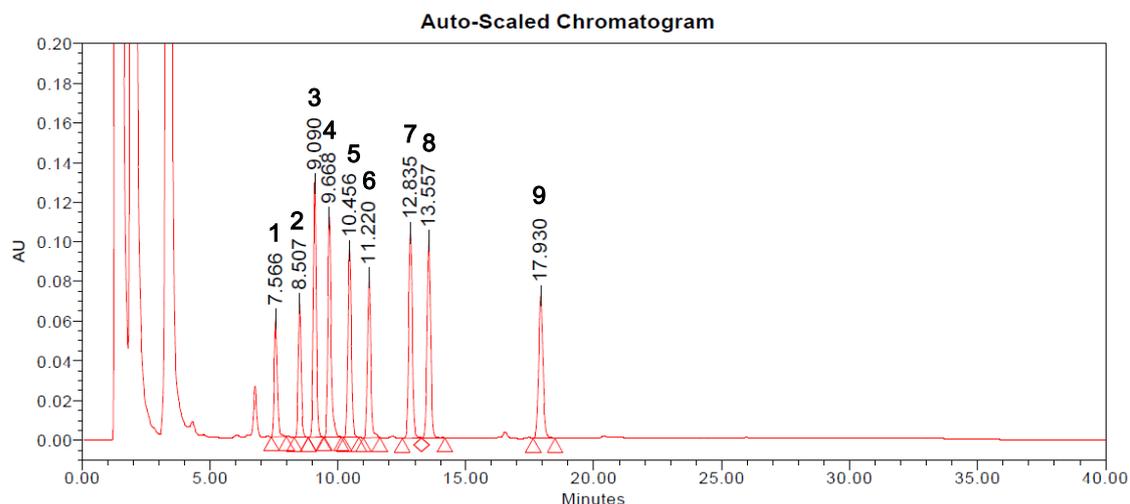
### 5.2.3. Perfil de aminas biogénicas

A extracção, identificação e quantificação das AB realizaram-se de acordo com os procedimentos experimentais descritos por Eerola *et al.* (1993). As amostras foram previamente descongeladas a 4 °C durante 24h sendo posteriormente homogeneizadas (Grindomix GM 200 Retsch, Haan, Alemanha). Cerca de 8 g de amostra foram extraídas em 40 mL de solução de ácido perclórico (0,4 M) (Carlo Erba, Espanha), num Polytron PT 3100 (Kinematica AG, Suíça). O extracto foi seguidamente centrifugado (Sorvall RC 5C, Connecticut, E. U. A.) por 10 minutos a 800g e o sobrenadante filtrado através de papel de filtro para balão volumétrico. O *pellet* foi ressuspendido com 40 mL de ácido perclórico, e procedeu-se a nova centrifugação nas mesmas condições e o sobrenadante filtrado e combinado com o anterior. Ao total dos extractos combinados adicionaram-se 0,5 mL de padrão interno, 1,7-diaminoheptano (Fluka, E. U. A.) e o volume final foi ajustado a 100 mL. As amostras incluídas neste estudo foram extraídas em triplicado.

Uma alíquota do extracto de AB (1 mL) foi derivatizado com 2 mL de solução de cloreto de dansilo (na proporção de 10 mg/1 mL de acetona), preparada diariamente e mantida ao abrigo da luz, na presença de 200 µL de NaOH (2 N) e 300 µL de solução saturada de bicarbonato de sódio. Os tubos de reacção permaneceram em repouso em câmara termostaticada, programada para 40 °C por um período de 45 minutos. Após este período, o reagente em excesso foi removido pela adição de 100 µL de amónia e deixado em repouso por 30 minutos. Por fim, adicionaram-se 1400 µL de acetonitrilo, a fim de obter um volume final de 5 mL, e centrifugou-se a 600g durante 5 minutos. A derivação dos extractos foi feita em duplicado. Com excepção do cloreto de dansilo que foi adquirido à Sigma-Aldrich (E. U. A.), todos os restantes reagentes utilizados na derivatização das AB foram adquiridos à Panreac (Espanha).

As AB em análise foram separadas e quantificadas num sistema HPLC Alliance Separation Module 2695 (Waters, Milford, MA) equipado com um detector Dual  $\lambda$  UV/Vis Detector 2487 (Waters, Milford, MA), ajustado para um comprimento de onda de 254 nm e uma coluna Spherisorb 5 µm ODS2 de 4,0 x 125 mm (Waters, Alemanha). A separação foi feita através de um programa de eluição com uma mistura de acetato de amónio a 0,1 M e acetonitrilo, ambos da Panreac (Espanha). O gradiente iniciou com 50% e terminou com 90% de acetonitrilo decorridos 19 minutos. O volume de injeção foi de 20 µL. A identificação das AB (triptamina,  $\beta$ -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina) foi feita com base no tempo de retenção (tal como se exemplifica na Figura 40). A sua quantificação, por seu

lado, foi levada a cabo por meio de calibração externa, com recurso a uma mistura de padrões individuais de concentração conhecida (contendo as 8 aminas em análise), na presença de padrão interno. A triptamina, histamina, espermidina, espermina e 1,7-diaminoheptano (padrão interno) foram adquiridos à Fluka (E. U. A.), enquanto a  $\beta$ -feniletilamina, putrescina, cadaverina e tiramina foram adquiridas à Sigma-Aldrich (E. U. A.).



**Figura 40.** Separação cromatográfica típica de uma mistura de padrões de aminas biogénicas. Picos identificados: 1: triptamina, 2:  $\beta$ -feniletilamina, 3: putrescina, 4: cadaverina, 5: histamina, 6: 1,7-diaminoheptano (padrão interno), 7: tiramina, 8: espermidina, 9: espermina.

#### 5.2.4. Análise estatística

Os dados não apresentaram uma distribuição normal (confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk), como tal, a análise estatística dos resultados foi feita recorrendo aos testes não-paramétricos Mann Whitney e Kruskal-Wallis. A separação de médias foi efectuada através do teste de Dunn. Os testes referidos foram efectuados no *software* SPSS Statistics 20 (IBM Corporation, Nova Iorque, E. U. A.) considerando um nível de significância de 0,05. Os factores avaliados foram relacionados entre si por meio de matrizes de correlação (correlações de Pearson) e análise de componentes principais (ACP).

## 5.3. RESULTADOS

### 5.3.1. Parâmetros físico-químicos e indicadores da proteólise

Enquanto indicadores da extensão da proteólise as fracções azotadas mais, concretamente os níveis de azoto dos aminoácidos livres (AAL), permitem inferir acerca dos teores destes compostos que, por meio de descarboxilação, podem ser convertidos em AB. Assim, na Tabela 21 são apresentados os resultados relativos às fracções azotadas, assim como os parâmetros físico-químicos avaliados nos vários produtos em estudo.

Relativamente ao pH, os valores médios determinados variaram entre 4,35 e 6,20 (registados na alheira e morcela de Trás-os-Montes, respectivamente). Comparativamente aos produtos Alentejanos, aqueles que foram fabricados na zona geográfica de Trás-os-Montes mostram-se tendencialmente ( $p > 0,05$ ) mais ácidos. Como exemplo, podemos considerar a alheira e a moura (com pH de 4,35 e 4,74, respectivamente) que se destacaram como sendo os produtos com pH mais reduzido. A única excepção verificada foi o chouriço mouro Alentejano, cujo pH médio foi de 5,18. Em contrapartida, a morcela, independentemente da zona onde foi produzida, destacou-se pelo seu pH mais elevado (entre 5,88 e 6,20).

Considerando a distribuição geográfica dos locais de produção dos enchidos, e atendendo às diferenças nas tecnologias de processamento implementadas no Alentejo e Trás-os-Montes, seria expectável a existência de diferenças assinaláveis nos níveis de proteína incorporados nos diferentes produtos, facto que, como mostra a Tabela 21, não se confirmou. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) registadas no teor de proteína ficaram-se assim a dever apenas às características dos diferentes produtos. A morcela, com teores médios (para as duas regiões) de proteína de 13,52%, e o salpicão, com 29,59% são exemplos das referidas diferenças. A moura (18,43%) e o chouriço doce (7,60%) constituem outros dois exemplos. Todavia, se compararmos os dois produtos comuns a ambas as regiões, o chouriço de carne e a morcela, verifica-se que não existem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no teor de proteína em função da região de produção. O mesmo não se verificou, porém, para as fracções ANP e AAL determinadas, cujos níveis foram inferiores ( $p < 0,05$ ) nas amostras transmontanas comparativamente às recolhidas junto dos produtores Alentejanos. As diferenças encontradas são corroboradas com os dados relativos ao PI, com as amostras de chouriço de carne e morcela provenientes da região do Alentejo evidenciarem um maior grau de proteólise. Em termos globais, tendo em conta todas as amostras analisadas, a morcela e a alheira (ambas produzidas em Trás-os-Montes) corresponderam aos enchidos onde se registaram os menores teores de ANP (1,24 e 1,27 mg/g, respectivamente) e AAL (pela mesma ordem, 0,10 e 0,26 mg/g). Os valores de PI mais baixos foram igualmente detectados em amostras Transmontanas. Para os produtos desta região os níveis de PI médios variaram de 4,84 e 12,04% (no chouriço doce e moura, respectivamente), ao passo que nos enchidos Alentejanos este indicador variou entre 16,62 e 25,07% (paio de

migos e morcela, respectivamente). No que concerne aos produtos de maior diâmetro, comparativamente ao painho e paio de migos o salpicão mostrou um grau de proteólise inferior (10,95%). De salientar que os níveis de AAL detectados nas amostras de salpicão foram idênticos aos encontrados amostras de morcela alentejana (1,96 mg/g) que continham na sua composição cerca de metade do teor em proteína.

O rácio entre o AAL e o ANP seguiu uma tendência idêntica à verificada para o PI, com as amostras alentejanas a revelarem níveis mais elevados deste indicador comparativamente àquelas produzidas na região de Trás-os-Montes. Do conjunto de amostras recolhidas na região Sul do país, a proporção entre o AAL e ANP oscilou entre 36,28% (cacholeira) e 53,90% (paio de migos), ao passo que para os produtos Transmontanos analisados este rácio variou entre 7,57% (morcela) e 37,24% (alheira), tendo como única excepção o chouriço doce com 87,47% (Tabela 21).

De um modo geral e, em função da zona geográfica, as fracções de ANP, AAL e ABVT reflectiram os níveis de proteína encontrados nos enchidos. Isto mesmo é demonstrado pelas correlações significativas ( $p < 0,001$ ) entre o teor de proteína e o ANP ( $r = 0,72$ ), AAL ( $r = 0,53$ ) e ABVT ( $r = 0,46$ ), cujos resultados são apresentados com maior detalhe na Tabela A.11 do Apêndice. Considerando os enchidos com maior teor de proteína recolhidos na região de Trás-os-Montes como o salpicão e o chouriço de carne (com 29,59 e 24,85%, respectivamente), verifica-se que estes apresentaram igualmente maiores níveis de ANP, AAL e ABVT (Tabela 21). Uma tendência semelhante foi identificada para o painho, o paio de migos e o chouriço de carne que, do conjunto de produtos adquiridos em salsicharias da região do Alentejo, se destacaram com níveis mais elevados ( $p < 0,05$ ) de ANP e AAL. Para os produtos Alentejanos foi ainda possível identificar a ocorrência de um padrão ao nível dos resultados obtidos para o AAL em função do calibre dos produtos. Neste contexto os dados evidenciam que os produtos de maior diâmetro (4 e 10 cm), designadamente o painho e o paio de migos, foram também aqueles que apresentaram maiores ( $p < 0,05$ ) concentrações de AAL (3,59 e 3,73 mg/g, respectivamente). A par disto, estes dois tipos de produtos foram os que tendencialmente ( $p > 0,05$ ) revelaram maiores quantidades de ABVT (0,94 mg/g em ambos os casos). Em contrapartida, a fracção de AAL foi significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior no chouriço de carne (2,85 mg/g), tal como se mostra na Tabela 21.

O chouriço de carne, pelo facto de apresentar teores de proteína idênticos entre as duas regiões e de ser produzido pela maioria dos produtores, permite uma melhor comparação dos resultados obtidos em função da zona geográfica. Os enchidos Alentejanos evidenciaram um maior grau de proteólise com níveis das fracções azotadas mais elevados, com especial relevo no que diz respeito ao AAL e ANP, onde se registaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Estes resultados reflectiram as diferenças nas tecnologias de fabrico implementadas nestas duas regiões do país, com impacto directo no grau de proteólise dos enchidos, com particular ênfase, por exemplo, para o regime de temperaturas implementado.

**Tabela 21.** Valores médios do pH e frações azotadas determinados para os produtos de salsicharia investigados para as duas regiões de produção consideradas: Alentejo e Trás-os-Montes.

	Alentejo						Trás-os-Montes					
	<i>Ch. carne</i>	<i>Morcela</i>	<i>Cacholeira</i>	<i>Ch. mouro</i>	<i>Painho</i>	<i>Paio de migos</i>	<i>Ch. carne</i>	<i>Morcela</i>	<i>Moura</i>	<i>Alheira</i>	<i>Ch. doce</i>	<i>Salpicão</i>
<i>pH</i>	5,19 <sup>b,c</sup> (4,80 - 5,62)	5,88 <sup>d</sup> (5,16 - 7,08)	5,54 <sup>b,c,d</sup> (5,02 - 6,08)	5,18 <sup>a,b</sup> (5,02 - 5,34)	5,23 <sup>b,c</sup> (4,86 - 6,03)	5,74 <sup>d</sup> (5,62 - 5,81)	5,71 <sup>c,d</sup> (5,37 - 6,31)	6,20 <sup>d</sup> (6,19 - 6,20)	4,74 <sup>a</sup> (4,31 - 5,34)	4,35 <sup>a</sup> (4,11 - 5,30)	4,93 <sup>a,b,c</sup> (4,93 - 4,93)	5,64 <sup>d</sup> (5,25 - 5,93)
<i>Proteína (%)</i>	25,64 <sup>e</sup> (22,93 - 28,74)	15,00 <sup>b</sup> (5,48 - 25,12)	21,50 <sup>d</sup> (18,56 - 24,33)	12,65 <sup>a,b</sup> (9,22 - 16,21)	26,31 <sup>e</sup> (18,86 - 29,77)	26,08 <sup>e</sup> (22,86 - 30,63)	24,85 <sup>e</sup> (22,04 - 26,71)	12,04 <sup>a,b</sup> (11,83 - 12,25)	18,43 <sup>c</sup> (15,42 - 23,96)	12,62 <sup>a,b</sup> (8,37 - 15,03)	7,60 <sup>a</sup> (7,37 - 7,82)	29,59 <sup>e</sup> (20,80 - 38,83)
<i>ANP (mg/g)</i>	7,08 <sup>c</sup> (5,64 - 7,90)	4,17 <sup>b</sup> (0,58 - 3,01)	7,51 <sup>c</sup> (5,28 - 9,34)	4,41 <sup>b</sup> (1,49 - 2,78)	7,34 <sup>c</sup> (4,10 - 10,01)	6,88 <sup>c</sup> (5,41 - 8,09)	4,34 <sup>b</sup> (3,01 - 5,14)	1,24 <sup>a</sup> (1,15 - 1,33)	3,53 <sup>b</sup> (2,49 - 4,25)	1,27 <sup>a</sup> (0,39 - 2,67)	0,59 <sup>a</sup> (0,48 - 0,70)	6,40 <sup>c</sup> (3,24 - 8,61)
<i>PI (%)</i>	17,38 <sup>c</sup> (14,02 - 21,37)	25,07 <sup>c</sup> (11,14 - 80,96)	21,54 <sup>d</sup> (17,61 - 23,99)	23,53 <sup>c,d</sup> (16,66 - 30,29)	17,27 <sup>c</sup> (13,53 - 21,12)	16,62 <sup>c</sup> (14,41 - 20,48)	11,01 <sup>b</sup> (7,41 - 14,30)	6,43 <sup>a,b</sup> (6,07 - 6,78)	12,04 <sup>b</sup> (10,08 - 13,81)	6,11 <sup>a</sup> (2,60 - 12,33)	4,84 <sup>a</sup> (4,08 - 5,59)	10,95 <sup>b</sup> (1,41 - 15,53)
<i>AAL (mg/g)</i>	2,85 <sup>d</sup> (2,03 - 3,30)	1,96 <sup>c</sup> (0,58 - 3,01)	2,99 <sup>b,c</sup> (0,40 - 5,21)	2,30 <sup>c</sup> (1,49 - 2,78)	3,59 <sup>e</sup> (3,14 - 4,03)	3,73 <sup>e</sup> (2,84 - 4,93)	1,34 <sup>b,c</sup> (1,03 - 1,68)	0,10 <sup>a</sup> (0,09 - 0,11)	0,98 <sup>b</sup> (0,36 - 1,51)	0,26 <sup>a</sup> (0,11 - 0,45)	0,60 <sup>b,c</sup> (0,54 - 0,65)	1,96 <sup>c</sup> (0,78 - 2,98)
<i>AAL/ANP (%)</i>	41,04 <sup>b,c,d,e</sup> (27,00 - 57,49)	49,22 <sup>d,e</sup> (17,27 - 83,58)	36,28 <sup>d,e</sup> (6,98 - 56,50)	52,23 <sup>d,e</sup> (33,62 - 61,94)	52,39 <sup>d,e</sup> (34,31 - 76,64)	53,90 <sup>d,e</sup> (44,49 - 61,53)	31,37 <sup>a,b</sup> (20,27 - 35,63)	7,57 <sup>a,b,c,d</sup> (7,22 - 9,72)	26,26 <sup>a</sup> (14,33 - 37,27)	37,24 <sup>c,d,e</sup> (4,30 - 68,72)	87,47 <sup>e</sup> (77,14 - 93,14)	30,07 <sup>a,b,c</sup> (23,57 - 35,58)
<i>ABVT (mg/g)</i>	0,71 <sup>d,e,f</sup> (0,48 - 0,83)	0,69 <sup>c,d,e,f</sup> (0,28 - 1,05)	0,74 <sup>b,c,d,e</sup> (0,64 - 0,87)	0,55 <sup>d,e,f</sup> (0,50 - 0,59)	0,94 <sup>e,f</sup> (0,56 - 1,42)	0,94 <sup>d,e,f</sup> (0,67 - 1,42)	0,59 <sup>f</sup> (0,52 - 0,67)	0,12 <sup>a,b</sup> (0,11 - 0,14)	0,44 <sup>b,c,d</sup> (0,28 - 0,61)	0,24 <sup>a</sup> (0,17 - 0,27)	0,11 <sup>a,b,c</sup> (0,10 - 0,13)	0,53 <sup>d,e,f</sup> (0,28 - 0,72)

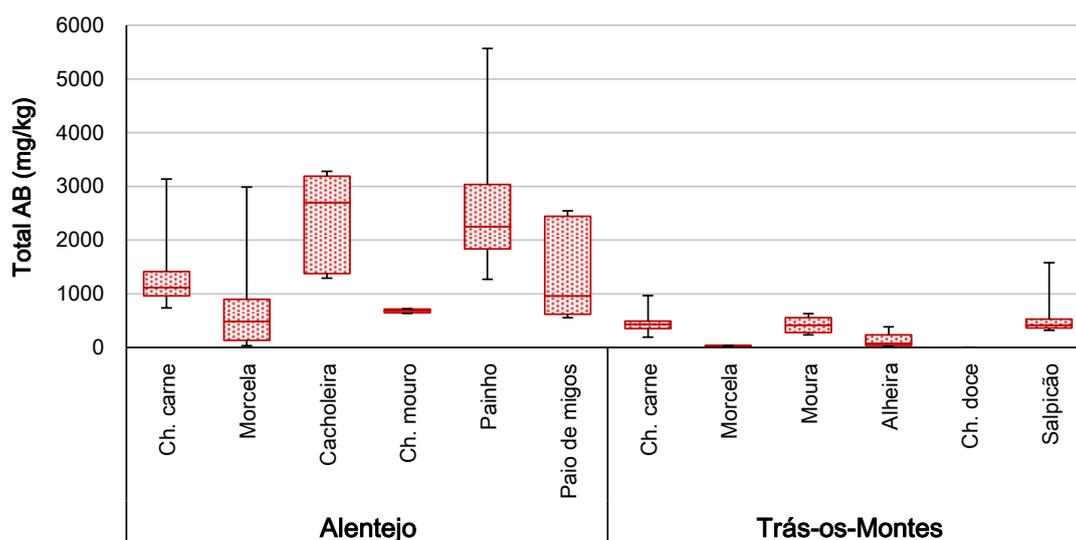
Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

ANP: azoto não proteico; PI: índice de proteólise ( $PI = \frac{ANP}{Azoto\ Total} \times 100$ ); AAL: azoto dos aminoácidos livres; AAL/ANP: rácio entre o AAL e ANP ( $AAL/ANP = \frac{AAL}{ANP} \times 100$ );

ABVT: azoto básico volátil total.

### 5.3.2. Teor total de aminos biogénicas

À semelhança dos resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos e indicadores de proteólise, os teores totais em AB detectados apresentaram grandes variações, tal como evidencia a Figura 41 e cujos dados são apresentados com maior detalhe na Tabela A.12 do Apêndice. No conjunto das amostras analisadas, os teores totais médios em AB variaram entre 26,64 e 2709,96 mg/kg quantificados, pela mesma ordem, no chouriço doce (Trás-os-Montes) e painho (Alentejo).



**Figura 41.** Diagrama de extremos e percentis relativo ao teor total em AB (mg/kg) quantificados nos produtos investigados.

Os teores médios de AB mais elevados ( $p < 0,05$ ) registaram-se nas amostras produzidas no Alentejo, em particular no painho e na cacholeira que continham 2709,96 e 2422,67 mg/kg, respectivamente. Apesar destes teores médios importa salientar que, se determinou uma grande variedade de resultados para a soma das 8 aminos, dependendo do produtor em causa, com concentrações mínimas desde 1268,77 mg/kg até 5571,83 mg/kg no painho, e de 1292,28 a 3279,73 mg/kg nas amostras de cacholeira (cf. Tabela A.12 do apêndice). Para além do painho e da cacholeira, de entre os restantes produtos desta região, o chouriço de carne (1444,32 mg/kg) e o paio de migos (1346,93 mg/kg), foram os dois produtos onde se registaram os níveis totais médios de AB superiores a 1000 mg/kg. Nas restantes amostras recolhidas na parte Sul do país, a morcela e o chouriço mouro foram as que se apresentaram menos contaminadas com teores médios de 831,44 e 679,88 mg/kg, respectivamente.

Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram também encontradas entre as amostras de produtos Transmontanos, com teores de contaminação que variaram entre 26,67 mg/kg, detectados no chouriço doce, e 605,03 mg/kg no salpicão. Na verdade, apesar de conter na sua composição maiores teores de proteína, do maior diâmetro e de um período de maturação mais prolongado

do que o painho, os dados demonstram que o processo de aminogénese foi significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior no salpicão. A extensão da proteólise, mais reduzida ( $p < 0,05$ ) no salpicão comparativamente ao painho, como se constata pelo menor teor de AAL, assim como dos rácios PI e AAL/ANP (previamente apresentados na Tabela 21), traduziu-se na menor disponibilidade de aminoácidos precursores para a produção de AB. A alheira (137,91 mg/kg), a morcela (29,14 mg/kg) e o chouriço doce, por sua vez, registaram os menores níveis de AB (Tabela A.12 do apêndice). Para estes resultados concorreram uma série de factores, desde logo, o reduzido teor de proteína, associado a um fenómeno de proteólise moderado e baixo teor de ABVT, de onde se pode inferir a ocorrência de uma actividade microbiana reduzida, resultantes do processamento térmico a que a morcela e o chouriço doce são sujeitos.

### 5.3.3. Perfil de aminas biogénicas

A análise da Tabela 22, onde são apresentados os teores médios em AB detectados nos vários tipos de produtos, revela que na generalidade a putrescina foi a amina biogénica mais prevalente, seguida pela cadaverina e tiramina, representando em conjunto mais de 80% do total de aminas.

As diferenças na concentração em putrescina entre as duas regiões produtoras são particularmente evidentes, apresentando os produtos do Alentejo valores médios substancialmente ( $p < 0,05$ ) mais elevados do que os de Trás-os-Montes. O nível mais elevado de putrescina foi detectado em amostras de cacholeira (Alentejo) que superou em mais de 8 vezes aquele que foi detectado na moura transmontana (1279,60 vs. 152,31 mg/kg, Tabela 22). O chouriço mouro (Alentejo) e o chouriço doce (Trás-os-Montes) corresponderam às amostras menos contaminadas de cada uma das regiões consideradas (184,53 mg/kg vs. 2,98 mg/kg). Acresce ainda que em 6 dos 12 produtos avaliados, nomeadamente a cacholeira, o paio de migos, o chouriço de carne Alentejano, o painho, a moura e a alheira, os teores relativos de putrescina equivaleram entre 36% e 53% do total de AB quantificadas.

No que respeita à cadaverina, esta foi a amina mais abundante na morcela alentejana, chouriço mouro e chouriço de carne Transmontano, com valores percentuais a variarem entre 32 e 38%. À semelhança do que se verificou para a putrescina, os produtos Transmontanos apresentaram teores médios em cadaverina tendencialmente inferiores aos registados nos produtos Alentejanos (3,77 - 160,63 mg/kg presentes na morcela e chouriço de carne, respectivamente por oposição a 216,88 - 355,34 mg/kg, pela mesma ordem, no chouriço mouro e chouriço de carne). Com excepção do painho que se destacou pelo seu maior ( $p < 0,05$ ) grau de contaminação (com 908,81 mg/kg), assim como o chouriço doce (8,13 mg/kg) e a morcela transmontana pelos níveis mais reduzidos ( $p < 0,05$ ), não se registaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos níveis de cadaverina entre os restantes produtos avaliados. No caso particular do painho, os teores quantificados variaram desde 46,48 a 2949,49 mg/kg (Tabela 22), sendo este facto elucidativo quanto à grande disparidade de resultados que podem advir de diferenças ao nível do processo de produção seguido por cada um dos produtores envolvidos neste estudo.

Depois da putrescina e da cadaverina, a tiramina foi a amina de origem bacteriana que mais se destacou nas amostras analisadas representando cerca de 13 a 38% do teor total de AB quantificado. O salpicão (produto Transmontano) em particular foi, de todos os produtos avaliados, aquele em que a tiramina (226,95 mg/kg) foi prevalecte face à putrescina (127,57 mg/kg) e à cadaverina (99,60 mg/kg), como atestam os resultados apresentados na Tabela 22. Quantidades consideráveis de tiramina foram ainda detectadas em alguns enchidos Alentejanos, como se constatou para a cacholeira, o painho e o paio de migos com teores de 461,06; 385,53 e 347,23 mg/kg, respectivamente.

Relativamente à histamina, os níveis de contaminação mais elevados ( $p < 0,05$ ) foram quantificados no painho (Alentejo), com teores médios de 277,91 mg/kg. Ainda que no chouriço de carne Alentejano se tenham detectado 163,10 mg/kg, nos restantes produtos, a histamina esteve presente em quantidades geralmente inferiores ( $p > 0,05$ ), entre 4,02 e 70,10 mg/kg (chouriço mouro e salpicão, respectivamente). Já no caso do chouriço doce e da morcela, esta amina não foi detectada.

Sendo as poliaminas espermina e espermidina constituintes naturais da carne, estas foram, tal como seria expectável, encontradas em todas as amostras embora em quantidades inferiores às aminas exógenas anteriormente abordadas (putrescina, cadaverina, tiramina e histamina). Apesar das diferenças determinadas entre os vários tipos de produtos, a espermina foi detectada, de forma consistente, em maior quantidade quando comparada com a espermidina. Mesmo em menores quantidades, em virtude dos baixos níveis das aminas exógenas encontrados no chouriço doce e na morcela de Trás-os-Montes, a espermina revelou-se nestes produtos como a mais abundante, correspondendo entre 36 e 44%, respectivamente, do total em AB detectadas. Para os mesmos produtos, a espermidina correspondeu entre 22 e 31%, respectivamente, do total de AB. Teores médios de espermina entre 9,57 mg/kg (chouriço doce) e 130,84 mg/kg (cacholeira) e de espermidina entre 7,12 mg/kg (alheira) e 44,40 mg/kg (cacholeira) foram encontrados no conjunto das amostras estudado (Tabela 22), reflectindo, de uma forma geral, a quantidade de proteína existente nos produtos.

No que respeita à triptamina e  $\beta$ -feniletilamina, estas aminas não foram detectadas no chouriço doce e na morcela (Trás-os-Montes), sendo que a primeira não foi igualmente detectada no chouriço mouro. Na generalidade das amostras ambas as aminas mantiveram-se em níveis reduzidos, inferiores a 3% do total de aminas detectadas, em especial a  $\beta$ -feniletilamina cujo teor médio, salvo raras excepções, não foi além de 30 mg/kg (Tabela 22). Relativamente à triptamina, a cacholeira e o painho (produtos Alentejanos) apresentaram os maiores níveis de contaminação (190,93 e 57,27 mg/kg, respectivamente).

**Tabela 22.** Teores médios em aminas biogénicas (em mg/kg) nos produtos investigados, provenientes das duas regiões de produção consideradas: Alentejo e Trás-os-Montes.

	Alentejo						Trás-os-Montes					
	<i>Chouriço de Carne</i>	<i>Morcela</i>	<i>Cacholeira</i>	<i>Chouriço mouro</i>	<i>Painho</i>	<i>Paio de migos</i>	<i>Chouriço de carne</i>	<i>Morcela</i>	<i>Moura</i>	<i>Alheira</i>	<i>Chouriço doce</i>	<i>Salpicão</i>
<i>Triptamina</i>	38,69 <sup>d,e</sup> (0,00 - 99,64) <sup>1</sup>	18,57 <sup>b,c,d</sup> (0,00 - 65,73)	190,93 <sup>e,f</sup> (2,55 - 362,64)	ND	57,27 <sup>f</sup> (35,69 - 77,71)	12,60 <sup>b,c,d</sup> (0,00 - 37,00)	4,52 <sup>b,c</sup> (0,00 - 10,70)	ND	6,50 <sup>b,c,d</sup> (0,00 - 12,03)	1,13 <sup>a,b,c</sup> (0,00 - 4,32)	ND	10,69 <sup>c,d</sup> (0,00 - 38,78)
<i>β-Feniletilamina</i>	4,90 <sup>b,c,d,e</sup> (0,00 - 16,91)	1,69 <sup>a,b,c,d</sup> (0,00 - 10,32)	18,80 <sup>e,f,g</sup> (1,58 - 53,29)	16,28 <sup>d,e,f,g</sup> (0,97-31,66)	15,12 <sup>f,g</sup> (2,93 - 42,81)	44,02 <sup>g</sup> (2,52 - 127,52)	2,86 <sup>a,b,c</sup> (0,00 - 13,66)	ND	0,22 <sup>a,b</sup> (0,00 - 0,87)	0,31 <sup>a,b</sup> (0,00 - 1,21)	ND	9,93 <sup>c,d,e,f</sup> (0,00 - 31,96)
<i>Putrescina</i>	529,47 <sup>c,d</sup> (136,34 - 1371,84)	287,70 <sup>b,c</sup> (13,53 - 984,51)	1279,60 <sup>f</sup> (949,07 - 1698,51)	184,53 <sup>b,c</sup> (150,59-217,87)	998,38 <sup>e</sup> (663,45 - 1669,06)	617,84 <sup>d,e</sup> (274,02 - 1284,05)	103,03 <sup>b</sup> (7,90 - 195,39)	3,30 <sup>a</sup> (2,67 - 3,92)	152,31 <sup>b</sup> (18,82-304,75)	51,97 <sup>a</sup> (1,00 - 180,72)	2,98 <sup>a</sup> (2,74-3,24)	125,57 <sup>b</sup> (10,22 - 296,29)
<i>Cadaverina</i>	355,34 <sup>d,e</sup> (70,95 - 1193,48)	319,94 <sup>b,c,d,e</sup> (3,69 - 1409,25)	249,24 <sup>c,d,e</sup> (61,23 - 552,44)	216,88 <sup>d,e</sup> (168,08-266,68)	908,81 <sup>e</sup> (46,48 - 2949,49)	259,43 <sup>c,d,e</sup> (16,76 - 426,99)	160,63 <sup>b,c,d</sup> (1,75 - 529,97)	3,77 <sup>a</sup> (2,69 - 4,85)	84,83 <sup>b,c,d</sup> (31,34 - 136,98)	33,73 <sup>a,b</sup> (0,21 - 104,86)	8,13 <sup>a</sup> (6,86-9,40)	99,60 <sup>b,c</sup> (6,29 - 431,60)
<i>Histamina</i>	163,10 <sup>e</sup> (1,88 - 398,44)	17,39 <sup>c,d</sup> (0,09 - 48,00)	47,79 <sup>c,d,e</sup> (3,88 - 136,49)	4,02 <sup>b,c</sup> (1,25-6,89)	277,91 <sup>f</sup> (87,25 - 550,80)	10,36 <sup>b,c,d</sup> (3,13 - 17,33)	11,18 <sup>b,c,d</sup> (0,00 - 35,75)	ND	26,85 <sup>d,e</sup> (9,77 - 56,23)	5,51 <sup>a,b,c</sup> (0,00 - 21,76)	ND	70,10 <sup>b,c,d</sup> (0,00 - 392,00)
<i>Tiramina</i>	285,97 <sup>d</sup> (196,04 - 394,68)	129,11 <sup>c</sup> (0,58 - 416,07)	461,06 <sup>d,e</sup> (123,22 - 735,70)	193,71 <sup>d</sup> (176,74-209,51)	385,53 <sup>e</sup> (264,65 - 590,32)	347,23 <sup>d,e</sup> (160,02 - 616,08)	133,24 <sup>c</sup> (98,05 - 157,57)	ND	107,47 <sup>c</sup> (60,96 - 196,24)	17,61 <sup>b</sup> (1,35 - 39,84)	ND	226,95 <sup>d</sup> (136,74 - 370,84)
<i>Espermidina</i>	9,97 <sup>a,b,c</sup> (6,02 - 14,75)	14,84 <sup>a,b,c</sup> (1,47 - 30,34)	44,40 <sup>d</sup> (35,82 - 58,65)	19,90 <sup>c</sup> (8,21-32,18)	9,62 <sup>a,b,c</sup> (4,86 - 16,92)	14,01 <sup>b,c</sup> (8,34 - 21,85)	8,00 <sup>a,b</sup> (6,76 - 10,43)	9,08 <sup>a,b,c</sup> (9,05 - 9,11)	10,10 <sup>a,b,c</sup> (4,57 - 15,30)	7,12 <sup>a</sup> (3,83 - 8,62)	5,89 <sup>a</sup> (5,46-6,33)	8,19 <sup>a,b,c</sup> (4,81 - 12,80)
<i>Espermina</i>	56,88 <sup>f</sup> (47,39 - 64,84)	42,20 <sup>d,e,f</sup> (7,74 - 63,11)	130,84 <sup>g</sup> (109,64 - 166,40)	44,56 <sup>d,e</sup> (38,02-51,10)	57,32 <sup>f</sup> (46,16 - 69,28)	41,42 <sup>d,e</sup> (31,22 - 50,39)	48,85 <sup>d,e,f</sup> (24,10 - 65,60)	12,63 <sup>b</sup> (1,57 - 13,68)	32,92 <sup>d</sup> (17,43 - 45,48)	20,49 <sup>c</sup> (12,71 - 27,67)	9,57 <sup>a</sup> (9,27-9,86)	54,01 <sup>e,f</sup> (39,28 - 68,62)
<i>Vasoactivas<sup>2</sup></i>	492,67 <sup>e</sup> (110,64 - 699,13)	166,76 <sup>c</sup> (4,92 - 507,68)	718,58 <sup>e,f</sup> (131,54 - 1196,72)	214,01 <sup>c,d</sup> (179,12-248,06)	735,83 <sup>f</sup> (503,33 - 1024,44)	414,22 <sup>d,e</sup> (178,84 - 791,34)	151,81 <sup>c</sup> (110,64 - 204,03)	ND	141,06 <sup>c</sup> (77,17 - 208,51)	24,59 <sup>b</sup> (1,75 - 66,03)	ND	317,67 <sup>d,e</sup> (152,34 - 807,67)

Na mesma linha, médias com letras diferentes representam teores de aminas biogénicas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado

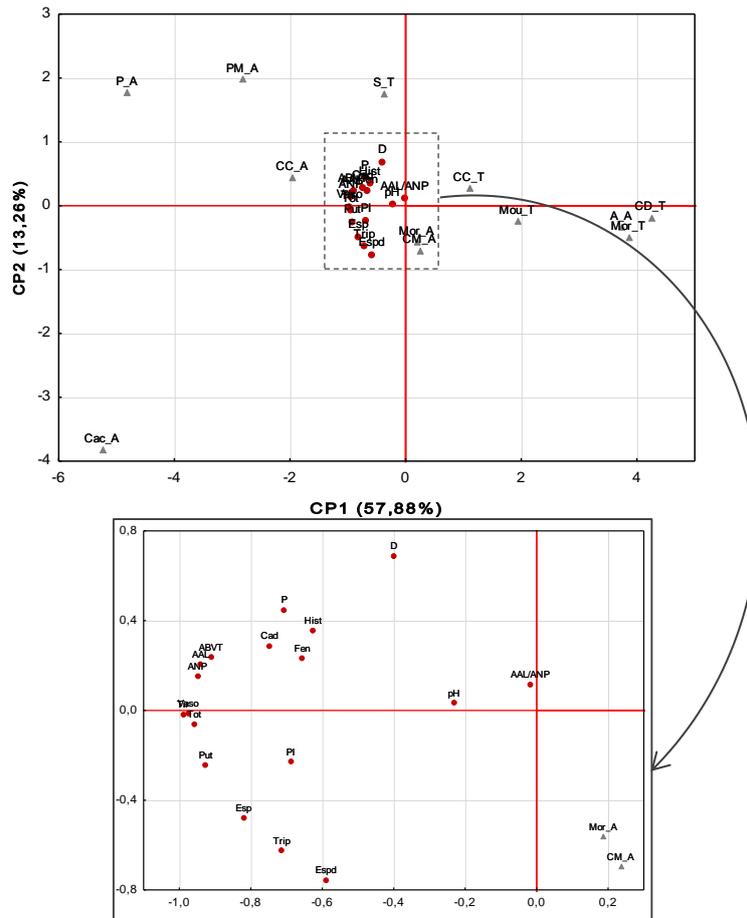
<sup>1</sup> Entre parêntesis são apresentados os teores mínimos e máximos detectados.

<sup>2</sup> O conjunto das aminas vasoactivas corresponde à soma dos teores da triptamina, β-feniletilamina, histamina e tiramina.

Tal como seria expectável, para o conjunto das aminas com propriedades vasoactivas (histamina, tiramina, triptamina e  $\beta$ -feniletilamina), registaram-se mais uma vez diferenças assinaláveis ( $p < 0,05$ ) em função da região de produção. Na Tabela 22 constam os resultados para este conjunto de aminas onde, uma vez mais, a maioria dos enchidos fabricados no Alentejo se destacam com níveis de contaminação significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores aos registados nos produtos de Trás-os-Montes. Os teores médios encontrados nos produtos Transmontanos variaram desde 17,61 a 317,67 mg/kg, determinados respectivamente na alheira e no salpicão. Nos produtos da região do Alentejo, o mesmo grupo de aminas foi quantificado em teores entre 166,76 mg/kg (morcela) e 735,83 mg/kg (painho). A este respeito, importa salientar que tanto a morcela como o chouriço doce, ambos produzidos em Trás-os-Montes, não apresentaram aminas vasoactivas.

A análise de componentes principais (ACP) foi também efectuada tendo em vista verificar quais os factores que mais contribuíram para as variações registadas nos níveis de AB. Para além das oito aminas estudadas, foram ainda incluídos neste tratamento estatístico o grupo das aminas vasoactivas e o total de AB, assim como os parâmetros físico-químicos avaliados (pH, proteína, PI, ANP, AAL, AAL/ANP e ABVT). A partir desta análise foi possível extrair dois componentes principais (CP), CP1 (57,88%) e CP2 (13,26%), que em conjunto permitem explicar 71,14% da variação dos resultados. De acordo com Larrigaudière *et al.* (2004), o modelo obtido é então considerado como qualitativo, na medida em que a percentagem cumulativa dos dados originais foi superior a 70%.

Na CP1 estão incluídos alguns dos parâmetros físico-químicos (ANP, AAL, ABVT) assim como a maioria das AB avaliadas (triptamina, putrescina, cadaverina, tiramina e espermina), o grupo de aminas vasoactivas e ainda o total de AB, enquanto o CP2 inclui apenas a espermidina. De facto, com base na projecção em relação ao CP1 (Figura 42) é possível concluir que esta permite explicar o grau de contaminação detectado nas amostras, sendo que este diminui com o aumento da abcissa. Neste caso, as amostras com níveis mais elevados de AB (maioritariamente produtos Alentejanos) posicionam-se no 2º e 3º quadrantes, enquanto as menos contaminadas (principalmente produtos Transmontanos) surgem no 1º e 4º. A projecção dos factores, apresentada na Figura 42, demonstra igualmente a correlação entre o teor em proteína com o ABVT, o ANP e AAL enquanto resultado da actividade proteolítica, no contexto da aminogénese. Por outro lado, a correlação entre a tiramina, aminas vasoactivas e total de AB também se destacou nesta projecção. O contributo individual da tiramina para o conjunto das aminas vasoactivas justifica esta correlação, na medida em que, esta foi a mais abundante do conjunto das aminas vasoactivas.



**Figura 42.** Projecção dos factores avaliados em função do CP1 e CP2.

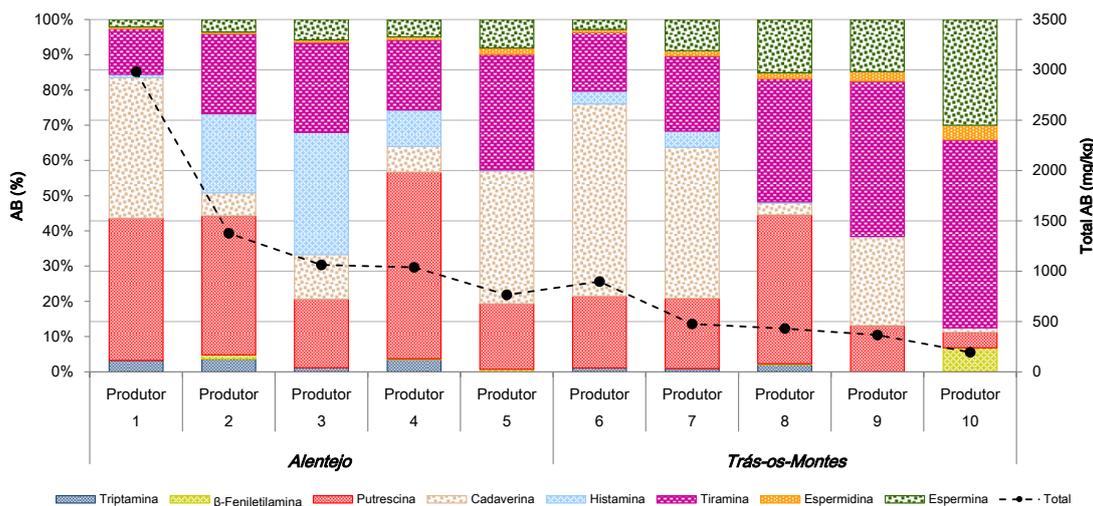
D: diâmetro; P: teor de proteína; PI: índice de proteólise; ANP: azoto não proteico; AAL: azoto dos aminoácidos livres; AAL/ANP: rácio entre azoto dos aminoácidos livres e azoto não proteico; ABVT: azoto básico volátil total; Trip: triptamina; Fen:  $\beta$ -feniletilamina; Put: putrescina; Cad: cadaverina; Hist: histamina; Tir: tiramina; Espd: espermidina; Esp: espermina; Vaso: aminas vasoactivas; Tot: total de AB.

### 5.3.4. Influência da tecnologia de processamento no teor em aminas biogénicas

Atendendo aos resultados obtidos neste estudo e através da análise da Tabela 23 verifica-se que a região de produção dos enchidos teve uma influência determinante ( $p < 0,001$ ) nos níveis de contaminação de todas as aminas exógenas avaliadas. As amostras adquiridas junto de produtores da região do Alentejo apresentaram-se manifestamente ( $p < 0,05$ ) mais contaminadas relativamente àquelas que foram produzidas na região Norte. Um efeito semelhante foi observado em função do calibre dos enchidos sendo que, neste caso, os enchidos com diâmetro intermédio (4 cm, correspondente às amostras de painho) foram, sem excepção, os que apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) grau de aminogénese. Para os restantes enchidos com 2 e 10 cm, apenas se registaram diferenças ( $p < 0,05$ ) nos níveis de  $\beta$ -feniletilamina, tiramina e aminas vasoactivas, com as maiores concentrações a serem detectadas nestes últimos. A utilização de sangue como constituinte principal dos enchidos revelou ser menos influente na formação de AB de origem bacteriana, afectando apenas a produção de  $\beta$ -feniletilamina, tiramina

e de amins vasoactivas. Neste âmbito, os teores mais elevados ( $p < 0,05$ ) daquelas amins ocorreu invariavelmente no produtos constituídos à base de carne.

Sendo o chouriço de carne o produto mais representativo dos padrões de consumo em Portugal, e o mais comum entre os produtores incluídos neste estudo de incidência, foi feita uma comparação do perfil e teor total de AB em função do produtor deste tipo de enchidos (Figura 43).



**Figura 43.** Perfil de amins biogénicas do chouriço de carne em função do produtor e respectiva região de produção.

Em virtude da heterogeneidade verificada nos resultados, não é possível identificar um perfil comum entre os vários produtores (Figura 43). Seja devido à qualidade microbiológica da matéria-prima ou da tecnologia de processamento associada, variações consideráveis nos teores de AB ocorrem frequentemente em produtos fermentados (Roseiro *et al.*, 2010). Também Ten Brink *et al.* (1990) identificaram no seu estudo diferenças consideráveis em amostras produzidas por diferentes produtores. Miguélez-Arrizado *et al.* (2006), por sua vez, encontrou diferentes perfis de AB entre lotes fabricados pelo mesmo produtor. Apesar das variações observadas, constatam-se algumas semelhanças no que respeita ao perfil de amins em chouriço de carne, nomeadamente entre os produtores 2 e 4 (Alentejo) e os produtores 6 e 7 (Trás-os-Montes). Neste contexto, estes enchidos Alentejanos destacam-se pelos teores mais elevados de histamina e putrescina, enquanto os de Trás-os-Montes caracterizam-se pela predominância do teor em cadaverina e tiramina.

**Tabela 23.** Efeito da região de produção, composição e diâmetro nos teores médios em aminas biogénicas (em mg/kg) determinadas nos produtos estudados.

	Região de produção		Constituinte principal		Diâmetro (cm)		
	Alentejo	Trás-os-Montes	Carne	Sangue	2	4	6 - 10
<i>Triptamina</i>	50,08 <sup>b</sup> (0,00 - 362,64) <sup>1</sup> ***	5,59 <sup>a</sup> (0,00 - 28,78)	21,75 (0,00 - 99,64) ns	41,78 (0,00 - 362,64)	30,03 <sup>a</sup> (0,00 - 362,64) ***	57,27 <sup>b</sup> (35,69 - 77,71)	11,33 <sup>a</sup> (0,00 - 37,00)
<i>β-Feniletilamina</i>	13,80 <sup>b</sup> (0,00 - 127,52) ***	3,63 <sup>a</sup> (0,00 - 35,96)	10,98 <sup>a</sup> (0,00 - 127,52) *	5,89 <sup>b</sup> (0,00 - 53,29)	4,52 <sup>a</sup> (0,00 - 53,29) ***	15,12 <sup>b</sup> (2,93 - 42,81)	21,29 <sup>b</sup> (0,00 - 127,52)
<i>Putrescina</i>	642,79 <sup>b</sup> (13,53 - 1698,51) ***	99,62 <sup>a</sup> (1,00 - 304,75)	391,76 (1,00 - 1669,06) ns	385,27 (2,67 - 1698,51)	320,00 <sup>a</sup> (1,00 - 1698,51) ***	998,38 <sup>b</sup> (663,45 - 1669,06)	289,66 <sup>a</sup> (10,22 - 1284,05)
<i>Cadaverina</i>	425,01 <sup>b</sup> (3,69 - 2949,49) ***	89,85 <sup>a</sup> (0,21 - 529,97)	308,38 (0,21 - 2949,49) ns	203,08 (2,69 - 1409,25)	198,94 <sup>a</sup> (0,21 - 1409,25) ***	908,81 <sup>b</sup> (46,48 - 2949,49)	152,88 <sup>a</sup> (6,29 - 431,60)
<i>Histamina</i>	103,83 <sup>b</sup> (0,09 - 550,80) ***	28,86 <sup>a</sup> (0,00 - 392,00)	97,67 (0,00 - 550,80) ns	21,36 (0,00 - 136,49)	40,54 <sup>a</sup> (0,00 - 398,44) ***	277,91 <sup>b</sup> (87,25 - 550,80)	50,19 <sup>a</sup> (0,00 - 392,00)
<i>Espemidina</i>	16,75 (1,47 - 58,65) ***	8,24 (3,83 - 15,30)	9,20 <sup>a</sup> (3,83 - 21,85) ***	18,67 <sup>b</sup> (1,47 - 166,40)	14,06 (1,47 - 58,65) ns	9,62 (4,86 - 16,92)	10,13 (4,47 - 21,85)
<i>Espemina</i>	59,59 (7,74 - 166,40) ***	38,29 (9,29 - 68,62)	48,05 (12,71 - 69,28) ns	52,28 (7,74 - 166,40)	48,37 <sup>a</sup> (7,74 - 166,40)	57,32 <sup>b</sup> (46,16 - 69,28)	49,81 <sup>a</sup> (31,22 - 68,62)
<i>Tiramina</i>	289,35 <sup>b</sup> (0,58 - 770,01) ***	120,41 <sup>a</sup> (0,06 - 370,84)	232,05 <sup>b</sup> (1,35 - 616,08) **	175,03 <sup>a</sup> (0,06 - 770,01)	165,87 <sup>a</sup> (0,06 - 770,01) ***	385,53 <sup>c</sup> (264,65 - 590,32)	267,04 <sup>b</sup> (130,09 - 616,08)
<i>Total AB</i>	1601,19 (31,35 - 5571,83) ***	394,48 (21,31 - 1580,03)	1119,84 (21,31 - 5571,83) ns	903,36 (26,35 - 3279,73)	822,32 <sup>a</sup> (21,31 - 3279,73) ***	2709,96 <sup>b</sup> (1268,77 - 5571,83)	852,33 <sup>a</sup> (321,50 - 2546,74)
<i>Vasoactivas<sup>2</sup></i>	457,06 <sup>b</sup> (4,92 - 1196,72) ***	158,48 <sup>a</sup> (0,06 - 807,67)	362,45 <sup>b</sup> (1,66 - 1024,44) **	244,06 <sup>a</sup> (0,06 - 1196,72)	240,96 <sup>a</sup> (0,06 - 1196,72) ***	735,83 <sup>c</sup> (503,33 - 1024,44)	349,85 <sup>b</sup> (144,65 - 807,67)

Para o mesmo factor, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

ns - não significativo, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

<sup>1</sup> Entre parêntesis são apresentados os teores mínimos e máximos detectados.

<sup>2</sup> O teor em aminas vasoactivas foi determinado a partir da soma dos teores de triptamina, β-feniletilamina, histamina e tiramina.

Com o objectivo de verificar a influência da região de produção assim como do produtor no perfil de AB encontrado no chouriço de carne procedeu-se a uma nova análise estatística por meio dos testes Mann Whitney (para a região de produção) e Kruskal-Wallis (para o produtor), cujos resultados são apresentados na Tabela 24.

De acordo com o tratamento estatístico efectuado verifica-se que tanto a “Região de produção” como o “Produtor” afectaram decisivamente ( $p < 0,05$ ) a extensão da aminogénese no chouriço de carne. Destes dois factores, o “Produtor” foi aquele que teve maior impacto ( $p < 0,001$ ) e que foi transversal a todas as amins, assim como para o total de AB e para o conjunto das amins vasoactivas. A histamina, porém, foi a amina onde estas diferenças foram mais notórias, uma vez que não foi identificada na maioria das amostras de chouriço de carne Transmontano e, quando presente, manteve-se dentro de níveis significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores aos registados nas amostras alentejanas. Importa ainda chamar a atenção para a existência de diferenças ( $p < 0,05$ ) entre produtores da mesma região, facto que foi corroborado pela realização de um novo tratamento estatístico efectuado separadamente para as duas regiões, cujos dados constam da Tabela A.13 (cf. Apêndice).

Considerando as várias salsicharias que forneceram os produtos para a realização deste estudo, verificou-se que o chouriço de carne do “Produtor 1” (Alentejo) se destacou com alguns dos teores mais elevados ( $p < 0,05$ ), nomeadamente de cadaverina (1188,65 mg/kg), mas igualmente de triptamina (96,06 mg/kg) e tiramina (387,92 mg/kg) que em conjunto contribuíram para que o total de AB totalizasse níveis próximos de 3000 mg/kg. Para além do chouriço de carne, outros enchidos recolhidos neste produtor apresentaram níveis totais de AB assinaláveis, em particular o painho e a morcela, cujos teores máximos detectados foram de 5571,83 e de 2987,18 mg/kg, respectivamente.

**Tabela 24.** Efeito da região de produção e do produtor nos teores médios em aminas biogénicas (em mg/kg) determinadas no chouriço de carne.

	Região de produção		Produtor									
	Alentejo	Trás-os-Montes	Produtor 1	Produtor 2	Produtor 3	Produtor 4	Produtor 5	Produtor 6	Produtor 7	Produtor 8	Produtor 9	Produtor 10
<i>Triptamina</i>	38,69 <sup>b</sup> (0,00 - 99,64) <sup>1</sup> **	4,52 <sup>a</sup> (0,00 - 10,70)	96,06 <sup>a</sup> (92,48 - 99,64) ***	49,67 <sup>f</sup> (48,69 - 50,65)	12,06 <sup>d</sup> (11,80 - 12,32)	35,67 <sup>e</sup> (32,70 - 38,65)	ND	9,63 <sup>c</sup> (8,55 - 10,70)	4,37 <sup>b</sup> (4,28 - 4,46)	8,61 <sup>c</sup> (8,46 - 8,75)	ND	ND
<i>β-Feniletilamina</i>	4,90 (0,00 - 16,91) ns	2,86 (0,00 - 3,66)	ND ***	16,43 <sup>d</sup> (15,95 - 16,91)	ND	2,62 <sup>a</sup> (2,19 - 3,05)	5,43 <sup>b</sup> (5,41 - 5,45)	ND	ND	ND	ND	13,13 <sup>c</sup> (12,60 - 13,66)
<i>Putrescina</i>	529,47 <sup>b</sup> (136,34 - 1371,84) ***	103,03 <sup>a</sup> (7,90 - 195,39)	1204,93 <sup>a</sup> (1038,01 - 1371,84) ***	543,42 <sup>f,g</sup> (522,60 - 564,24)	207,41 <sup>e,f</sup> (192,17 - 222,64)	549,62 <sup>f,g</sup> (502,95 - 596,29)	142,00 <sup>d</sup> (136,34 - 147,65)	182,03 <sup>d,e</sup> (168,67 - 195,39)	94,87 <sup>c</sup> (91,74 - 97,99)	181,72 <sup>d,e</sup> (180,32 - 183,12)	47,94 <sup>b</sup> (46,12 - 49,77)	8,60 <sup>a</sup> (7,90 - 9,30)
<i>Cadaverina</i>	355,34 (70,95 - 1193,48) ns	160,63 (1,75 - 529,97)	1188,65 <sup>b</sup> (1183,82 - 1193,48) ***	90,41 <sup>c,d</sup> (87,36 - 93,47)	133,96 <sup>d</sup> (124,07 - 143,86)	75,47 <sup>c</sup> (70,95 - 79,99)	288,18 <sup>f</sup> (279,07 - 297,30)	489,68 <sup>g</sup> (449,40 - 529,97)	203,97 <sup>e</sup> (196,49 - 211,44)	14,85 <sup>b</sup> (14,66 - 15,04)	92,29 <sup>c,d</sup> (89,50 - 95,08)	2,34 <sup>a</sup> (1,75 - 2,92)
<i>Histamina</i>	163,10 <sup>b</sup> (1,50 - 398,44) ***	11,18 <sup>a</sup> (0,00 - 35,75)	28,59 <sup>b</sup> (28,13 - 29,05) ***	309,36 <sup>d</sup> (299,53 - 319,19)	367,91 <sup>e</sup> (337,38 - 398,44)	107,78 <sup>c</sup> (98,70 - 116,85)	ND	32,39 <sup>b</sup> (29,03 - 35,75)	21,99 <sup>a</sup> (21,30 - 22,67)	ND	ND	ND
<i>Tiramina</i>	285,98 <sup>b</sup> (196,04 - 394,68) ***	133,24 <sup>a</sup> (98,05 - 167,29)	387,92 <sup>a</sup> (381,17 - 394,68) ***	313,05 <sup>f</sup> (311,77 - 314,33)	271,18 <sup>e</sup> (255,31 - 287,04)	207,13 <sup>d</sup> (196,04 - 218,22)	250,59 <sup>a</sup> (242,78 - 258,41)	149,26 <sup>a,b,c</sup> (140,95 - 157,57)	101,74 <sup>a</sup> (98,64 - 104,83)	150,57 <sup>b,c</sup> (148,39 - 152,74)	161,32 <sup>c</sup> (155,35 - 167,29)	103,33 <sup>b,b</sup> (98,05 - 108,61)
<i>Espermidina</i>	9,97 (6,02 - 14,75) ns	8,00 (6,76 - 10,43)	14,33 <sup>d</sup> (13,92 - 14,75) **	6,33 <sup>a</sup> (6,02 - 6,64)	7,26 <sup>a,b</sup> (7,00 - 7,52)	8,39 <sup>b</sup> (7,70 - 9,07)	13,54 <sup>d</sup> (13,53 - 13,55)	7,61 <sup>a,b</sup> (6,76 - 8,47)	7,28 <sup>a,b</sup> (6,95 - 7,60)	7,02 <sup>a,b</sup> (6,99 - 7,05)	10,07 <sup>c</sup> (9,70 - 10,43)	8,00 <sup>a,b</sup> (7,82 - 8,19)
<i>Espermina</i>	56,88 (47,39 - 64,84) ns	48,85 (24,10 - 65,60)	61,79 <sup>d</sup> (58,73 - 64,84) **	48,54 <sup>b,c</sup> (47,39 - 49,69)	61,53 <sup>d</sup> (58,44 - 64,63)	50,81 <sup>b,c</sup> (47,69 - 53,93)	61,71 <sup>d</sup> (58,90 - 64,52)	25,25 <sup>a</sup> (24,10 - 26,39)	42,92 <sup>b</sup> (40,19 - 46,66)	65,08 <sup>d</sup> (64,56 - 65,60)	54,03 <sup>c</sup> (52,46 - 55,59)	58,00 <sup>d</sup> (57,00 - 59,00)
<i>Total AB</i>	1444,32 <sup>b</sup> (738,33 - 3137,25) ***	472,31 <sup>a</sup> (189,68 - 964,25)	2982,26 <sup>b</sup> (2827,28 - 3137,25) ***	1377,22 <sup>a</sup> (1341,27 - 1413,18)	1061,31 <sup>f,g</sup> (986,69 - 1135,92)	1037,48 <sup>f,g</sup> (958,92 - 1116,05)	763,34 <sup>a</sup> (738,33 - 788,34)	895,85 <sup>f</sup> (827,46 - 964,25)	476,12 <sup>d</sup> (459,78 - 492,47)	430,21 <sup>c</sup> (429,43 - 430,99)	365,96 <sup>b</sup> (353,37 - 378,55)	193,42 <sup>a</sup> (189,68 - 197,17)
<i>Vasoactivas</i> <sup>2</sup>	492,67 <sup>b</sup> (250,50 - 699,13) ***	151,81 <sup>a</sup> (110,64 - 204,03)	512,57 <sup>f</sup> (508,94 - 516,20) ***	688,52 <sup>f</sup> (677,90 - 699,13)	651,14 <sup>f</sup> (605,01 - 697,28)	353,20 <sup>a</sup> (329,62 - 376,77)	257,91 <sup>d</sup> (250,50 - 265,32)	191,28 <sup>c</sup> (178,52 - 204,03)	128,09 <sup>b</sup> (124,41 - 131,78)	161,55 <sup>b,c</sup> (160,26 - 162,84)	161,63 <sup>b,c</sup> (155,58 - 167,68)	116,48 <sup>a</sup> (110,64 - 122,34)

Para o mesmo factor, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes. ND – não detectado.

ns - não significativo, \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

<sup>1</sup> Entre parêntesis são apresentados os teores mínimos e máximos detectados.

<sup>2</sup> O conjunto das aminas vasoactivas corresponde à soma dos teores de triptamina, β-feniletilamina, histamina e tiramina.

## 5.4. DISCUSSÃO

O estudo da presença de AB em produtos cárneos, bem como dos factores que estão na sua origem não são recentes, pelo que estão disponíveis inúmeras publicações que abordam, tando a presença, como os factores que dão origem às AB em produtos de salsicharia (Shalaby, 1993; Eerola *et al.*, 1998; González-Fernández *et al.*, 2003; Bover-Cid *et al.*, 2006; Ruiz-Capillas *et al.*, 2007b; Tabanelli *et al.*, 2013).

Muito embora existam já alguns estudos realizados em produtos nacionais, estes são habitualmente focados num ou dois produtos em particular (Ferreira *et al.*, 2006; Roseiro *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Roseiro *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012), não sendo por isso possível ter uma visão ampla que permita caracterizar a acumulação de AB em produtos de salsicharia portuguesa. Este estudo pretendeu assim preencher essa lacuna, avaliando o teor em AB numa gama mais abrangente de produtos, com diferentes características e provenientes de vários produtores tradicionais localizados em duas regiões de produção distintas.

Quando produtos tão diferentes entre si são comparados, surgem inevitavelmente diferenças quer ao nível dos parâmetros físico-químicos, quer nos níveis de AB encontrados. Desde logo, diferenças acentuadas ao nível da sua composição estão na origem das discrepâncias verificadas nos níveis de pH. A composição rica em gordura e sangue da morcela, por exemplo, redundou em níveis de pH mais elevados, por oposição a outros enchidos, como a alheira de natureza mais ácida. Uma situação similar foi observada para os teores de proteína, onde se identificou uma clara diferenciação entre os produtos constituídos à base de carne e gordura, dos que incorporam outros ingredientes como o sangue, pão, entre outros. Este é o caso das morcelas (do Alentejo e Trás-os-Montes), da alheira e do chouriço doce onde, comparativamente ao salpicão, por exemplo, foram encontradas as menores quantidades de proteína. Enquanto o salpicão incorpora maior quantidade de carnes magras, os restantes produtos integram na sua composição outros ingredientes, adicionados em quantidades mais ou menos variáveis. Entre eles está o pão adicionado durante o processamento da alheira, que pode corresponder até 25% do total da matéria-prima (Associação Comercial e Industrial de Mirandela, 2011), e do sangue que no chouriço doce, por exemplo, não deve ser inferior a 50% (CE, 2007).

Com relação às fracções azotadas, estas aumentaram proporcionalmente com o teor de proteína. As concentrações das fracções azotadas foram mais elevadas naqueles produtos que continham na sua composição maiores teores de proteína, como é o caso do painho, do paio de migos, do salpicão ou do chouriço de carne (fabricado nas duas regiões de produção). Para estes resultados, contudo, poderão ter ainda concorrido outros factores, nomeadamente, o calibre dos enchidos. Como facilmente se compreende, os produtos com maior calibre necessitam de

períodos de secagem/maturação mais extensos (de uma forma geral igual ou superior a 30 dias) até que sejam atingidas as condições de qualidades e segurança que permitam a sua comercialização, possibilitando desta forma a ocorrência de uma proteólise mais extensa. Actualmente são ainda raros os trabalhos disponíveis acerca destes produtos, ainda assim, os resultados obtidos para o ABVT e AAL no painho encontram-se na mesma ordem de grandeza dos reportados por Elias e Carrascosa (2010), assim como por Roseiro *et al.* (2008) e Roseiro *et al.* (2010) em produtos similares. Do mesmo modo, também o tamanho da miga demonstrou ser um factor de relevo, tal como ficou evidente nas amostras de maior calibre: o paio de migos (10 cm) e o salpicão (6 cm). Mesmo apesar do maior teor de proteína do salpicão, o paio de migos foi o que evidenciou maiores níveis de ANP, AAL e ABVT. Na maioria dos casos, a carne utilizada para a formulação dos enchidos é cortada em pedaços com cerca de 1 - 3 cm, tal como sucede para o paio de migos, enquanto, no salpicão estes têm entre 5 - 15 cm aproximadamente. Apesar da actividade enzimática endógena que ocorre naturalmente (Castaño *et al.*, 2002), a área de exposição aos microrganismos e às suas proteases é, desta forma, significativamente superior para o primeiro.

Os dados recolhidos no decurso deste estudo evidenciaram diferenças claras nos níveis dos indicadores de proteólise determinados nas amostras produzidas no Alentejo e em Trás-os-Montes, mesmo naquelas que continham na sua composição quantidades idênticas de proteína. Ainda que se tenham quantificado teores de proteína similares no chouriço de carne e na morcela produzidos em cada uma destas regiões, os Alentejanos revelaram de forma consistente níveis mais elevados de fracções azotadas (ANP, AAL e ABVT) assim como de PI e AAL/ANP. Tais resultados permitem inferir acerca das diferenças ao nível do fenómeno proteolítico, indicando que este é mais intenso nos produtos do Alentejo.

No que diz respeito ao rácio entre as fracções AAL e ANP, verificou-se que a morcela apresentou os menores níveis deste indicador, por oposição aos resultados apurados para o chouriço doce. A importância destes resultados prende-se com o facto de este rácio constituir um bom indicador da degradação dos péptidos em aminoácidos. Sabe-se actualmente que, durante a fermentação e maturação dos enchidos, a proteólise que ocorre se deve tanto à actividade de enzimas de origem endógena como microbiana. Enquanto as enzimas endógenas intervêm nas fases iniciais do processamento, as segundas encontram-se mais activas nas fases mais tardias, nomeadamente durante a secagem (Ordoñez *et al.*, 1999). Uma das enzimas endógenas que mais participa neste processo é a catepsina D, responsável pela degradação inicial das proteínas musculares a oligopéptidos, cuja actividade é favorecida pela redução do pH, que ocorre durante o processamento dos enchidos (Latorre-Moratalla *et al.*, 2007), em resultado do ácido láctico libertado durante a fermentação. Já a degradação dos oligopéptidos em péptidos de menores dimensões e aminoácidos resulta da acção conjunta das proteases musculares e microbianas (Sanz *et al.*, 1999). Assim, a menor libertação de aminoácidos (AAL) relativamente ao ANP que se verificou na morcela (transmontana) poderá dever-se à inibição da acção das proteases endógenas induzida pelo pH mais elevado. Por outro lado, o teor de ABVT (onde se incluem

compostos como a trimetilamina, dimetilamina e amónia) pode ser considerado como um indicador de extrema importância, na medida em que permite inferir acerca da degradação enzimática e bacteriana que ocorre nos produtos (Cai *et al.*, 2011). Muito embora o ABVT não resulte exclusivamente da acção microbiana, baixas concentrações deste indicador advêm também da menor actividade enzimática promovida por parte da microbiota presente, e da qual resulta igualmente uma menor libertação de aminoácidos. Face ao exposto, a cozedura a que as morcelas são sujeitas durante o seu fabrico é determinante para o controlo da microflora contaminante e, por conseguinte, na manutenção do ABVT em níveis reduzidos. Em contrapartida, o rácio AAL/ANP mais elevado no chouriço doce é consequência dos níveis de ANP mais reduzidos, onde o azoto não proteico detectado se encontra maioritariamente sob a forma de aminoácidos livres.

À semelhança das observações para os parâmetros físico-químicos, também os níveis totais de AB revelaram grandes variações. A heterogeneidade evidenciada nestes resultados não é inédita, tendo sido igualmente reportada por outros autores em diversos estudos (Ansorena *et al.*, 2002; Roseiro *et al.*, 2010; Papavergou *et al.*, 2012). Não obstante as diferenças globalmente encontradas, os resultados obtidos para o painho estão de acordo com aqueles descritos por Roseiro *et al.* (2010), cuja investigação avaliou a acumulação das mesmas 8 aminas neste produto de salsicharia em diferentes fases de processamento e armazenamento. Segundo estes autores, os teores de AB registados na fase de armazenamento variaram entre 2700 e 5500 mg/kg, níveis semelhantes aos determinados no nosso estudo.

Nesta investigação, os enchidos recolhidos para respectiva avaliação não foram sujeitos a qualquer critério de selecção em função das condições de processamento ou de armazenamento (nomeadamente de tempo e temperatura) por forma a garantir a integridade dos resultados face aos produtos adquiridos pelo consumidor no mercado. Deste modo, mesmo que nas fases mais tardias do processamento e durante o armazenamento a flora microbiana presente possa encontrar-se já na fase estacionária, as enzimas descarboxilativas permanecem activas (Santos *et al.*, 2012) permitindo ainda assim a acumulação de AB ainda durante o armazenamento. Por outro lado, associado a períodos de armazenamento prolongados, elevados níveis de aminogénese podem ainda ocorrer em resultado da transaminação de aldeídos e cetonas existentes no meio (Halász *et al.*, 1994; Roseiro *et al.*, 2010; Stadnik e Dolatowski, 2010). Em conjunto, estes dois factores poderão ter desempenhado um papel fundamental para os teores totais de AB encontrados no painho, em especial, se considerarmos que a sua conservação comparativamente ao chouriço de carne, por exemplo, se pode estender por períodos mais prolongados, até 9 meses (Elias e Carrascosa, 2013).

Do conjunto de produtos recolhidos nas salsicharias da região do Alentejo, apenas a morcela e o chouriço mouro registaram teores totais médios em AB inferiores a 1000 mg/kg. De salientar que esse nível de contaminação nunca foi atingido por qualquer uma das amostras produzidas em salsicharias transmontanas. Este é um aspecto relevante uma vez que este é o limite a partir

do qual as aminas, independentemente da sua relação qualitativa, são consideradas perigosas para a saúde dos consumidores (Lee e Lee, 2014). No caso particular da morcela, seja ela proveniente do Alentejo ou de Trás-os-Montes, menores concentrações de AB podem ser explicadas pelo processo de cozedura a que estas são sujeitas e que, por acção da temperatura, promove a eliminação de uma importante parte da flora microbiana instalada. Para qualquer um dos enchidos onde se registaram níveis de contaminação inferiores a 1000 mg/kg, a menor acumulação de AB deve-se à presença de, igualmente, menores teores de aminoácidos livres. Enquanto precursores da reacção de aminogénese, a presença de aminoácidos constitui um factor limitante à acumulação de AB. Estes resultados evidenciam assim, a interligação entre a produção de aminoácidos e aminogénese. De facto, quando a influência devida às características de cada produto foi excluída, e apenas foram considerados os teores de AB relativos ao chouriço de carne (produzido no Alentejo e Trás-os-Montes), as diferenças inerentes à região de produção e aos produtores, tornaram-se óbvias. As discrepâncias de resultados aqui encontradas assentam maioritariamente nas diferenças devidas à tecnologia de processamento seguida em cada uma das salsicharias (Latorre-Moratalla *et al.*, 2008), mesmo para produtores da mesma região.

As práticas implementadas por cada produtor condicionam inevitavelmente tanto o desenvolvimento da microflora (e concomitante actividade descarboxilásica) como as alterações bioquímicas e físico-químicas que ocorrem durante a fermentação. As práticas de fumagem, por exemplo, podem ser muito variáveis em função das tradições e dos hábitos de consumo da zona geográfica em causa (Bover-Cid *et al.*, 1999; Martuscelli *et al.*, 2009). Em Trás-os-Montes, a secagem dos enchidos decorre principalmente no fumeiro, contrariamente ao que se verifica no Alentejo, onde a utilização de câmaras de ambiente controlado, com pequenos períodos de fumagem, constitui a prática mais corrente. Contrariamente aos resultados agora apresentados, Roseiro *et al.* (2010) registaram maiores níveis destes contaminantes químicos quando a secagem dos produtos ocorre por acção do fumo, por oposição aos processados exclusivamente em câmara. Elias e Carrascosa (2010) relacionaram também maiores valores de ABVT e proteólise com processos de fumagem mais intensos. Em contrapartida, Martuscelli *et al.* (2009) registaram maiores níveis de aminoácidos livres e AB nos produtos “não fumados” ou “moderadamente fumados”, comparativamente aos que foram sujeitos a um regime de fumagem intensiva. A acção da fumagem pode desempenhar, por isso, um papel importante no que se refere ao controlo da microflora contaminante (com capacidade descarboxilativa) como resultado do efeito antimicrobiano do fumo (Djinovic *et al.*, 2008b). Ainda neste contexto, Miguélez-Arrizado *et al.* (2006) verificou alterações no perfil de AB mesmo entre lotes obtidos junto do mesmo produtor, concluindo não ser possível estimar o nível e perfil de AB em função do produtor.

A influência do pH na acumulação de AB tem sido intensamente discutida, no sentido de estabelecer uma correlação com a aminogénese (González-Fernández *et al.*, 2003; Bover Cid *et al.*, 2008; González-Tenorio *et al.*, 2013). Até à data os resultados publicados parecem indicar a coexistência de dois factores com efeitos opostos (EFSA, 2011): enquanto o pH reduzido inibe o

desenvolvimento da microflora envolvida na aminogénese, favorece simultaneamente a actividade das enzimas descarboxilases como mecanismo de defesa das bactérias a meios ácidos desfavoráveis (Spano *et al.*, 2010). Com base nos resultados obtidos, os teores mais elevados de aminas foram registados em produtos com pH entre 5,19 e 5,54, onde se incluem o chouriço de carne, painho e cacholeira. Estes valores encontram-se dentro do intervalo de pH de 4,0 a 5,5 considerado como óptimo para a actividade descarboxilativa (Fernández *et al.*, 2007). Ainda que valores de pH muito próximos do referido intervalo (de 5,19 a 5,54) tenham sido registados no chouriço mouro, salpicão e chouriço de carne Transmontano (com 5,18; 5,64 e 5,71, respectivamente), os níveis de AB detectadas revelaram-se significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) aos quantificados para o chouriço de carne, painho e cacholeira. Paralelamente, produtos com pH inferior a 5,0 (alheira, moura e chouriço doce) apresentaram os menores níveis de contaminação com aminas. A discrepância de resultados aqui relatada evidencia, uma vez mais, a dificuldade em estabelecer uma correlação directa entre a acumulação de AB e o pH, que decorre da complexidade dos mecanismos envolvidos e da interacção de factores que determinam a extensão da aminogénese, em particular quando são comparados produtos com características e tecnologias de fabrico tão distintas entre si.

Pelo facto de estar estreitamente relacionada com o desenvolvimento das bactérias lácticas, imprescindíveis à fermentação dos produtos cárneos, a tiramina surge de forma bastante consistente na literatura como sendo a amina mais abundante nos enchidos (Bover-Cid *et al.*, 1999; Coisson *et al.*, 2004; Miguélez-Arrizado *et al.*, 2006; Latorre-Moratalla *et al.*, 2008; Kamenik *et al.*, 2012). Ainda assim, com base nos resultados agora apresentados, a putrescina, foi a amina que se destacou. A predominância da putrescina relativamente às restantes aminas exógenas foi também encontrada por outros autores nomeadamente González-Fernández *et al.* (2003) e Komprda *et al.* (2004). No âmbito a salsicharia nacional, a prevalência de putrescina e cadaverina, em conjunto, foi também reportada por Roseiro *et al.* (2006) e Roseiro *et al.* (2010) em amostras de painho.

Sabe-se actualmente que a presença de elevados teores de putrescina e cadaverina, tais como os que se verificaram em alguns produtos avaliados, podem estar associados a diversas causas: por um lado a qualidade higiénica da matéria-prima (Eerola *et al.*, 1998), mas por outro o incorrecto processamento e conservação, com impacto na proliferação de enterobactérias, que estão na origem destas duas aminas. O crescimento descontrolado destas bactérias ocorre normalmente em virtude de condições de armazenamento inadequadas (nomeadamente ao nível da temperatura) ou até de uma fermentação descontrolada com a libertação de maiores quantidades de enzimas descarboxilases para o meio (Ruiz-Capillas *et al.*, 2007a; Rabie *et al.*, 2014). O desenvolvimento das enterobactérias é igualmente facilitado pelo aumento da área de exposição à microflora contaminante que resulta da miga da carne/gordura que ocorre na maioria dos enchidos. No caso do salpicão, por exemplo, a carne/gordura utilizadas são sujeitas a um corte grosseiro, que nesta medida contribui favoravelmente para minimizar o maior desenvolvimento destes microrganismos e, conseqüentemente, a produção de putrescina e

cadaverina que lhes está associada. Por outro lado, embora estes microrganismos só sejam encontrados nas fases iniciais do processamento, podem contudo libertar enzimas descarboxilases que se mantêm activas mesmo na ausência de células microbianas viáveis (Bover-Cid *et al.*, 2001c). Assim, apesar da ausência de resultados microbiológicos que o suportem, a presença da putrescina e cadaverina de forma tão pronunciada nos produtos pode ser considerada como sendo reveladora do desenvolvimento de microrganismos com capacidade de produzir estas aminas, em algum momento do processamento e/ou armazenamento.

No que diz respeito à tiramina, o salpicão foi o único produto onde esta amina foi a mais prevalente, tendência igualmente constatada por Ferreira *et al.* (2007) que verificaram a predominância da tiramina no salpicão comparativamente às restantes aminas avaliadas. No paio de migos, por sua vez, a tiramina foi a segunda amina mais abundante depois da putrescina. A acumulação de maiores quantidades de tiramina parece, por isso, estar relacionada com o maior diâmetro destes dois enchidos (salpicão e paio de migos). Note-se que no interior dos produtos de maior calibre se estabelece um maior grau de anaerobiose, que favorece o desenvolvimento das bactérias ácido-lácticas (BAL), bactérias anaeróbicas facultativas (Castaño *et al.*, 2002) (que estão fortemente associadas à descarboxilação da tirosina), em detrimento das enterobactérias (envolvidos principalmente na formação da putrescina e cadaverina). Acresce o facto de, para este tipo de produtos, serem necessários períodos de maturação e secagem mais extensos, dos quais resultam a libertação de maiores quantidades de aminoácidos livres, nomeadamente tirosina, que pode ser posteriormente descarboxilada e convertida em tiramina. Esta observação é corroborada pela correlação positiva ( $p < 0,001$ ) registada entre o diâmetro do produto e a tiramina ( $r = 0,42$ ). Uma relação entre o diâmetro dos enchidos e a prevalência da tiramina foi também identificada por outros autores, entre os quais Bover-Cid *et al.* (1999) e Miguélez-Arrizado *et al.* (2006). Neste contexto, Bover-Cid *et al.* (1999) encontraram também uma correlação significativa entre o calibre dos enchidos e a aminogénese, no entanto, o mesmo não se confirmou neste estudo de incidência. Por outro lado, mesmo nos produtos Transmontanos onde se registaram menores níveis de contaminação, para a maioria das amostras analisadas os teores de tiramina registados foram superiores a 100 mg/kg, patamar a partir do qual foram, de acordo com Silla Santos (1996) e Ten Brink *et al.* (1990), verificados efeitos toxicológicos. Este facto assume especial importância na medida em que elevados níveis de putrescina e cadaverina, como os que se verificaram no nosso estudo, são potenciadores do efeito da tiramina (Hernández-Jover *et al.*, 1997) podendo despoletar reacções adversas nos consumidores.

Os níveis mais elevados de histamina foram encontrados no painho e chouriço de carne Alentejanos. Na verdade, a grande maioria das amostras analisadas (aproximadamente 87% das amostras de painho e 73% de chouriço de carne) revelou quantidades de histamina acima do limite indicativo de aceitabilidade de 100 mg/kg (Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero, 2004b). À

parte destes dois tipos de enchidos, o referido limite foi apenas esporadicamente ultrapassado em algumas amostras de salpicão e cacholeira.

A presença das poliaminas naturais espermina e espermidina seguiu o padrão habitualmente encontrado em produtos de salsicharia, com a prevalência da primeira sobre a segunda. Acerca da proporção entre estas duas aminas, existem na literatura diversos exemplos onde são reportados resultados semelhantes, nomeadamente em trabalhos desenvolvidos por Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero (2004b), Miguélez-Arrizado *et al.* (2006), Giroto *et al.* (2010) e Roseiro *et al.* (2010). A presença de maiores quantidades de espermina é característica nos alimentos de origem animal, muito embora a proporção relativa entre si possa ser variável em função do tipo de tecidos utilizados no fabrico dos enchidos, como salienta Kalač (2009).

A  $\beta$ -feniletilamina e triptamina foram, no conjunto das 8 aminas estudadas, as que se encontraram em menor quantidade. Salvo raras excepções, onde se incluem o paio de migos e algumas amostras de cacholeira, chouriço mouro, painho e salpicão, a primeira não excedeu 30 mg/kg, que corresponde ao limiar de  $\beta$ -feniletilamina apontado por Ten Brink *et al.* (1990) como sendo aquele a partir do qual se observaram reacções toxicológicas.

Devido à sua actividade vasoactiva, é frequente agrupar as aminas histamina, tiramina, triptamina e  $\beta$ -feniletilamina, sendo este conjunto designado por aminas vasoactivas. Enquanto a primeira apresenta um efeito vasodilatador, responsável pela ocorrência de crises hipotensivas, dores de cabeça e problemas gastrointestinais, a tiramina, a triptamina e  $\beta$ -feniletilamina apresentam um efeito vasoconstritor, que induz ao aumento da pressão arterial assim como a ocorrência de enxaquecas (Stadnik e Dolatowski, 2010). Muito embora o efeito vasoconstritor da tiramina seja claramente superior ao das restantes aminas, este é potenciado na presença de triptamina e  $\beta$ -feniletilamina (Marcobal *et al.*, 2012). Devido ao seu impacto negativo na saúde dos consumidores, um limite de segurança de 200 mg/kg foi sugerido por Eerola *et al.* (1998) para o conjunto destas 4 aminas. Em média, a cacholeira, paio de migos, chouriço de carne e painho evidenciaram teores de aminas vasoactivas entre 2 e 4 vezes superiores ao valor de referência considerado. Se atendermos ao limite de 200 mg/kg sugerido como máximo de aceitabilidade para as aminas vasoactivas, dos produtos Alentejanos, apenas a morcela se encontra abaixo deste limite. Elevados teores de aminas vasoactivas, tais como os que se verificaram nas amostras de produtos Alentejanos, assumem especial relevância na medida em que, se consumidos em simultâneo com outros produtos igualmente contaminados, podem efectivamente conduzir à manifestação de efeitos toxicológicos (Marcobal *et al.*, 2012). Um cenário bem diferente foi observado nas amostras transmontanas onde, apenas o teor médio do salpicão ultrapassou o valor considerado como limite aceitável.

A formação e acumulação de AB, tal como já foi referido, pode ser afectada por um grande número de factores, cuja relação entre si ainda não está completamente explicada. De uma forma geral, as correlações de Pearson (apresentadas com detalhe na Tabela A.14 do Apêndice)

enfatazaram algumas das observações previamente discutidas, nomeadamente no que respeita à correlação entre o teor de proteína dos produtos e grau de aminogénese com as fracções azotadas (ANP, AAL, ABVT e PI). O grau de aminogénese correlacionou-se positivamente com os AAL ( $r = 0,72$ ), ABVT ( $r = 0,63$ ), ANP ( $r = 0,65$ ) e teor de proteína ( $r = 0,35$ ). Considerando que a proteína constitui o principal substrato para a ocorrência de azoto não proteico nos produtos (onde se incluem os péptidos e aminoácidos) e de aminoácidos livres (precursores das AB), as correlações apresentadas são, desta forma, facilmente explicadas. Elevadas quantidades de proteína, permitem maior proteólise, e desta forma maior quantidade de aminoácidos livres que, por descarboxilação, podem ser convertidos em AB (Bover-Cid *et al.*, 1999). De salientar ainda a correlação ( $p < 0,001$ ) entre a putrescina e a tiramina ( $r = 0,85$ ), assim como com o teor total de aminas ( $r = 0,93$ ) e com o conjunto das aminas vasoactivas ( $r = 0,81$ ), que correspondem ao somatório da triptamina,  $\beta$ -feniletilamina, histamina e tiramina. Relativamente a esta última, resultados idênticos foram reportados por Eerola *et al.* (1998) que, de acordo com os autores estarão relacionados com a qualidade da matéria-prima utilizada, facto que, pela natureza do presente estudo de incidência, não foi possível avaliar.

## 5.5. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu concluir que existe uma grande heterogeneidade de resultados devido às características distintas dos produtos avaliados, quer pela sua composição quer pela forma. Ficou também demonstrada a importância do processamento tecnológico dos enchidos tradicionais intrinsecamente associado a hábitos culturais característicos de cada uma das regiões produtoras. Seja devido à aplicação de diferentes regimes de temperaturas usados no processo de cura, ou às características da fumagem, os teores mais elevados de AB foram encontrados nos enchidos fabricados na região Sul do país. Por outro lado, as características individuais de cada produto revelaram ser igualmente determinantes, como seja o teor de proteína. De igual modo, o tratamento térmico aplicado em alguns dos produtos avaliados que permite reduzir drasticamente a população microbiana e, concomitantemente, prevenir não só o desenvolvimento de microrganismos associados à deterioração dos alimentos, mas também a aminogénese.

De entre os vários tipos de produtos analisados, os provenientes da região do Alentejo demonstraram claramente ser mais susceptíveis de apresentar elevados teores de aminas, nomeadamente a cacholeira, o chouriço de carne e o paio de migos. Um regime de fumagem mais intenso, como aquele que é seguido nas salsicharias transmontanas, permitiu reduzir a aminogénese. Muito embora um elevado teor em aminas não signifique necessariamente que se trate de um produto menos seguro, como atesta a ausência de qualquer relato da ocorrência de sintomas associados ao consumo de produtos de salsicharia tradicional, é necessário igualmente

considerar que a presença destes contaminantes resulta em parte da acção de microrganismos associado à deterioração dos alimentos, como é o caso das enterobactérias. Apesar disto, do ponto de vista da segurança alimentar, nomeadamente em resultado de elevados teores de histamina, apenas alguns grupos de produtos (painho, chouriço de carne Alentejano e, mais pontualmente o salpicão) demonstraram ser os mais problemáticos com teores de histamina superiores a 100 mg/kg. O mesmo não se observou relativamente ao grupo das aminas vasoactivas cujos teores médios encontrados nos enchidos Alentejanos (com excepção da morcela) foram superiores ao limite considerado como aceitável de 200 mg/kg, assim como para o salpicão (região de Trás-os-Montes).

De acordo com o exposto, considera-se que, seja por meio de um controlo rigoroso da qualidade das matérias-primas ou das condições de processamento, é recomendável a adopção de medidas que visem minimizar a presença de AB neste tipo de produtos de salsicharia tradicional. Contudo, tendo em conta a variabilidade de resultados encontrados entre produtores, esta é uma avaliação que deve ser feita “caso a caso”, devidamente adaptada à realidade de cada produto e fabricante.

## **6.**

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE AROMA DE FUMO LÍQUIDO NO PERFIL  
DE AMINOÁCIDOS, AMINAS BIOGÉNICAS E COMPOSTOS BIOACTIVOS  
EM PRODUTOS DE SALSICHARIA

---

## 6.1. INTRODUÇÃO

O fabrico de enchidos envolve uma complexa conjugação de reacções, desencadeadas quer pela microbiota presente e as suas enzimas, quer pelas proteases e lípases que ocorrem naturalmente na carne que, em simultâneo, contribuem para o desenvolvimento das características organolépticas e, para a segurança e estabilidade dos produtos. Uma das reacções mais importantes corresponde à proteólise, através da qual se dá a clivagem das ligações peptídicas e a libertação de compostos azotados de menores dimensões: os péptidos e os aminoácidos. É principalmente durante a fase fermentativa e de maturação dos enchidos que o sistema proteolítico, muscular e microbiano, promove uma intensa actividade sobre as proteínas da carne. A proteólise desencadeia-se com a actividade das endopeptidases (principalmente as catepsinas) sobre as proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilhares da carne, onde são responsáveis pela clivagem de ligações não terminais a partir da qual são libertados péptidos e oligopéptidos. As exopeptidases, por sua vez, dão continuidade à degradação proteica actuando sobre as ligações peptídicas terminais com a libertação de aminoácidos ou péptidos de pequenas dimensões (Bermúdez *et al.*, 2014).

Para além de alterações ao nível da textura, a libertação dos constituintes elementares das proteínas, os aminoácidos, bem como de péptidos de pequenas dimensões, conferem aos produtos cárneos e aos produtos de salsicharia em particular, características sensoriais únicas (Mora *et al.*, 2009). Em conjunto com os condimentos e aditivos que são geralmente utilizados e com a fumagem, quando se recorre a esta etapa, os aminoácidos são responsáveis pelo desenvolvimento de aromas e sabores típicos neste tipo de produtos. Para além destes benefícios que lhes são associados, os aminoácidos estão na origem da produção de AB que, como se sabe, constituem um potencial risco para a saúde dos consumidores. Entre outros, as actividades vasoactiva e psicoactiva são alguns dos efeitos atribuídos às AB contudo, enquanto precursoras da formação de *N*-nitrosaminas, conhecidas pela sua actividade carcinogénica, aquelas aminas podem assim elevar o risco que lhes está associado.

Outro aspecto relacionado com a proteólise diz respeito à libertação de péptidos bioactivos. Korhonen e Pihlanto (2006) definem estes péptidos como sendo fragmentos de proteínas que, em virtude da sua acção positiva sobre as condições e funções corporais, são benéficos para a saúde dos consumidores. Dependendo da sequência dos aminoácidos, estes péptidos podem exercer diversas funções, tais como a actividade antioxidante e antimicrobiana (Erdmann *et al.*, 2008). Outros, contudo, ocorrem naturalmente na carne, como é o caso da anserina e da carnosina (Fu *et al.*, 2009; Peiretti *et al.*, 2011). Ainda que não se trate de um péptido, a creatina encontra-se ainda entre os compostos com efeito positivo na saúde dos consumidores, na

medida em que tem um papel chave no metabolismo energético que ocorre nos músculos (Lawler *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2010).

Actualmente tem surgido um interesse renovado por parte dos consumidores nos produtos cárneos fermentados produzidos tradicionalmente, nomeadamente na Europa, onde este mercado tem um grande impacto económico (López *et al.*, 2015). Paralelamente, a procura por produtos mais seguros, saudáveis e de valor nutricional acrescentado é também mais elevada, o que constitui um desafio muito actual para a indústria cárnea. Em resposta, têm vindo a ser apresentadas diversas tecnologias que visam, entre outros aspectos, reduzir o teor em sal e de gordura frequentemente associados aos produtos cárneos (Aaslyng *et al.*, 2014; Corral *et al.*, 2014; Laranjo *et al.*, 2016a). Um outro exemplo da preocupação com a saúde humana diz respeito à utilização de aromas de fumo líquido (AFL) como alternativa ao processo de fumagem convencional, que se sabe ser a principal via de contaminação química destes produtos com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH) (Šimko, 2005).

Apesar do aroma de fumo líquido ser já amplamente utilizado na indústria cárnea, tanto no estrangeiro, como também em Portugal, até à data não são conhecidos estudos que avaliem as consequências da sua aplicação sobre a actividade proteolítica que ocorre nos enchidos, bem como na formação de AB. Neste sentido, o presente capítulo visa o estudo do impacto da utilização do aroma de fumo (e secagem em câmara de ambiente controlado) na acumulação de AB. Os produtos da actividade proteolítica foram também avaliados, por meio da quantificação das fracções azotadas e determinação do perfil de aminoácidos livres (AA). Adicionalmente foi ainda avaliada a presença de três compostos bioactivos (anserina, carnosina e creatina).

## 6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Entre outros benefícios, a utilização de AFL constitui uma prática extensamente recomendada como uma alternativa efectiva para minimizar a acumulação de PAH. Se por um lado a utilização do fumo líquido visa a diminuição da concentração de PAH, importa igualmente salvaguardar que desta prática não resultam alterações ao nível da microbiota que possam intensificar a formação de AB. Neste contexto, para além da redução de PAH (já abordada no Capítulo 4), esta investigação pretendeu avaliar o efeito da utilização do AFL ao nível da proteólise, designadamente no que respeita às fracções azotadas e ao perfil de AA libertados, assim como no grau de aminogénese e nos teores dos compostos bioactivos.

### 6.2.1. Delineamento experimental

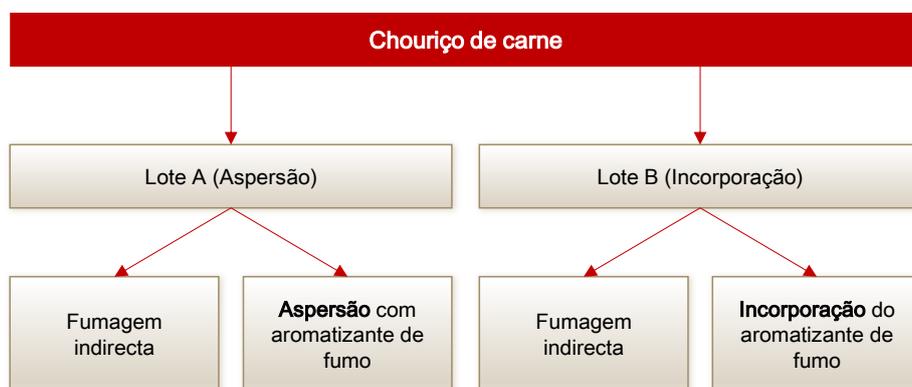
A avaliação da influência devida à utilização de aroma de fumo relativamente à fumagem convencional considerou duas metodologias de aplicação possíveis: aspersão (através da sua pulverização à superfície dos enchidos) e incorporação directamente na formulação do chouriço de carne (à semelhança dos demais ingredientes).

A avaliação dos parâmetros em estudo foi realizada através da análise das amostras de chouriço de carne em quatro momentos distintos: imediatamente após a condimentação da massa de carne e gordura (cujas amostras foram identificadas como “MP”), após conclusão do processamento (produto final, designadas por “PF”) e após 1 e 3 meses de armazenamento (denominadas por “1M” e “3M”, respectivamente).

### 6.2.2. Produção à escala piloto do chouriço de carne

A descrição do processamento do chouriço de carne utilizado nesta investigação pode ser consultada na secção 4.2.3.

Na Figura 44 é apresentado o conjunto de amostras estudado, que incluiu enchidos produzidos em dois lotes: Lote A e Lote B, sendo que cada um deles incluiu, por sua vez, um grupo de amostras identificado por “Controlo” (cuja secagem decorreu alternadamente em câmara e fumeiro) e outro por AFL (composto por produtos que foram tratados com AFL e cuja secagem se desenrolou estritamente em câmara de ambiente controlado).



**Figura 44.** Representação esquemática do tipo de amostras processadas, em função do tratamento com AFL e regime de secagem.

### 6.2.3. Parâmetros físico-químicos e indicadores da proteólise

A análise do pH, teor de proteína e das fracções azotadas (ANP, AAL e ABVT) seguiram o protocolo previamente apresentado na secção 5.2.2.

#### 6.2.4. Perfil de aminoácidos livres

A técnica usada para a extracção dos AA e respectiva desproteinização dos extractos teve por base o protocolo experimental implementado por Aristoy e Toldrá (1991). A 4 g de amostra previamente homogeneizada em Grindomix (GM 200 Retsch, Haan, Alemanha) adicionaram-se 40 mL de HCl (0,1 M). Esta mistura foi então homogeneizada em Polytron PT 3100 (Kinematica AG, Suíça) com três ciclos de 20 segundos cada. O extracto contendo os AA foi então centrifugado a 10000g durante 20 minutos, a uma temperatura previamente ajustada para 4 °C (Sorvall Instruments, Wilmington, Delaware, E. U. A.). Por fim, filtrou-se o sobrenadante a vácuo com filtro de fibra de vidro (Macherey-Nagel, MN GF-3) e desproteinizou-se. Para a desproteinização, 2 mL de extracto foram adicionados de 4 mL de acetonitrilo e deixados em repouso durante 30 minutos, após o qual se centrifugou a 7000g durante 15 minutos.

Previamente à separação cromatográfica dos AA, derivatizou-se o extracto usando-se para o efeito orto-ftalaldeído (*ortho-phthalaldehyde* também designado por OPA), na presença do co-factor 2-mercaptoetanol (Antoine *et al.*, 1999). A solução de derivatização foi preparada dissolvendo 27 mg de OPA (Sigma-Aldrich, E. U. A.) em 500 µL de etanol absoluto (Fluka, E. U. A.), à qual se adicionaram 5 mL da solução de tetraborato de sódio (0,1 M) e 50 µL de mercaptoetanol (Fluka, E. U. A.). Para um volume de 200 µL do extracto de AA adicionaram-se 800 µL de reagente de derivatização. Após agitação no vortex por exactamente 1 minuto, 20 µL do extracto foram injectados no sistema cromatográfico.

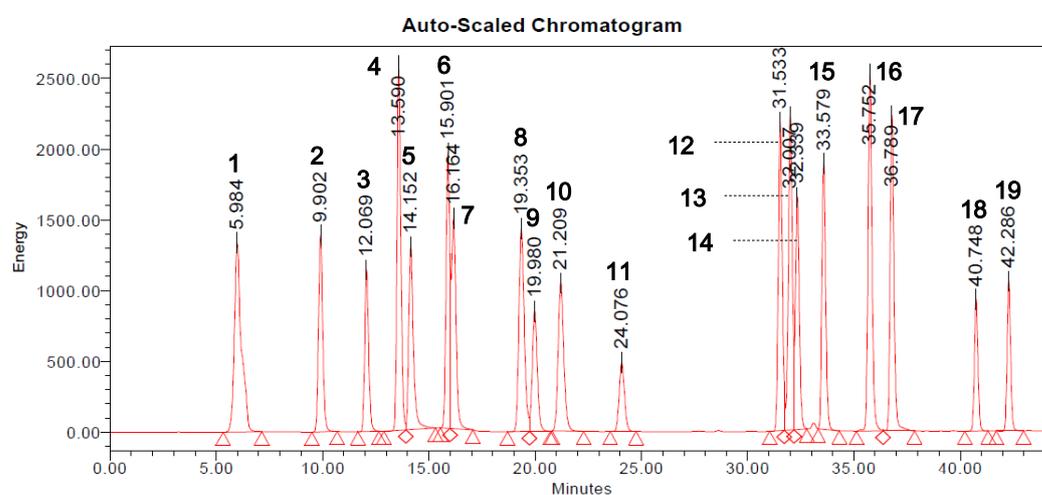
A separação cromatográfica realizou-se num sistema HPLC Alliance Separation Module 2695 (Waters, Milford, MA) equipado com um detector de fluorescência Multi λ Fluorescence Detector 2475 (Waters, Milford, MA), ajustado para os comprimentos de onda 338/425 nm (Ex/Em). Os AA foram separados em fase reversa com uma coluna Spherisorb 5 µm ODS2, 4,6 x 250 mm (Waters, Milford, MA) utilizando uma mistura de solventes que continha tampão fosfato a 50 mM (pH 5,5), metanol e tetrahidrofurano.

O programa de eluição com o solvente A (tampão Fosfato:MeOH:THF (80:19:1)) e o solvente B (MeOH:Tampão Fosfato (80:20)) é apresentado na Tabela 25.

Os padrões individuais dos 19 AA (L-ácido aspártico, L-ácido glutâmico, L-serina, L- glutamina, L-histidina, L-treonina, L-glicina, L-aurina, L-alanina, L-arginina, L-tirosina, L-metionina, L-valina, L-triptofano, L-fenilalanina, L-soleucina, L-leucina, L-ornitina, L-lisina) em estudo (todos adquiridos à Sigma-Aldrich, E. U. A.) foram combinados. A sua quantificação foi efectuada pelo método do padrão externo utilizando as respectivas rectas de calibração, determinadas utilizando a mistura dos 19 padrões individuais de AA. Na Figura 45 é apresentado, a título de exemplo, um cromatograma de uma das soluções padrão analisada. Para a avaliação do perfil de AA todas as amostras foram analisadas em triplicado e os extractos injectados em duplicado, sendo os resultados finais expressos em mg/100 g de matéria seca (MS).

**Tabela 25.** Gradiente de eluição usado na separação dos aminoácidos.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	0,5	100	0
1	1,00	100	0
11	1,00	75	25
13	1,00	75	25
20	1,50	75	25
50	1,50	0	100
60	1,50	100	0



**Figura 45.** Exemplo de cromatograma da mistura de padrões com os 19 aminoácidos (AA) em análise. Picos identificados: 1: L-ácido aspártico; 2: L-ácido glutâmico; 3: L-serina; 4: L-glutamina; 5: L-histidina; 6: L-treonina; 7: L-glicina; 8: L-aurina; 9: L-alanina; 10: L-arginina; 11: L-tirosina; 12: L-metionina; 13: L-valina; 14: L-triptofano; 15: L-fenilalanina; 16: L- isoleucina; 17: L-leucina; 18: L-ornitina; 19: L-lisina.

### 6.2.5. Perfil de amins biogénicas

A análise de AB seguiu os mesmos procedimentos anteriormente descritos na secção 5.2.3.

### 6.2.6. Perfil de compostos bioactivos: carnosina, anserina e creatina

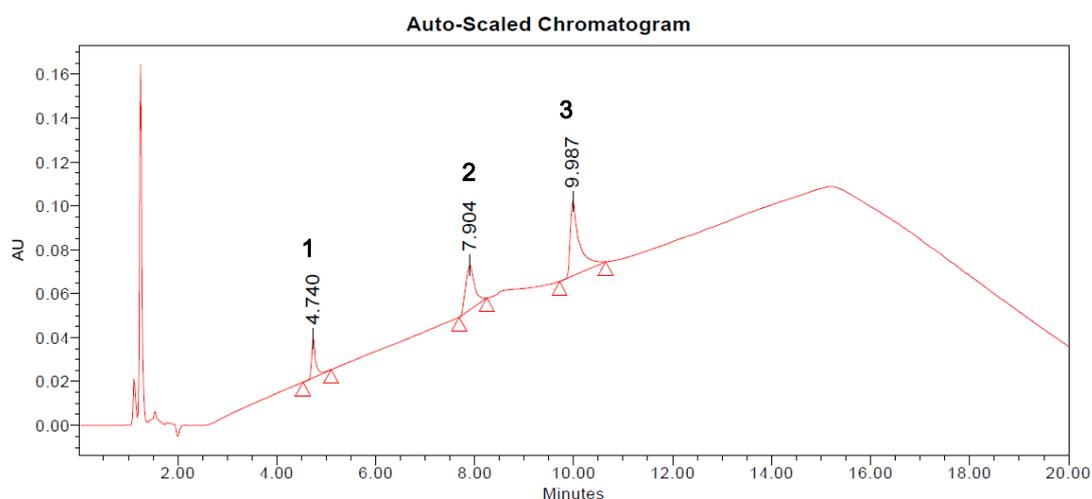
Os compostos bioactivos foram extraídos de acordo com o método descrito por Mora *et al.* (2007) com algumas modificações. Dois gramas de amostra foram homogeneizados em Polytron PT 3100 (Kinematica AG, Suíça) na presença de 45 mL de HCl (0,01 M). O extracto obtido foi centrifugado a uma velocidade de 10000g durante 20 minutos a 4 °C (Sorvall Instruments, Wilmington, Delaware, E. U. A.) e o sobrenadante filtrado através de filtro de fibra de vidro (Sartorius, Barcelona, Espanha). A 500 µL do filtrado foram adicionados 1,5 mL de acetonitrilo.

Após um período de repouso de 30 minutos (a fim de remover as proteínas), filtrou-se o extracto já desproteínizado através de Acrodisc de 0,45 µm e introduziu-se uma alíquota (20 µL) no sistema de HPLC para análise.

A separação dos compostos bioactivos foi realizada no sistema cromatográfico anteriormente descrito, equipado com uma coluna Atlantis HILIC Silica Column 4,6 x 250 mm, 3 µm (Waters, Milford, MA) por meio de interação hidrofílica. A solução de eluição combinou acetato amónio a 0,065 mM; pH 5,5 em água/acetonitrilo (25:75) (solvente A) com acetato amónio a 4,55 mM, pH 5,5 em água/acetonitrilo (70:30) (solvente B), tal como se apresenta na Tabela 26, com um fluxo de 1,4mL/min. A creatina, carnosina e anserina (padrões individuais adquiridos à Sigma-Aldrich, E. U. A.) foram identificadas com recurso a um detector Dual λ UV/Vis Detector 2487 (Waters, Milford, MA), a 214 nm com base no seu tempo de retenção (como se apresenta na Figura 46). A respectiva quantificação foi feita por meio de calibração externa. Todas as amostras foram analisadas em triplicado e cada extracto injectado em duplicado, sendo os resultados finais apresentados em mg/100 g de matéria seca (MS).

**Tabela 26.** Gradiente de eluição usado na separação da carnosina, anserina e creatina.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
13	0	100
20	100	0



**Figura 46.** Exemplo de cromatograma de uma solução de padrões individuais de creatina (1), carnosina (2) e anserina (3).

### 6.2.7. Análise estatística

Os resultados foram tratados por meio de análise de variância (Factorial ANOVA) em que o processamento (“Controlo” e “AFL”) e o tempo (“MP”, “PF”, “1M” e “3M”) corresponderam às variáveis independentes. Na medida em que os parâmetros em estudo são influenciados pela qualidade da matéria-prima usada e perante a impossibilidade de processar em simultâneo todo o chouriço de carne, o Lote (A e B) foi igualmente considerado como um factor para efeitos de tratamento estatístico. As diferenças entre as médias foram avaliadas segundo o teste *Honest Significant Differences* (HSD Tukey), definido para  $p < 0,05$ . As relações entre os diferentes parâmetros foram estabelecidas com base na elaboração de matrizes de correlação (correlações de Pearson). Toda a análise estatística agora referida foi efectuada no *software* Statistica 10 (StatSoft Inc, 1984-2011).

## 6.3. RESULTADOS

### 6.3.1. Parâmetros físico-químicos e indicadores da proteólise

Associado às várias etapas que constituem o processo de fabrico do chouriço de carne, ocorre um vasto conjunto de reacções que conduzem a diversas alterações de ordem, química, bioquímica e organoléptica. Assim sendo, os parâmetros pH, ANP, AAL e ABVT foram avaliados em função da tecnologia de processamento e das várias etapas do processamento e armazenamento. A maioria destes parâmetros foi fortemente ( $p < 0,05$ ) influenciada pelo lote de fabrico, pelo modo de utilização do aroma de fumo líquido, bem como pelo tempo de processamento e/ou armazenamento. Desde logo verificaram-se diferenças no pH ao nível da matéria-prima utilizada nos Lotes A e B que, embora significativas ( $p < 0,05$ ), em média não foram além de 0,15 unidades de pH. A etapa correspondente ao processamento tecnológico pautou-se por uma descida do valor de pH, como atestam as diferenças verificadas entre as amostras “PF” e a massa já condimentada (“MP”), na ordem de 0,45 e 0,40 unidades de pH para os Lotes A e B, respectivamente. O padrão evolutivo do parâmetro pH nas amostras “AFL” provenientes do Lote B, em que se procedeu à adição de fumo por incorporação, distinguiu-se das restantes. Estas amostras registaram um pH final de 5,76, implicando uma variação do pH durante a fase de fermentação e secagem menos acentuada (cerca de metade) quando comparada com as restantes amostras. Adicionalmente, os resultados evidenciam que as reduções de pH ocorridas no período de tempo entre a condimentação da massa de chouriço de carne e o final do armazenamento foram mais pronunciadas nas amostras “Controlo”, independentemente do lote considerado. No final do armazenamento o pH destas amostras foi, respectivamente, de 5,56 e 5,51 ( $p > 0,05$ ) (nos Lotes A e B (Tabela 27), registando-se diferenças

significativas entre as amostras “AFL” provenientes de ambos os lotes, com 5,64 e 5,70 unidades de pH ( $p < 0,05$ ).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 27, relativos à determinação do teor das várias fracções azotadas, em particular aos valores de ANP, é possível identificar diferenças nas matérias-primas dos dois lotes. No caso do Lote A foram detectados 6,24 mg/g em ANP, enquanto no Lote B esta fracção correspondeu entre 6,68 e 6,40 mg/g (“Controlo” e “AFL”, respectivamente). Após uma ligeira ( $p > 0,05$ ) redução inicial, o teor em ANP nas amostras de chouriço de carne do Lote A, registou um incremento que se prolongou até ao final do primeiro mês de armazenamento dos produtos “AFL” e até final dos 3 meses no caso das amostras “Controlo”. Em contrapartida, no Lote B, independentemente da adição do aroma de fumo, a tendência crescente foi interrompida durante o primeiro mês de armazenamento, sendo mais tarde retomada até ao final do período considerado (amostras “3M”). Por outro lado, a fracção de ANP quantificada foi, de um modo geral, superior nas amostras designadas como “Controlo” nas quais, o processo de secagem se realizou parcialmente no fumeiro, indicando uma actividade proteolítica mais intensa comparativamente às amostras “AFL”. As referidas diferenças acentuaram-se no chouriço de carne armazenado por 3 meses, onde foram encontrados 7,21 e 7,85 mg/g nas amostras “Controlo” (Lotes A e B, respectivamente) e 6,78 e 7,47 mg/g nas homólogas tratadas com aroma de fumo líquido (Lotes A e B, pela mesma ordem).

**Tabela 27.** Valores de pH e teores das várias fracções azotadas (expressos em matéria seca, sob a forma média  $\pm$  DP) determinados no chouriço de carne.

	Lote A (Aspersão)								Lote B (Incorporação)							
	Controlo				AFL				Controlo				AFL			
	MP	PF	1M	3M	MP	PF	1M	3M	MP	PF	1M	3M	MP	PF	1M	3M
<i>pH</i>	6,05 <sup>i</sup>	5,60 <sup>b,c,d</sup>	5,57 <sup>b,c</sup>	5,56 <sup>b</sup>	6,05 <sup>i</sup>	5,61 <sup>c,d</sup>	5,63 <sup>d</sup>	5,64 <sup>d,e</sup>	5,90 <sup>h</sup>	5,49 <sup>a</sup>	5,49 <sup>a</sup>	5,51 <sup>b</sup>	5,98 <sup>i</sup>	5,76 <sup>g</sup>	5,68 <sup>e,f</sup>	5,70 <sup>f</sup>
	$\pm 0,01$	$\pm 0,00$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,00$
<i>ANP (mg/g)</i>	6,24 <sup>a,b</sup>	6,01 <sup>a</sup>	6,57 <sup>c,d</sup>	7,21 <sup>h,i</sup>	6,24 <sup>a,b</sup>	6,11 <sup>a</sup>	6,53 <sup>c,d</sup>	6,78 <sup>d,e,f</sup>	6,68 <sup>d,e</sup>	7,00 <sup>f,g,h</sup>	6,86 <sup>e,f,g</sup>	7,85 <sup>i</sup>	6,40 <sup>b,c</sup>	6,93 <sup>e,f,g</sup>	7,10 <sup>g,h</sup>	7,47 <sup>i</sup>
	$\pm 0,11$	$\pm 0,02$	$\pm 0,08$	$\pm 0,12$	$\pm 0,11$	$\pm 0,07$	$\pm 0,03$	$\pm 0,04$	$\pm 0,07$	$\pm 0,04$	$\pm 0,03$	$\pm 0,05$	$\pm 0,04$	$\pm 0,01$	$\pm 0,07$	$\pm 0,05$
<i>AAL (mg/g)</i>	0,61 <sup>a</sup>	1,50 <sup>c</sup>	1,85 <sup>e,f</sup>	2,62 <sup>i</sup>	0,61 <sup>a</sup>	1,77 <sup>d,e</sup>	2,05 <sup>g</sup>	2,22 <sup>h</sup>	0,96 <sup>b</sup>	2,27 <sup>h</sup>	2,49 <sup>i</sup>	2,78 <sup>i</sup>	1,09 <sup>b</sup>	1,67 <sup>d</sup>	1,98 <sup>f,g</sup>	2,57 <sup>i</sup>
	$\pm 0,00$	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$	$\pm 0,09$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,03$	$\pm 0,11$	$\pm 0,11$	$\pm 0,00$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$	$\pm 0,08$	$\pm 0,04$	$\pm 0,00$
<i>ABVT (mg/g)</i>	0,25 <sup>a</sup>	0,47 <sup>c,d</sup>	0,51 <sup>d,e,f</sup>	0,54 <sup>f,g</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,43 <sup>c</sup>	0,51 <sup>d,e,f</sup>	0,62 <sup>h,i</sup>	0,48 <sup>c,d,e</sup>	0,57 <sup>g,h</sup>	0,75 <sup>i</sup>	0,78 <sup>i</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,51 <sup>d,e,f</sup>	0,53 <sup>e,f,g</sup>	0,64 <sup>i</sup>
	$\pm 0,00$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,02$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,00$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,00$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

ANP: azoto não proteico; AAL: azoto dos aminoácidos livres; ABVT: azoto básico volátil total.

MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.

Atendendo aos resultados relativos à fracção de AAL foi possível identificar efeitos distintos dependendo da forma como o condensado de fumo líquido foi aplicado (aspersão ou incorporação). Durante o processo de cura, os teores iniciais de AAL registados nas amostras de massa de chouriço de carne “Controlo” aumentaram em cerca de 0,89 mg/g (de 0,61 para 1,50 mg/g) e 1,82 mg/g (de 0,96 mg/g para 2,78 mg/g) nos Lotes A e B, respectivamente. Em termos médios, e apesar das diferenças ( $p < 0,05$ ) identificadas nas massas de chouriço de carne (amostras MP), o incremento verificado nesta fase apresentou a mesma ordem de grandeza em ambos os lotes de fabrico, em cerca de 2,4 vezes. No entanto, o nível de AAL no produto final das amostras com aroma de fumo foi de 1,77 mg/g (Lote A) e de 1,67 mg/g (Lote B), o que correspondeu a aumentos de 2,9 e 1,5 vezes, comparativamente aos teores iniciais. Por outro lado, ao contrário do que se verificou para o ANP, os teores de AAL no chouriço de carne “AFL\_PF” e “AFL\_1M” do Lote A foram superiores aos homólogos “Controlo”. Esta tendência, como mais à frente se irá demonstrar, não foi contudo corroborada pelos teores de AA determinados para estes enchidos. O facto de alguns aminoácidos como a prolina, a cisteína e a cistina não serem detectados pela técnica utilizada para a análise dos AA, terá contribuído para subestimar o teor total em AA, exercendo alguma influência sobre a tendência verificada, na medida em que se registaram teores evolutivos semelhantes entre os dois tipos de amostra. Ainda assim, os níveis mais elevados de AAL foram detectados sem excepção na fase final do período de armazenamento testado (amostras “3M”), variando entre 2,22 e 2,78 mg/g (amostras “AFL\_3M” do Lote A e “Controlo\_3M” do Lote B, respectivamente).

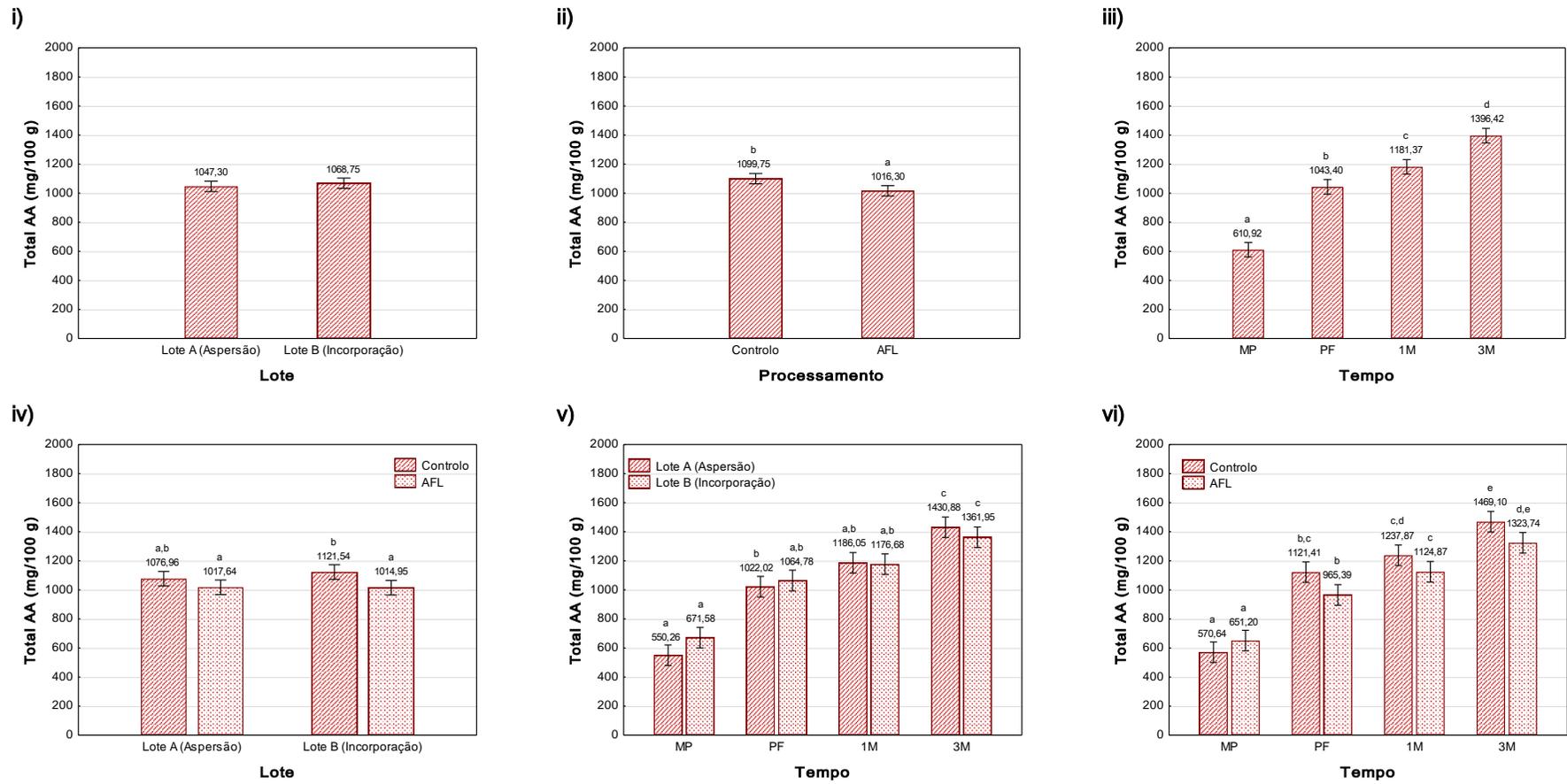
Relativamente à fracção de ABVT, os teores encontrados variaram entre 0,25 e 0,78 mg/g, tal como se apresenta na Tabela 27. Para qualquer dos quatro tipos de amostras avaliadas os menores teores de ABVT foram encontrados, invariavelmente, nas amostras “MP” (massa de carne e gordura e condimentada), e os mais elevados naquelas que permaneceram armazenadas por 3 meses (“3M”). Analogamente ao que se registou para as fracções ANP e AAL, os níveis de ABVT mantiveram-se em níveis mais reduzidos nas amostras “MP” do Lote A (0,25 mg/g). A evolução dos níveis de ABVT ao longo do tempo, para os enchidos deste lote, foi bastante idêntica independentemente da tecnologia adoptada. Com base nos resultados que constam da Tabela 27, só após um período de 3 meses sobre a embalagem dos enchidos se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as duas tecnologias estudadas. Para estes enchidos a concentração de ABVT correspondeu a 0,54 e 0,62 mg/g, quantificados no chouriço de carne “Controlo” e “AFL”, respectivamente. No Lote B, todavia, diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os produtos “Controlo” e “AFL” foram perceptíveis mais cedo, logo nas amostras “MP”. Em média, as amostras “Controlo\_MP” destacaram-se com os maiores ( $p < 0,05$ ) teores de ABVT (0,48 mg/g), comparativamente às que continham aroma de fumo na sua composição (0,37 mg/g). Dos vários tipos de produtos analisados, os do Lote B sujeitos a fumagem foram os que apresentaram repetidamente maiores níveis de ABVT, com níveis que ascenderam a 0,78 mg/g.

### 6.3.2. Perfil de aminoácidos livres

No contexto deste trabalho de investigação, um dos maiores pontos de interesse relativamente à análise do perfil de AA nos produtos cárneos curados advém do facto de estes contribuírem para a ocorrência de AB, cuja actividade biológica pode culminar em reacções adversas nos consumidores. A sua libertação, como resultado directo da proteólise, está ainda relacionada com o desenvolvimento de aromas e sabores e, desta forma, influenciarem as características sensoriais deste tipo de produtos.

Através dos dados da Figura 47, bem como da Tabela A.15 (do Apêndice) onde é apresentado com maior detalhe o nível de significância dos factores testados nos teores de aminoácidos, verifica-se que dos 3 factores testados, o factor “Tempo” foi o que se evidenciou como sendo o mais influente sobre o teor total de AA. Ainda que a concentração de AA tenha aumentado de forma progressiva ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ), este incremento incidiu principalmente sobre os estágios de maturação e secagem do chouriço de carne. Para o primeiro lote, como mostra a Figura 48, o teor inicial de 550,26 mg/100 g quase que duplicou para 1058,83 e 985,20 mg/100 g (amostras “Controlo” e “AFL”, respectivamente). A mesma tendência foi evidente nas amostras do Lote B que foram processadas em fumeiro, aumentando de 591,03 para 1183,98 mg/100 g. Em todo o caso, a Figura 48 mostra que o teor em AA evoluiu de forma similar no chouriço de carne independentemente da matéria-prima que lhe deu origem ou do tipo de processamento implementado.

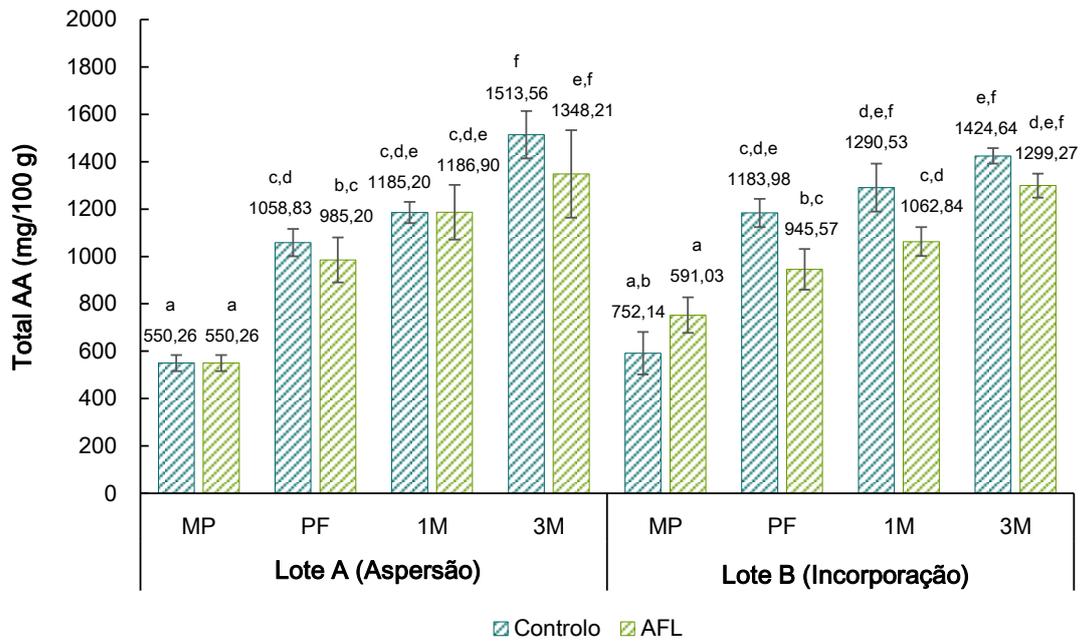
Os teores médios individuais dos AA, sumarizados na Tabela 28 realçam a prevalência da alanina, arginina e glutamina, que na massa condimentada equivaleram, pela mesma ordem, a 39, 17 e 16% (média de ambos os lotes) do total de AA quantificado. Este perfil sofreu, contudo, alterações durante as fases de secagem e armazenamento, nomeadamente no que respeita ao teor relativo de lisina que praticamente duplicou, passando de 5 para 12% do teor total em AA. Desta forma, depois da alanina (22%) e arginina (18%), a lisina passou a ser o terceiro aminoácido livre mais abundante nas amostras analisadas.



**Figura 47.** Efeito dos factores principais e respectivas interações de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores de aminoácidos livres determinados no chouriço de carne (resultados expressos em matéria seca).

Barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (i) Lote, (ii) Processamento, (iii) Tempo, (iv) Lote x Processamento, (v) Lote x Tempo e (vi) Processamento x Tempo.

MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.



**Figura 48.** Teor total em aminoácidos livres no chouriço de carne em função do lote de fabrico e tecnologia de secagem (resultados expressos em matéria seca). Barras de erro representam o desvio-padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas (Teste HSD,  $p = 0,05$ ). MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.

**Tabela 28.** Teores individuais dos aminoácidos livres (expressos em matéria seca, sob a forma média  $\pm$  DP em mg/100 g) determinados no chouriço de carne.

	Lote A (Aspersão)				"AFL"			
	"Controlo"							
	MP	PF	1M	3M	MP	PF	1M	3M
<i>Ác. aspártico</i>	ND	ND	0,33 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,10	2,38 <sup>c</sup> $\pm$ 0,52	ND	0,18 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,07	0,35 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,12	1,02 <sup>b</sup> $\pm$ 0,60
<i>Ác. glutâmico</i>	7,94 <sup>a</sup> $\pm$ 0,27	28,44 <sup>c,d</sup> $\pm$ 2,61	35,70 <sup>e</sup> $\pm$ 1,50	51,75 <sup>h</sup> $\pm$ 3,48	7,94 <sup>a</sup> $\pm$ 0,27	26,98 <sup>c</sup> $\pm$ 2,94	34,58 <sup>d,e</sup> $\pm$ 2,00	45,76 <sup>a,h</sup> $\pm$ 3,15
<i>Serina</i>	10,55 <sup>a</sup> $\pm$ 0,90	33,41 <sup>d</sup> $\pm$ 1,77	46,73 <sup>e,f</sup> $\pm$ 1,85	67,39 <sup>g</sup> $\pm$ 4,41	10,55 <sup>a</sup> $\pm$ 0,90	38,33 <sup>d,e</sup> $\pm$ 4,19	48,00 <sup>f</sup> $\pm$ 4,47	61,57 <sup>g</sup> $\pm$ 7,25
<i>Glutamina</i>	112,10 <sup>g</sup> $\pm$ 6,49	90,98 <sup>f</sup> $\pm$ 8,15	78,68 <sup>e,f</sup> $\pm$ 4,26	67,31 <sup>d,e</sup> $\pm$ 5,05	112,10 <sup>g</sup> $\pm$ 6,49	91,13 <sup>f</sup> $\pm$ 7,43	81,47 <sup>e,f</sup> $\pm$ 1,44	57,74 <sup>c,d</sup> $\pm$ 11,51
<i>Histidina</i>	6,68 <sup>a</sup> $\pm$ 0,35	28,13 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 1,76	34,40 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 1,37	51,64 <sup>h</sup> $\pm$ 3,71	6,68 <sup>a</sup> $\pm$ 0,35	26,32 <sup>b,c</sup> $\pm$ 2,71	34,21 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 3,44	44,67 <sup>g,h</sup> $\pm$ 6,56
<i>Treonina</i>	9,98 <sup>a</sup> $\pm$ 0,57	30,11 <sup>d,e</sup> $\pm$ 1,83	35,50 <sup>e</sup> $\pm$ 1,31	50,15 <sup>f</sup> $\pm$ 3,40	9,98 <sup>a</sup> $\pm$ 0,57	28,50 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 2,87	35,95 <sup>e</sup> $\pm$ 3,17	47,43 <sup>f</sup> $\pm$ 9,50
<i>Glicina</i>	23,17 <sup>a</sup> $\pm$ 1,59	44,10 <sup>c,d,e,f</sup> $\pm$ 2,90	47,48 <sup>d,e,f,g</sup> $\pm$ 2,37	61,82 <sup>h</sup> $\pm$ 4,49	23,17 <sup>a</sup> $\pm$ 1,59	37,65 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 4,28	47,66 <sup>d,e,f,g</sup> $\pm$ 5,43	55,61 <sup>f,g,h</sup> $\pm$ 8,45
<i>Taurina</i>	10,47 <sup>e</sup> $\pm$ 0,58	2,90 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 0,19	2,34 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,08	2,37 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,15	10,47 <sup>e</sup> $\pm$ 0,58	1,78 <sup>a</sup> $\pm$ 0,09	2,04 <sup>a</sup> $\pm$ 0,13	2,19 <sup>a</sup> $\pm$ 0,27
<i>Alanina</i>	210,93 <sup>a,b</sup> $\pm$ 13,57	211,54 <sup>a,b</sup> $\pm$ 12,67	203,33 <sup>a</sup> $\pm$ 9,02	198,90 <sup>a</sup> $\pm$ 12,21	210,93 <sup>a,b</sup> $\pm$ 13,57	201,16 <sup>a</sup> $\pm$ 20,76	221,23 <sup>a,b,c,d</sup> $\pm$ 19,89	210,04 <sup>a</sup> $\pm$ 34,09
<i>Arginina</i>	92,46 <sup>a</sup> $\pm$ 6,12	176,70 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 12,24	189,67 <sup>d,e,f</sup> $\pm$ 7,68	234,02 <sup>f,g</sup> $\pm$ 15,14	92,46 <sup>a</sup> $\pm$ 6,12	152,71 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 15,64	195,52 <sup>d,e,f</sup> $\pm$ 20,70	225,68 <sup>e,f,g</sup> $\pm$ 33,19
<i>Tirosina</i>	3,12 <sup>b,c</sup> $\pm$ 0,31	17,33 <sup>e</sup> $\pm$ 1,25	14,99 <sup>e</sup> $\pm$ 0,57	16,38 <sup>e</sup> $\pm$ 0,41	3,12 <sup>b,c</sup> $\pm$ 0,31	15,72 <sup>e</sup> $\pm$ 1,73	15,34 <sup>e</sup> $\pm$ 1,93	11,81 <sup>d</sup> $\pm$ 1,32
<i>Metionina</i>	3,31 <sup>a</sup> $\pm$ 0,15	20,82 <sup>b,c</sup> $\pm$ 1,10	26,17 <sup>d,e,f</sup> $\pm$ 0,73	36,01 <sup>g,h</sup> $\pm$ 2,43	3,31 <sup>a</sup> $\pm$ 0,15	18,39 <sup>b,c</sup> $\pm$ 1,47	22,79 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 2,10	27,85 <sup>e,f</sup> $\pm$ 4,16
<i>Valina</i>	8,46 <sup>a</sup> $\pm$ 0,47	41,38 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 2,35	51,77 <sup>d,e,f</sup> $\pm$ 2,16	75,04 <sup>h,i</sup> $\pm$ 5,16	8,46 <sup>a</sup> $\pm$ 0,47	37,65 <sup>b,c</sup> $\pm$ 3,66	47,34 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 4,95	61,73 <sup>f,g</sup> $\pm$ 8,72
<i>Triptofano</i>	1,49 <sup>a</sup> $\pm$ 0,14	9,61 <sup>c,d</sup> $\pm$ 0,83	11,87 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 0,43	16,84 <sup>f</sup> $\pm$ 1,49	1,49 <sup>a</sup> $\pm$ 0,14	8,77 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 0,79	11,35 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 1,33	14,83 <sup>e,f</sup> $\pm$ 2,89
<i>Fenilalanina</i>	5,81 <sup>a</sup> $\pm$ 0,28	36,43 <sup>c</sup> $\pm$ 2,16	46,34 <sup>d,e</sup> $\pm$ 2,04	64,76 <sup>g</sup> $\pm$ 4,25	5,81 <sup>a</sup> $\pm$ 0,28	30,96 <sup>b,c</sup> $\pm$ 2,98	39,08 <sup>c,d</sup> $\pm$ 4,23	48,58 <sup>d,e</sup> $\pm$ 6,35
<i>Isoleucina</i>	3,99 <sup>a</sup> $\pm$ 0,32	32,66 <sup>c</sup> $\pm$ 1,92	42,02 <sup>d,e</sup> $\pm$ 1,76	59,91 <sup>g,h</sup> $\pm$ 4,30	3,99 <sup>a</sup> $\pm$ 0,32	28,98 <sup>b,c</sup> $\pm$ 2,99	36,71 <sup>c,d</sup> $\pm$ 3,79	46,74 <sup>e,f</sup> $\pm$ 6,82
<i>Leucina</i>	9,33 <sup>a</sup> $\pm$ 0,53	59,96 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 3,29	75,67 <sup>d,e,f</sup> $\pm$ 3,14	106,81 <sup>h,i</sup> $\pm$ 7,52	9,33 <sup>a</sup> $\pm$ 0,53	54,01 <sup>b,c</sup> $\pm$ 5,20	68,10 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 7,05	84,95 <sup>g</sup> $\pm$ 10,95
<i>Ornitina</i>	4,94 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10	65,08 <sup>d,e,f</sup> $\pm$ 4,45	76,54 <sup>f,g</sup> $\pm$ 3,71	102,44 <sup>h</sup> $\pm$ 7,41	4,94 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10	72,72 <sup>e,f</sup> $\pm$ 7,01	89,28 <sup>g,h</sup> $\pm$ 10,07	97,01 <sup>h</sup> $\pm$ 10,60
<i>Lisina</i>	25,54 <sup>a</sup> $\pm$ 1,39	129,26 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 7,54	165,67 <sup>e,f,g</sup> $\pm$ 9,78	247,65 <sup>i</sup> $\pm$ 15,52	25,54 <sup>a</sup> $\pm$ 1,39	113,28 <sup>b,c</sup> $\pm$ 10,95	155,91 <sup>d,e,f</sup> $\pm$ 19,42	202,99 <sup>h,i</sup> $\pm$ 22,37

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – Não detectado.

MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.

**Tabela 28.** (Continuação)

	Lote B (Incorporação)				"AFL"			
	"Controlo"							
	MP	PF	1M	3M	MP	PF	1M	3M
<i>Ácido aspártico</i>	ND	ND	0,01 <sup>a</sup> ± 0,00	0,82 <sup>a,b</sup> ± 0,10	ND	0,09 <sup>a</sup> ± 0,01	0,16 <sup>a</sup> ± 0,05	0,15 <sup>a</sup> ± 0,07
<i>Ácido glutâmico</i>	14,83 <sup>a,b</sup> ± 1,51	35,05 <sup>d,e</sup> ± 2,90	36,69 <sup>e,f</sup> ± 2,36	43,58 <sup>f,g</sup> ± 2,13	17,56 <sup>b</sup> ± 1,74	33,07 <sup>c,d,e</sup> ± 2,35	43,62 <sup>f,g</sup> ± 3,32	51,55 <sup>h</sup> ± 1,87
<i>Serina</i>	15,41 <sup>a,b,c</sup> ± 2,04	16,39 <sup>a,b,c</sup> ± 0,99	21,12 <sup>b,c</sup> ± 1,95	24,09 <sup>c</sup> ± 0,52	17,74 <sup>a,b,c</sup> ± 1,78	17,81 <sup>a,b,c</sup> ± 1,74	12,99 <sup>a,b</sup> ± 0,79	18,34 <sup>a,b,c</sup> ± 0,84
<i>Glutamina</i>	73,66 <sup>d,e,f</sup> ± 3,70	38,43 <sup>b</sup> ± 0,48	25,19 <sup>a,b</sup> ± 2,47	12,71 <sup>a</sup> ± 0,43	74,70 <sup>d,e,f</sup> ± 6,59	39,53 <sup>b,c</sup> ± 7,79	29,30 <sup>a,b</sup> ± 8,50	15,70 <sup>a</sup> ± 0,55
<i>Histidina</i>	12,29 <sup>a</sup> ± 1,73	35,69 <sup>d,e,f</sup> ± 2,82	41,75 <sup>e,f,g</sup> ± 3,15	49,70 <sup>g,h</sup> ± 1,40	13,13 <sup>a</sup> ± 1,31	23,28 <sup>b</sup> ± 2,16	29,93 <sup>b,c,d</sup> ± 2,92	42,84 <sup>f,g</sup> ± 1,66
<i>Treonina</i>	15,75 <sup>a,b</sup> ± 2,80	17,58 <sup>a,b</sup> ± 0,65	19,61 <sup>a,b,c</sup> ± 3,27	22,89 <sup>b,c,d</sup> ± 4,02	18,50 <sup>a,b,c</sup> ± 2,67	24,08 <sup>b,c,d</sup> ± 3,49	24,43 <sup>b,c,d</sup> ± 2,23	31,66 <sup>d,e</sup> ± 2,37
<i>Glicina</i>	26,12 <sup>a,b</sup> ± 5,67	48,36 <sup>d,e,f,g</sup> ± 3,33	53,11 <sup>e,f,g,h</sup> ± 3,73	59,77 <sup>g,h</sup> ± 1,44	31,73 <sup>a,b,c</sup> ± 2,96	37,67 <sup>b,c,d</sup> ± 5,20	42,05 <sup>c,d,e</sup> ± 3,03	52,48 <sup>e,f,g,h</sup> ± 2,34
<i>Taurina</i>	10,49 <sup>e</sup> ± 0,15	3,55 <sup>b,c,d</sup> ± 0,24	3,81 <sup>c,d</sup> ± 0,18	3,82 <sup>c,d</sup> ± 0,07	13,22 <sup>f</sup> ± 1,34	3,65 <sup>b,c,d</sup> ± 0,51	4,57 <sup>d</sup> ± 0,29	4,75 <sup>d</sup> ± 0,26
<i>Alanina</i>	213,99 <sup>a,b,c</sup> ± 34,17	232,65 <sup>a,b,c,d</sup> ± 14,89	235,72 <sup>a,b,c,d</sup> ± 17,57	236,73 <sup>a,b,c,d</sup> ± 3,65	318,66 <sup>e</sup> ± 33,50	278,59 <sup>b,c,d,e</sup> ± 40,49	279,87 <sup>c,d,e</sup> ± 23,35	282,26 <sup>d,e</sup> ± 15,13
<i>Arginina</i>	106,19 <sup>a,b</sup> ± 19,55	263,11 <sup>g,h,i</sup> ± 16,72	287,74 <sup>h,i</sup> ± 22,20	311,54 <sup>i</sup> ± 6,45	131,11 <sup>a,b,c</sup> ± 13,07	177,96 <sup>c,d,e</sup> ± 20,91	206,76 <sup>e,f</sup> ± 12,65	258,51 <sup>g,h</sup> ± 12,88
<i>Tirosina</i>	0,99 <sup>a,b</sup> ± 0,87	0,01 <sup>a</sup> ± 0,01	0,06 <sup>a</sup> ± 0,08	0,06 <sup>a</sup> ± 0,10	3,77 <sup>c</sup> ± 0,69	2,04 <sup>a,b,c</sup> ± 0,18	0,89 <sup>a,b</sup> ± 0,77	0,49 <sup>a,b</sup> ± 0,80
<i>Metionina</i>	6,18 <sup>a</sup> ± 1,02	29,28 <sup>f</sup> ± 1,16	34,90 <sup>g</sup> ± 3,33	40,71 <sup>h</sup> ± 0,95	6,87 <sup>a</sup> ± 0,59	16,82 <sup>b</sup> ± 0,78	22,22 <sup>c,d</sup> ± 1,24	30,81 <sup>f,g</sup> ± 0,97
<i>Valina</i>	13,76 <sup>a</sup> ± 1,81	58,07 <sup>e,f,g</sup> ± 2,94	68,02 <sup>g,h</sup> ± 6,01	80,93 <sup>i</sup> ± 2,03	15,34 <sup>a</sup> ± 1,42	34,19 <sup>b</sup> ± 2,00	44,91 <sup>b,c,d</sup> ± 3,74	63,57 <sup>g</sup> ± 2,30
<i>Triptofano</i>	3,21 <sup>a</sup> ± 1,48	13,00 <sup>d,e,f</sup> ± 0,32	16,67 <sup>f</sup> ± 2,75	16,71 <sup>f</sup> ± 0,33	4,14 <sup>a,b</sup> ± 0,68	8,14 <sup>b,c</sup> ± 1,31	10,17 <sup>c,d,e</sup> ± 0,52	17,37 <sup>f</sup> ± 3,72
<i>Fenilalanina</i>	9,70 <sup>a</sup> ± 1,41	50,65 <sup>e,f</sup> ± 2,84	60,06 <sup>f,g</sup> ± 6,01	68,94 <sup>g</sup> ± 1,49	10,91 <sup>a</sup> ± 0,88	25,92 <sup>b</sup> ± 1,81	35,07 <sup>b,c</sup> ± 2,99	50,76 <sup>e,f</sup> ± 1,56
<i>Isoleucina</i>	7,11 <sup>a</sup> ± 1,04	44,21 <sup>d,e</sup> ± 2,36	53,23 <sup>f,g</sup> ± 4,70	63,87 <sup>h</sup> ± 1,42	8,11 <sup>a</sup> ± 0,87	23,56 <sup>b</sup> ± 1,82	32,53 <sup>b,c</sup> ± 2,89	47,96 <sup>e,f</sup> ± 1,71
<i>Leucina</i>	15,68 <sup>a</sup> ± 2,38	81,16 <sup>e,f,g</sup> ± 4,17	96,67 <sup>g,h</sup> ± 9,00	113,30 <sup>i</sup> ± 2,42	17,53 <sup>a</sup> ± 1,47	45,91 <sup>b</sup> ± 3,32	63,08 <sup>c,d</sup> ± 5,37	91,73 <sup>g,h</sup> ± 2,90
<i>Ornitina</i>	7,55 <sup>a</sup> ± 4,40	67,05 <sup>d,e,f</sup> ± 2,59	60,13 <sup>c,d,e</sup> ± 7,04	48,30 <sup>b,c</sup> ± 1,54	7,69 <sup>a</sup> ± 0,59	53,92 <sup>b,c,d</sup> ± 4,46	44,77 <sup>b,c</sup> ± 2,58	40,90 <sup>b</sup> ± 1,41
<i>Lisina</i>	38,12 <sup>a</sup> ± 10,54	149,75 <sup>d,e,f</sup> ± 5,64	176,05 <sup>f,g,h</sup> ± 20,83	226,17 <sup>i,j</sup> ± 5,72	41,44 <sup>a</sup> ± 3,56	99,36 <sup>b</sup> ± 1,17	135,51 <sup>c,d,e</sup> ± 7,43	197,45 <sup>g,h,i</sup> ± 8,16

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – Não detectado.

MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.

O teor em alanina, como se mostra na Tabela 28, foi idêntica ( $p > 0,05$ ) nas amostras de massa do chouriço de carne “Controlo\_MP” dos dois lotes com níveis de 210,93 e 213,99 mg/100 g nos Lotes A e B, respectivamente. No que respeita a este aminoácido, as amostras “AFL\_MP” do Lote B constituíram uma exceção, para a qual se registaram níveis médios de alanina superiores ( $p < 0,05$ ) na ordem dos 318,66 mg/100 g face às restantes amostras. Em termos relativos, estes teores de alanina equivalem entre 36 e 42% do total de aminoácidos identificados (Lote B: “Controlo” e “AFL”, respectivamente). Apesar de se verificar uma ligeira tendência decrescente durante o armazenamento, não se observaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as amostras “PF”, “1M” e “3M”, razão pela qual, em termos relativos, a alanina deixou de ser o aminoácido prevalente em detrimento quer da arginina quer da lisina.

Considerando o conjunto dos 19 aminoácidos estudados, a arginina foi o segundo AA mais importante, tendo correspondido em média entre 15% e 22%. Os teores inicialmente encontrados nas amostras “MP” (entre 92,46 mg/100 g nas amostras do Lote A e 131,11 mg/100 g nas amostras “AFL” do Lote B, tal como consta da Tabela 28) aumentaram substancialmente ( $p < 0,05$ ) com o processamento e, mais tarde, no decorrer do armazenamento. Independentemente do lote, o maior incremento de arginina verificou-se geralmente na sequência do processamento, em particular nas amostras “Controlo”. Apesar de não se terem apurado diferenças decorrentes do processamento nas amostras de chouriço de carne do Lote A, já no Lote B estas foram óbvias. O efeito do aroma de fumo líquido e secagem exclusivamente em câmara em substituição da fumagem convencional conduziu a menores ( $p < 0,05$ ) quantidades de arginina logo após o processamento (amostras “PF”) onde foram quantificados 263,11 e 177,96 mg/100 g deste aminoácido (amostras “Controlo” e “AFL” do Lote B, respectivamente). As diferenças encontradas entre estes dois tipos de amostras perduraram durante os 3 meses em que as amostras permaneceram armazenadas. No final dos 3 meses de armazenamento, foram detectados 311,54 mg/100 g de arginina nas amostras de enchidos fumados e 258,51 mg/100 g naquelas que continham aroma de fumo líquido. Em contrapartida, os teores médios de arginina no “PF” do Lote A variaram entre 176,70 e 152,71 mg/100 g (“Controlo” e “AFL”, respectivamente). Já no final do período de armazenamento testado, os teores deste aminoácido nas amostras de chouriço de carne do Lote A equivaleram a 234,02 e 225,68 mg/100 g, quantificados nas amostras “Controlo” e “AFL”, respectivamente (Tabela 28).

A lisina, comparativamente à alanina e arginina, esteve presente em menor quantidade, nomeadamente na massa de carne e gordura (“MP”), como atestam os resultados da Tabela 28. Para ambas as amostras “MP”, os níveis deste aminoácido foram de 25,54 a 41,44 mg/100 g (Lote A e “AFL” do Lote B, pela respectiva ordem), sem diferenças entre elas ( $p > 0,05$ ). Após o processamento, verificou-se que os teores em lisina aumentaram de forma significativa ( $p < 0,05$ ), entre 2 a 5 vezes em relação aos teores encontrados na “MP”. Nos “PF” sujeitos alternadamente a fumagem e secagem em câmara foram detectadas quantidades mais elevadas de lisina (entre 129,26 e 149,75 mg/100 g, presentes nos Lotes B e A, respectivamente) relativamente aos produtos “AFL” (99,36 e 113,28 mg/100 g, pela mesma ordem nos Lotes B e

A). De igual forma, o armazenamento também contribuiu para o reforço dos teores em lisina, cujas concentrações nos Lotes A e B ascenderam a 226,17 e 247,65 mg/100 g (“Controlo”) e 197,45 e 202,99 mg/100 g (“AFL”), respectivamente.

Muito embora, a acumulação dos aminoácidos tenha sido atestada pelos resultados apresentados na Tabela 28, verificaram-se algumas excepções para a glutamina, a ornitina (apenas no Lote B) e a taurina, cujas concentrações registaram um decréscimo ao longo do tempo. Destes aminoácidos, os dois primeiros têm especial interesse na medida em que estão directamente envolvidos na formação de putrescina. Por outro lado, os teores iniciais médios de glutamina divergiram significativamente ( $p < 0,05$ ) nas duas matérias-primas utilizadas na produção do chouriço de carne. Enquanto no Lote A as amostras “MP” continham 112,10 mg/100 g, no Lote B o nível de glutamina foi substancialmente inferior, com um teor máximo de 74,70 mg/100 g. Todavia as diferenças identificadas nas amostras “MP” de ambos os lotes, de aproximadamente 40 mg/100 g, mantiveram-se inalteradas até ao final do período de armazenamento. Em contrapartida, a evolução do teor em ornitina ao longo do tempo seguiu diferentes tendências dependendo do lote em causa. No Lote A esta aumentou ao longo de todo o período testado, enquanto no Lote B, após um incremento ( $p < 0,05$ ) inicial coincidente com o estágio de secagem do chouriço de carne, seguiu-se um ligeiro decréscimo ( $p > 0,05$ ) que se manteve até ao final do armazenamento.

Mesmo tratando-se de aminoácidos menos abundantes face aos discutidos anteriormente, a leucina, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, histidina, glicina e ácido aspártico apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na dependência das tecnologias de processamento estudadas. De facto, ainda que nem sempre se tenham registado diferenças entre as amostras de “PF” (produto final), estas acabaram por se revelar durante o armazenamento, onde as amostras produzidas em fumeiro apresentaram invariavelmente maior acumulação de qualquer um destes aminoácidos (Tabela 28). Uma vez mais, a importância destes dados reside no facto de, na presença de enzimas aminodescarboxilásicas, poder ocorrer a formação de AB, em particular a partir da descarboxilação da fenilalanina e da histidina. A libertação de valina, fenilalanina, isoleucina, metionina e leucina ao longo do tempo foi bastante idêntica entre si. Para estes aminoácidos registou-se uma acumulação significativa ( $p < 0,05$ ) decorrente do processamento (amostras “PF”), independentemente do lote. De salientar, contudo, que o aumento observado para estes aminoácidos se mostrou sistematicamente superior nas amostras “Controlo”, comparativamente às amostras “AFL”. A evolução do triptofano durante o armazenamento seguiu um padrão idêntico ao da valina, fenilalanina, isoleucina, metionina e leucina. Contudo, para este aminoácido em particular, decorridos 3 meses sobre a embalagem dos produtos, não se registaram diferenças entre as amostras “Controlo” e “AFL”, cujos teores finais variaram entre 14,83 e 17,37 mg/100 g (amostras “3M”). Paralelamente, os dados permitiram reconhecer um padrão de acumulação comum para a histidina, glicina e ácido glutâmico. Decorrente do processamento do chouriço de carne libertaram-se teores assinaláveis ( $p < 0,05$ ) destes três aminoácidos para valores próximos ou superiores ao dobro da sua

concentração inicial. Os teores de histidina e glicina nas amostras “PF”, por exemplo, variaram entre 23,28 e 35,69 mg/100 g e 37,65 e 48,36 mg/100 g, respectivamente. A tendência para a acumulação destes dois aminoácidos denotou, todavia, uma desaceleração durante os primeiros 30 dias de armazenamento (amostras “1M”), que foi posteriormente retomada. No final do armazenamento (amostras “3M”) os teores de histidina ascenderam a 51,64 mg/100 g, registados no chouriço “Controlo” do Lote A. De facto, seguindo a tendência global da maioria dos aminoácidos, a maior acumulação de valina, fenilalanina, isoleucina, metionina, leucina, triptofano, histidina, glicina e ácido glutâmico coincidiu com a etapa do processamento. Após o processamento das amostras de chouriço de carne, os teores de histidina variaram entre 23,28 e 35,69 mg/100 g (produtos “AFL” e “Controlo” do Lote B, respectivamente), registando-se aumentos ( $p < 0,05$ ) durante o armazenamento para níveis entre 42,84 e 51,64 mg/100 g (encontrados nos produtos “AFL\_3M” do Lote B e “Controlo\_3M” do Lote A, respectivamente).

As variações relativas à treonina, tirosina e serina deveram-se maioritariamente à utilização de diferentes lotes de matéria-prima para a formulação do chouriço de carne, e não em virtude do processamento tecnológico, como se verificou para os restantes aminoácidos já abordados. De facto, ainda que se tenham detectado teores iniciais (amostras “MP”) globalmente idênticos destes três aminoácidos nos Lotes A e B, estes apresentaram diferentes perfis evolutivos, dependendo do lote considerado (Tabela 28). Enquanto os teores de treonina, serina e tirosina detectados nos produtos do Lote B permaneceram inalterados ao longo do tempo, já no Lote A foi visível um aumento ( $p < 0,05$ ) logo após o processamento que, à excepção da tirosina, se prolongou até final do armazenamento. As diferenças encontradas entre os dois lotes de produção foram particularmente relevantes no caso do aminoácido precursor da tiramina, a tirosina. Para este aminoácido, o Lote A evidenciou um incremento ( $p < 0,05$ ) em mais de cinco vezes face ao teor inicial de 3,12 mg/100 g. Após o processamento (amostras “PF”), momento em que se detectou o teor máximo de tirosina, registaram-se 17,33 e 15,72 mg/100 g, pela mesma ordem, nos enchidos “Controlo” e “AFL”. Para este mesmo lote (Lote A), até ao final do armazenamento, os níveis de tirosina nos produtos “Controlo” mantiveram-se estáveis até ao final do armazenamento (16,38 mg/100 g), ao passo que se registou uma diminuição ( $p < 0,05$ ) nas amostras tratadas à superfície com fumo líquido (11,81 mg/100 g). Em compensação, de um modo geral, as amostras de chouriço de carne do Lote B evidenciaram, na sua composição, teores reduzidos de tirosina.

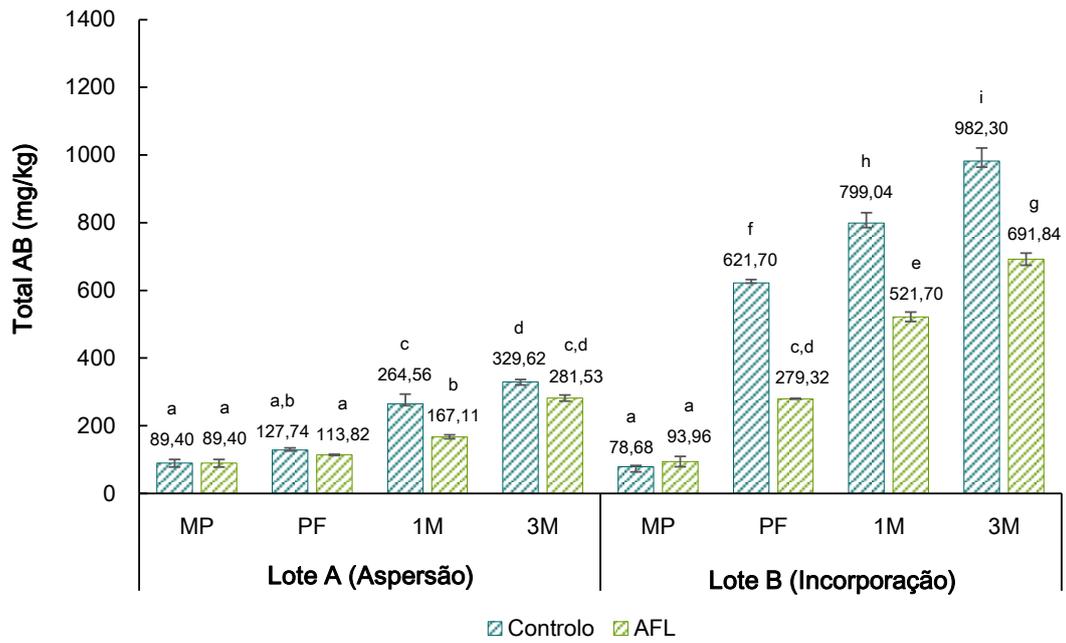
### 6.3.3. Perfil de aminas biogénicas

As AB estão entre os contaminantes químicos mais importantes no que respeita aos produtos de salsicharia, porque estão intimamente relacionados com o processo fermentativo, facto que torna a sua presença inevitável neste tipo de produtos. A produção de maiores quantidades destes contaminantes, além de indicarem o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (entre eles os que estão envolvidos na deterioração dos alimentos), pode ter também implicações na

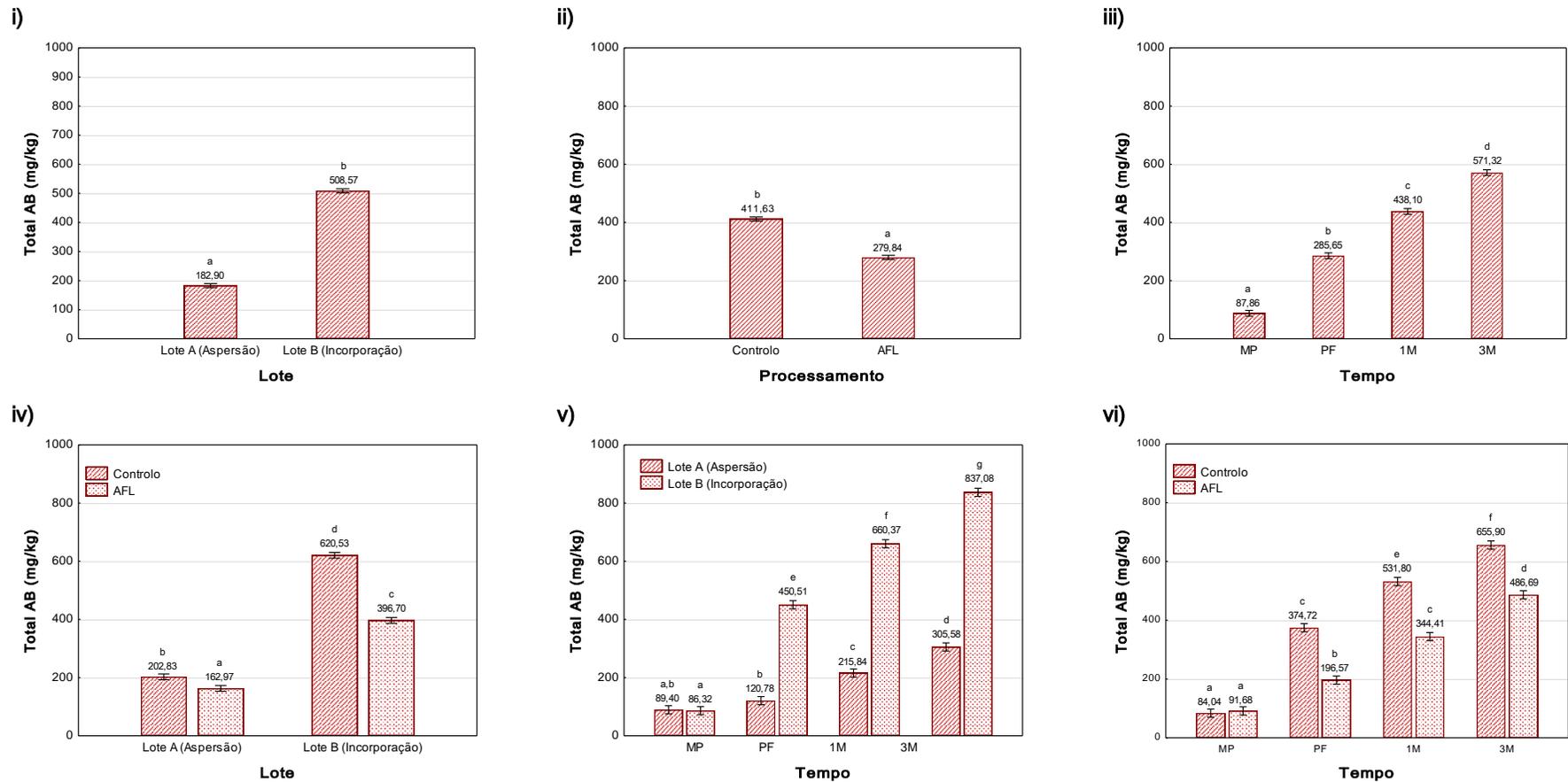
saúde dos consumidores. Esta combinação tem motivado a investigação dos factores que estão na origem da descarboxilação dos aminoácidos e formação de AB. Neste contexto, a utilização de condensados de fumo aliada à secagem em câmara, em substituição do regime de fumagem tradicional (fortemente enraizado na maioria das salsicharias tradicionais), permite exercer maior controlo sobre as condições de secagem, nomeadamente a temperatura e a humidade relativa, e desta forma minimizar a acumulação de AB. Os resultados que vão ser apresentados de seguida visam comparar o grau de aminogénese no processamento tradicional *versus* a utilização de aromas de fumo e secagem em câmara de ambiente controlado.

Como se depreende pela observação da Figura 50, a evolução do teor total em AB foi distinta para os dois lotes de enchidos produzidos, consubstanciada, aliás, pelo elevado nível de significância determinado (cf. Tabela A.16 do Apêndice). De facto, o chouriço de carne do Lote B apresentou consistentemente maiores níveis de contaminação ( $p < 0,05$ ). O tempo de armazenamento e a tecnologia de processamento demonstraram ser igualmente decisivos ( $p < 0,001$ ) para a acumulação de AB, assim como as respectivas interacções entre os três factores considerados (Figura 50 e Tabela A.16 do Apêndice). Enquanto o teor total de aminos aumentou continuamente durante o tempo de processamento e armazenamento, já a utilização de condensado de fumo combinado com secagem em câmara demonstrou ter efeito contrário, contribuindo para minimizar os níveis de contaminação com estes compostos.

Em resultado do processo proteolítico desencadeado, o teor em AB denotou um aumento progressivo ao longo do tempo. Muito embora os teores totais de aminos quantificados nas massas condimentadas (amostras “MP”) dos Lotes A e B fossem equiparáveis, as diferenças ( $p < 0,05$ ) acabaram por surgir com a evolução do processamento e posterior armazenamento (Figura 49). O incremento que se registou no chouriço de carne do Lote B elevou o teor destes contaminantes em cerca de três a seis vezes relativamente ao teor quantificado nos produtos não curados. No produto final (“PF”) do Lote B, como se ilustra na Figura 49, o teor total médio encontrado correspondeu a 279,32 e 621,70 mg/kg (amostras “AFL” e “Controlo”, pela mesma ordem), enquanto os seus homólogos do Lote A não foram além de 127,74 e 113,82 mg/kg (amostras “Controlo” e “AFL”, respectivamente). Durante o período de armazenamento, os níveis de contaminação de AB continuaram a aumentar ( $p < 0,05$ ) em ambos os lotes, especialmente durante o primeiro mês (amostras “1M”) e no Lote B. Decorrido este tempo de armazenamento, o chouriço de carne deste mesmo lote aumentou em cerca de 180 mg/kg nas amostras “Controlo” e 240 mg/kg nas que continham aroma de fumo líquido. Em contrapartida, em igual intervalo de tempo, o teor em AB no Lote A somou mais cerca de 160 mg/kg, nas amostras “Controlo” e de 50 mg/kg nas “AFL”. Em consequência do seu aumento continuado, os teores de aminos após 3 meses de armazenamento corresponderam a 329,62 e 281,53 mg/kg, nas amostras “Controlo\_3M” e “AFL\_3M” do Lote A, enquanto as homólogas do Lote B ascenderam a 982,30 e 691,84 mg/kg (pela mesma ordem amostras “Controlo\_3M” e “AFL\_3M”, respectivamente).



**Figura 49.** Teor total de aminas biogénicas encontrado no chouriço de carne em função da tecnologia de processamento e tempo (resultados expressos em matéria seca). Barras de erro representam o desvio-padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas (Teste HSD,  $p = 0,05$ ). MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.



**Figura 50.** Efeito dos factores principais e respectivas interações de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores de aminas biogénicas determinadas no chouriço de carne (resultados expressos em matéria seca).

Barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (i) Lote, (ii) Processamento, (iii) Tempo, (iv) Lote x Processamento, (v) Lote x Tempo e (vi) Processamento x Tempo (vi).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo a triptamina e histamina estiveram ausentes em qualquer das amostras analisadas. Individualmente, as aminas de origem exógena como a putrescina, cadaverina e tiramina, foram aquelas cuja evolução se mostrou ser mais dependente dos factores em estudo. Os resultados permitiram igualmente identificar alterações de relevo no perfil das AB determinadas. Numa fase inicial foi evidenciada uma clara prevalência das aminas endógenas, espermina e espermidina (Tabela 29), tendo esta progressivamente diminuído com a sobreposição das aminas de origem bacteriana (entre as quais a tiramina e putrescina) que passaram a ser as mais abundantes. Por outro lado, os níveis desta amina encontrados inicialmente nos produtos do Lote A (86,56 mg/kg) sofreram uma diminuição ( $p < 0,05$ ) durante a secagem para teores médios de 71,60 e 55,09 mg/kg (amostras “Controlo” e “AFL”, respectivamente), permanecendo posteriormente inalterados. Verificou-se igualmente a tendência de decréscimo da espermina nas amostras do Lote B com aroma de fumo que, embora de uma forma mais ligeira, não se restringiu apenas ao período de secagem, tendo-se prolongado até final do armazenamento, momento em que se registou o teor mínimo de 63,21 mg/kg. Para os produtos “Controlo” deste lote, à excepção de ligeiras oscilações, os teores de espermina mantiveram-se constantes durante o processamento e armazenamento, tendo apresentado teores médios entre 66,38 e 78,68 mg/kg (amostras “3M” e “MP”, respectivamente). Com excepção dos produtos “Controlo\_MP” do Lote B, a espermidina esteve também presente em todas as massas de carne gordura processadas com teores médios iniciais que variaram entre 0,26 e 1,23 mg/kg (“AFL” do Lote B e Lote A). A sua evolução ao longo deste ensaio caracterizou-se por um aumento no seu teor, sem que tenha sido possível identificar um momento concreto e transversal para todos os produtos, para essa transição. Ainda relativamente à espermidina salientam-se os teores idênticos entre as amostras de chouriço de carne “AFL” e “Controlo”, independentemente do lote considerado, com níveis médios de 4,32 a 7,47 mg/kg (Lote A). Globalmente, estes valores mantiveram-se inalterados durante o armazenamento do chouriço de carne do Lote A. Nos produtos do outro lote, após 90 dias armazenamento, o teor em espermidina atingiu níveis máximos de 22,44 mg/kg nas amostras “Controlo\_3M” e 20,32 mg/kg nas homólogas “AFL\_3M”.

Com o processamento tecnológico as aminas exógenas demarcaram-se gradualmente, acabando por suplantarem os teores de espermina e espermidina. Face à evolução registada nas aminas exógenas (em particular a tiramina, a putrescina e a cadaverina), verifica-se, que a sua importância relativa aumentou de forma mais acentuada no segundo lote de chouriço de carne produzido (Lote B). Enquanto nas amostras “PF” do Lote A (tanto para o grupo designado “Controlo”, como para o “AFL”) a espermina continuou a ser a amina mais abundante, já no Lote B a tiramina sobrepôs-se, equivalendo a praticamente metade do teor total de AB detectado. Apesar da tiramina se encontrar ausente imediatamente antes do enchimento (amostras “MP”), os níveis encontrados rapidamente aumentaram ao longo do processamento, com teores médios no produto final do Lote B a ascenderem a 285,86 e 124,82 mg/kg (amostras “Controlo” e “AFL”, respectivamente, Tabela 29). Para os restantes pontos de análise, já durante o armazenamento,

a concentração desta amina nos produtos “Controlo” permaneceu inalterada, após 3 meses, um nível médio de 309,15 mg/kg. Em contrapartida, para os produtos aos quais se adicionou aroma de fumo a tiramina apresentou uma tendência crescente ( $p < 0,05$ ), que se manteve até ao final do armazenamento (onde se registaram níveis de 246,28 mg/kg). Analogamente, distinguiu-se uma tendência crescente também no Lote A, muito embora menos acentuada. No final do processamento, foram detectados 32,74 mg/kg de tiramina no chouriço de carne fumado (amostras “Controlo\_PF”), teor que aumentou posteriormente até 180,70 mg/kg (amostras “3M”) enquanto nas amostras “AFL” estes teores oscilaram entre 29,77 mg/kg (amostras “PF”) e 138,70 mg/kg (amostras “3M”).

Tal como sucedeu para a tiramina, a putrescina e a cadaverina estiveram ambas, de uma forma geral, ausentes na massa condimentada (amostras “MP”). Na verdade, apenas nos produtos do Lote B, em particular aqueles que continham na sua formulação condensado de fumo, se detectou a presença de cadaverina, ainda assim em níveis reduzidos (1,47 mg/kg). A acumulação de cadaverina, em resultado da descarboxilação da lisina, foi particularmente elevada ( $p < 0,05$ ) no chouriço de carne do Lote B seco em fumeiro cujos teores médios ascenderam a 126,72 mg/kg, representando um nível de contaminação entre 7 a 20 vezes superior à dos restantes produtos. Pelo contrário, nas amostras “Controlo” do Lote A registaram-se apenas 6,28 mg/kg de cadaverina e 15,99 mg/kg nas amostras “AFL”. A ordem de grandeza verificada para este último, foi semelhante para o chouriço de carne “AFL\_PF” do Lote B que apresentou 21,83 mg/kg de cadaverina. Os maiores teores de cadaverina registaram-se durante o período de armazenamento, no final do primeiro mês no caso das amostras de chouriço de carne fumado (23,40 e 167,75 mg/kg, Lotes A e B, respectivamente) e ao fim de três meses para as homólogas produzidas em câmara (33,53 e 56,52 mg/kg, Lotes A e B, respectivamente).

Através da análise dos resultados da putrescina tornou-se óbvia a divergência ( $p < 0,05$ ) dos níveis de contaminação em função do lote de fabrico. Uma vez mais, o produto final (amostras “PF”) do Lote B destacou-se com os níveis de contaminação mais elevados. Em média foram detectados 131,30 mg/kg no chouriço de carne “Controlo” e 48,17 mg/kg para “AFL”. Por oposição, no Lote A a concentração desta amina ascendeu a máximos de 9,65 mg/kg (“Controlo”) e 8,66 mg/kg (“AFL”). Em qualquer dos lotes, os valores verificados nesta fase aumentaram entre 2 a 5 vezes logo após o primeiro mês de armazenamento, tendência que de um modo geral se manteve até ao final dos 3 meses. Decorrido este período sobre o momento da embalagem do chouriço de carne os teores de putrescina variaram entre 50,46 e 52,39 mg/kg (“Controlo” e “AFL”, respectivamente do Lote A), enquanto no Lote B oscilou entre 418,84 e 305,51 mg/kg (quantificados nas amostras de produtos fumados e contendo “AFL”, pela mesma ordem).

**Tabela 29.** Teores individuais das aminas biogénicas (resultados expressos em mg/kg em matéria seca, sob a forma média  $\pm$  DP) determinados no chouriço de carne.

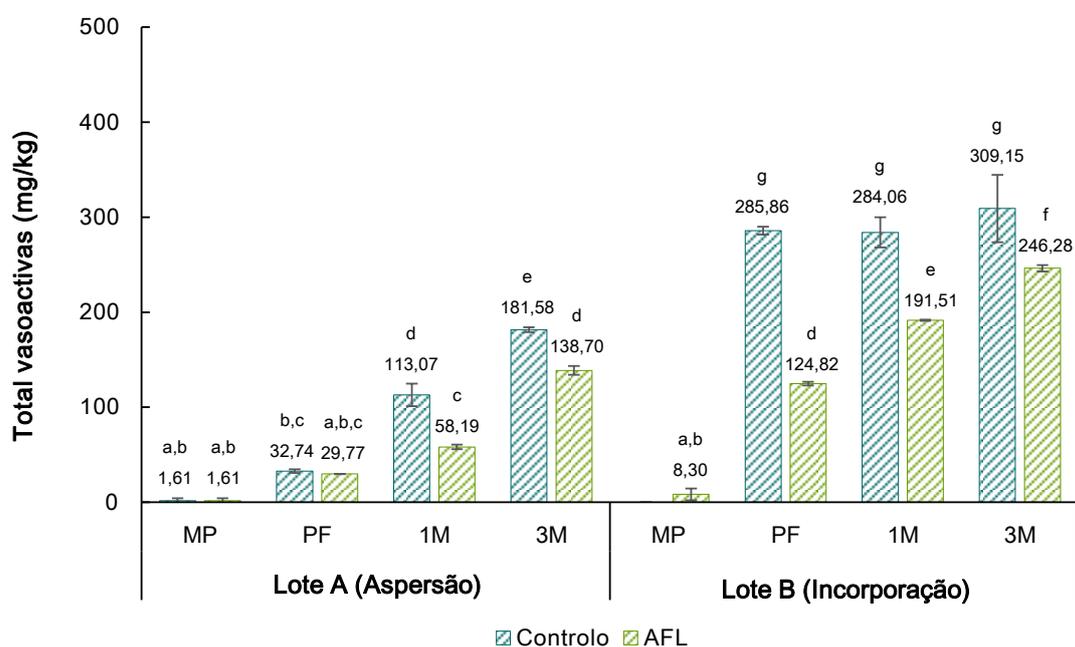
	Lote A (Aspersão)								Lote B (Incorporação)							
	Controlo				AFL				Controlo				AFL			
	MP	PF	1M	3M	MP	PF	1M	3M	MP	PF	1M	3M	MP	PF	1M	3M
<i><math>\beta</math>-Feniletilamina</i>	1,61 <sup>a</sup> $\pm$ 2,79	ND	ND	0,88 <sup>a</sup> $\pm$ 0,95	1,61 <sup>a</sup> $\pm$ 2,79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8,30 <sup>b</sup> $\pm$ 6,20	ND	ND	ND
<i>Putrescina</i>	ND	9,65 <sup>a,b</sup> $\pm$ 1,29	53,11 <sup>c</sup> $\pm$ 5,98	50,46 <sup>c</sup> $\pm$ 0,79	ND	8,66 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,33	21,86 <sup>b</sup> $\pm$ 7,39	52,39 <sup>c</sup> $\pm$ 3,03	ND	131,30 <sup>d</sup> $\pm$ 3,99	262,61 <sup>f</sup> $\pm$ 1,90	418,84 <sup>h</sup> $\pm$ 17,00	ND	48,17 <sup>c</sup> $\pm$ 5,31	198,58 <sup>e</sup> $\pm$ 8,26	305,51 <sup>g</sup> $\pm$ 9,86
<i>Cadaverina</i>	ND	6,28 <sup>a,b</sup> $\pm$ 1,17	23,40 <sup>c,d</sup> $\pm$ 3,21	20,91 <sup>c</sup> $\pm$ 1,47	ND	15,99 <sup>b,c</sup> $\pm$ 0,01	23,17 <sup>c,d</sup> $\pm$ 1,86	33,53 <sup>d</sup> $\pm$ 0,34	ND	126,72 <sup>f</sup> $\pm$ 3,94	167,75 <sup>g</sup> $\pm$ 10,66	165,49 <sup>g</sup> $\pm$ 6,18	1,47 <sup>a</sup> $\pm$ 2,34	21,83 <sup>c</sup> $\pm$ 1,45	47,06 <sup>e</sup> $\pm$ 4,85	56,52 <sup>e</sup> $\pm$ 1,84
<i>Tiramina</i>	ND	32,74 <sup>b</sup> $\pm$ 1,97	113,07 <sup>c</sup> $\pm$ 11,81	180,70 <sup>d</sup> $\pm$ 1,94	ND	29,77 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,04	58,19 <sup>b</sup> $\pm$ 2,39	138,70 <sup>c</sup> $\pm$ 4,64	ND	285,86 <sup>f</sup> $\pm$ 4,14	284,06 <sup>f</sup> $\pm$ 16,01	309,15 <sup>f</sup> $\pm$ 35,41	ND	124,82 <sup>c</sup> $\pm$ 1,80	191,51 <sup>d</sup> $\pm$ 0,73	246,28 <sup>e</sup> $\pm$ 3,32
<i>Espermidina</i>	1,23 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,88	7,47 <sup>c</sup> $\pm$ 0,98	6,93 <sup>c</sup> $\pm$ 1,74	9,66 <sup>c</sup> $\pm$ 0,80	1,23 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,88	4,32 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 0,19	8,12 <sup>c</sup> $\pm$ 1,52	5,57 <sup>b,c</sup> $\pm$ 0,31	ND	5,10 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 0,38	20,85 <sup>d</sup> $\pm$ 3,10	22,44 <sup>d</sup> $\pm$ 3,67	0,26 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,45	6,71 <sup>c</sup> $\pm$ 2,06	18,13 <sup>d</sup> $\pm$ 3,89	20,32 <sup>d</sup> $\pm$ 0,66
<i>Espermina</i>	86,56 <sup>f</sup> $\pm$ 8,54	71,60 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 2,74	68,05 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 6,33	67,02 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 2,04	86,56 <sup>f</sup> $\pm$ 8,54	55,09 <sup>a,b</sup> $\pm$ 2,25	55,77 <sup>a,b</sup> $\pm$ 2,15	51,34 <sup>a</sup> $\pm$ 1,43	78,68 <sup>d,e,f</sup> $\pm$ 3,43	72,73 <sup>c,d,e,f</sup> $\pm$ 2,46	63,76 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 4,49	66,38 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 3,00	83,93 <sup>e,f</sup> $\pm$ 9,87	77,79 <sup>c,d,e,f</sup> $\pm$ 1,85	66,42 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 3,00	63,21 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 2,36

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – Não detectado.

MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.

Ainda relativamente às aminas de origem bacteriana, a  $\beta$ -feniletilamina foi detectada apenas em algumas amostras de forma esporádica e, sempre em pequenas quantidades, sem exceder os 10 mg/kg (Tabela 29).

O somatório das concentrações individuais da triptamina,  $\beta$ -feniletilamina, histamina e tiramina, habitualmente designado como o grupo das aminas vasoactivas, foi igualmente estimado. Considerando que, de entre estas, apenas a  $\beta$ -feniletilamina e a tiramina foram detectadas e que a primeira surgiu apenas de forma pontual e em concentrações residuais, o teor em aminas vasoactivas que consta da Figura 51 é devida, quase exclusivamente, aos níveis de tiramina já referidos.



**Figura 51.** Teor total de aminas vasoactivas encontrado no chouriço de carne em função da tecnologia de processamento e tempo (resultados expressos em mg/kg em matéria seca). Barras de erro representam o desvio-padrão). Letras diferentes representam diferenças significativas (Teste HSD,  $p = 0,05$ ). MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.

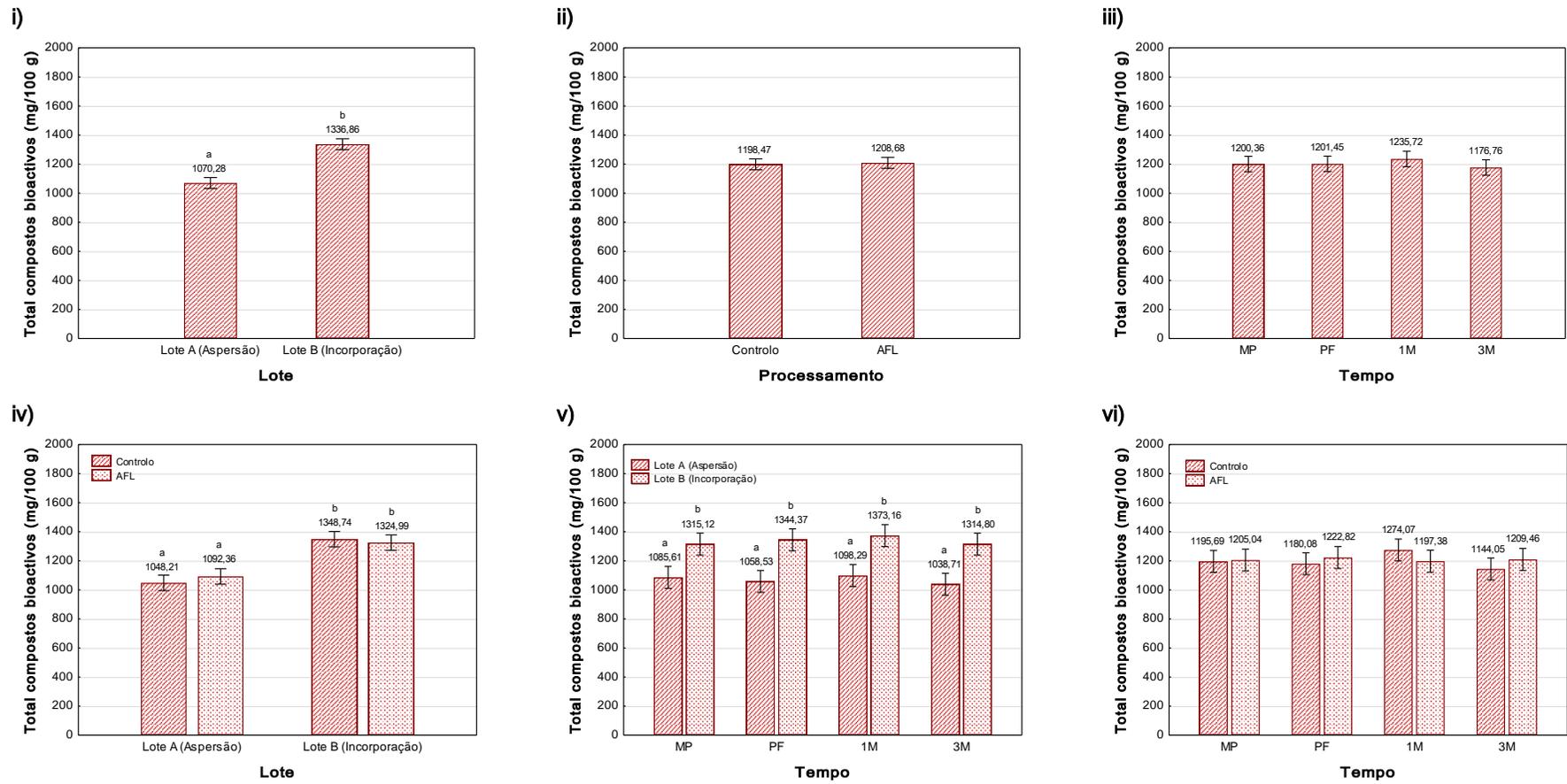
#### 6.3.4. Perfil de compostos bioactivos: carnosina, anserina e creatina

Os teores em carnosina, anserina e creatina habitualmente encontrados nos produtos cárneos resultam principalmente da composição da carne usada como matéria-prima, pelo que a contribuição da actividade proteolítica para a sua formação poderá ser considerada mínima. Apesar dos benefícios associados a estes compostos, são ainda escassos os resultados relativos a estas moléculas com actividade bioactiva no âmbito dos produtos de salsicharia a nível nacional, facto que motivou o interesse na sua avaliação nos produtos de salsicharia estudados,

bem como no impacto de diferentes opções tecnológicas (processamento) e a sua evolução durante o tempo de armazenamento.

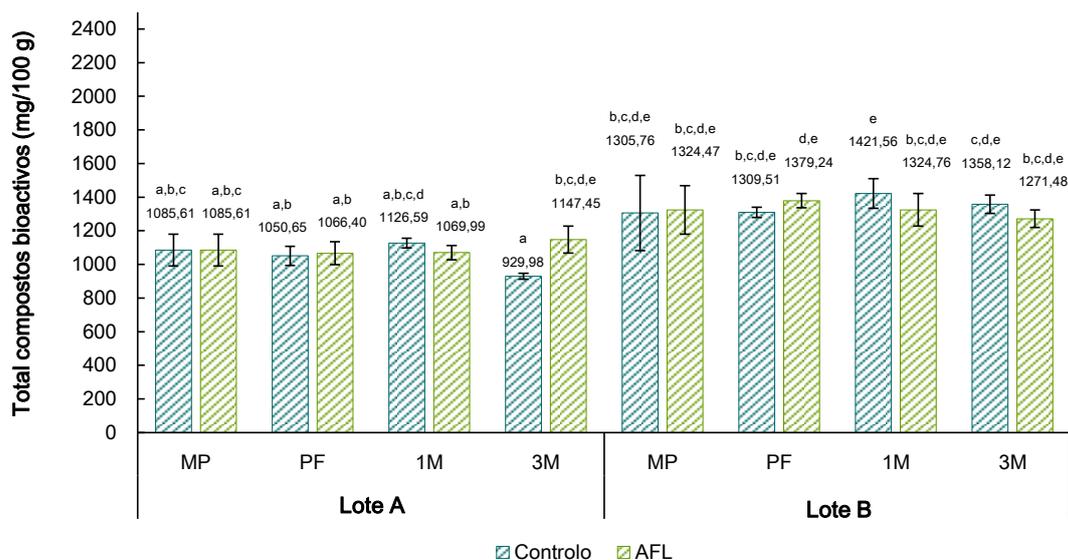
Em termos gerais, os resultados obtidos não permitem identificar uma tendência clara decorrente dos factores em estudo e, em particular, da utilização de diferentes tecnologias de processamento. Apesar disto, o lote de fabrico ou, por outras palavras, a utilização de diferentes matérias-primas, esteve na origem das maiores variações verificadas para os 3 compostos bioactivos considerados (cf. Figura 52 e Tabela A.17 do Apêndice). A representação gráfica da evolução do teor total de compostos bioactivos, ilustrada pela Figura 53, permite desde logo verificar que as maiores diferenças identificadas se devem maioritariamente à composição inicial da carne utilizada para a produção do chouriço de carne. Os produtos do Lote A, independentemente do processamento seguido, apresentaram teores comparativamente inferiores aos quantificados no Lote B. À parte deste facto, o progresso registado foi bastante semelhante entre ambos os lotes de fabrico em particular porque, quer num quer noutro, não se observaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) decorrentes quer do processamento quer do armazenamento.

Na massa condimentada (“MP”), tal como demonstra a Figura 53, os teores totais médios em compostos bioactivos variaram em média entre 1085,61 mg/100 g (Lote A) e 1315,12 mg/100 g (Lote B). Uma vez terminada a etapa de fermentação e secagem, os níveis registados no Lote A foram de 1050,65 e 1066,40 mg/100 g (“Controlo” e “AFL”, respectivamente), enquanto no Lote B corresponderam a 1309,51 e 1379,24 mg/100 g (“Controlo” e “AFL”, respectivamente). Similarmente, em cada um dos lotes, não surgiram diferenças devidas à tecnologia seguida.



**Figura 52.** Efeito dos factores principais e respectivas interações de primeira ordem considerados na análise de variância dos teores dos compostos bioactivos determinados no chouriço de carne (resultados expressos em mg/100 g em matéria seca).

Barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes correspondem a valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (i) Lote, (ii) Processamento, (iii) Tempo, (iv) Lote x Processamento, (v) Lote x Tempo e (vi) Processamento x Tempo (vi).



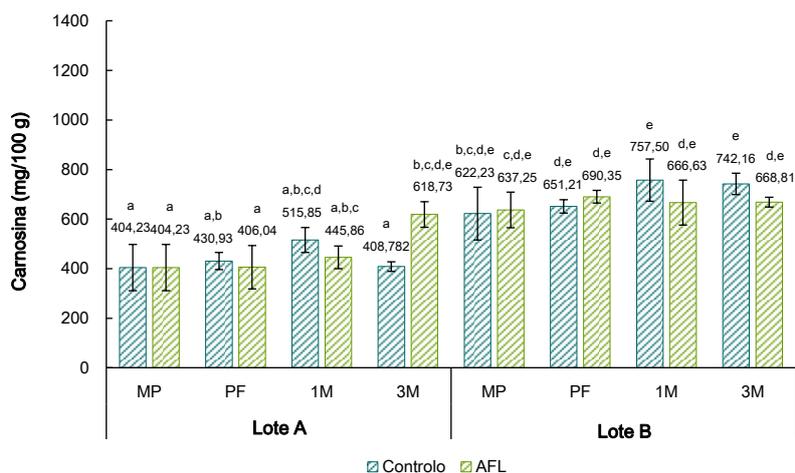
**Figura 53.** Teor total de compostos bioactivos encontrados no chouriço de carne em função da tecnologia de processamento e tempo de armazenamento (resultados expressos em mg/100 g em matéria seca). Barras de erro representam o desvio-padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas (Teste HSD,  $p = 0,05$ ).

MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.

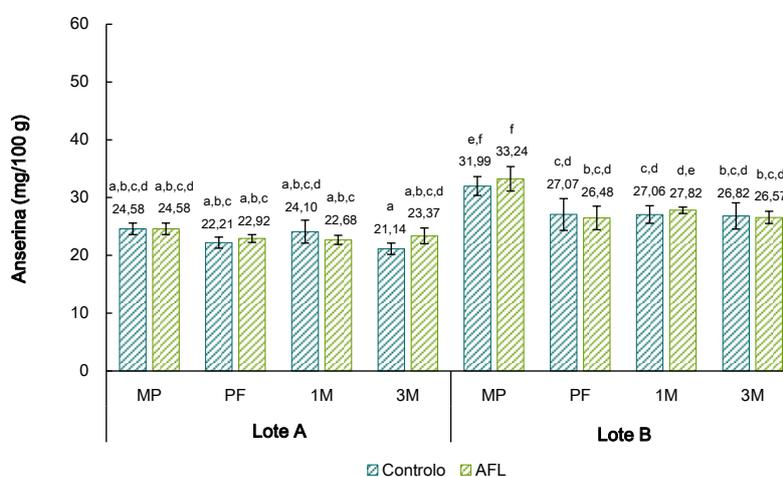
Os níveis totais de compostos com actividade biológica resultaram quase exclusivamente dos teores de creatina e carnosina, uma vez que a anserina foi encontrada em níveis proporcionalmente inferiores. No caso da creatina, ao contrário dos dipéptidos carnosina e anserina, não se registaram variações devidas à composição da matéria-prima (Figura 54). Em média, os teores deste composto na formulação do chouriço de carne (“MP”) foram ligeiramente superiores a 650 mg/100 g (656,80 mg/100 g no Lote A e 651,54 e 653,98 mg/100 g nas amostras “Controlo” e “AFL”, respectivamente). Decorrente do processamento e após o primeiro mês de armazenamento, os níveis de creatina permaneceram inalterados. Todavia, considerando todo o período em análise e por comparação entre os teores de creatina quantificados nas amostras de massa de chouriço de carne (amostras “MP”) e nas amostras “3M” observa-se um decréscimo ( $p < 0,05$ ) nos produtos do Lote A na ordem de 150 mg/100 g. No final do armazenamento os teores de creatina nos enchidos deste lote foram de 500,06 mg/100 g (amostras “Controlo”) e 505,35 mg/100 g (amostras “AFL”). Para a carnosina, a principal diferença ficou a dever-se à utilização de diferentes lotes de carne, que logo de início apresentavam composições díspares deste dipéptido (em mais de 200 mg/100 g, Figura 54), facto que se reflectiu nas amostras “MP”, mas também nas “PF”, “1M” e “3M”. Na formulação “Controlo” e “AFL” do Lote B foram detectados, respectivamente, 622,23 e 637,25 mg/100 g, enquanto nas amostras homólogas no Lote A este não excedeu os 404,23 mg/100 g. Genericamente as concentrações encontradas mantiveram-se inalteradas durante o processamento e armazenamento. A este respeito importa assinalar a excepção verificada nas amostras de chouriço de carne do Lote A nas quais se procedeu à aspersão com aroma de fumo

líquido, que após três meses de armazenamento registou um aumento, ainda que ligeiro, do teor em carnosina para os níveis equiparáveis aos registados no Lote B. De resto, tal como é demonstrado pela Figura 54, além das variações entre lotes de produção, não se registaram diferenças nos níveis de carnosina decorrentes da tecnologia de processamento. A análise da anserina demonstrou uma tendência semelhante nos dois lotes processados, em que as maiores diferenças foram registadas entre enchidos resultantes de diferentes lotes (Lotes A e B) e não entre tipos de produtos (amostras “Controlo” e “AFL”). As duas massas de chouriço de carne utilizadas apresentaram em média 24,58 mg/100 g no Lote A e 32,62 mg/100 g no Lote B. De um modo geral, apenas se observaram ligeiras oscilações destas concentrações, independentemente da fase considerada. De salientar a acentuada redução do teor em anserina verificado no produto após a secagem (amostras “PF”) no Lote B, relativamente às amostras “MP” ( $p < 0,05$ ).

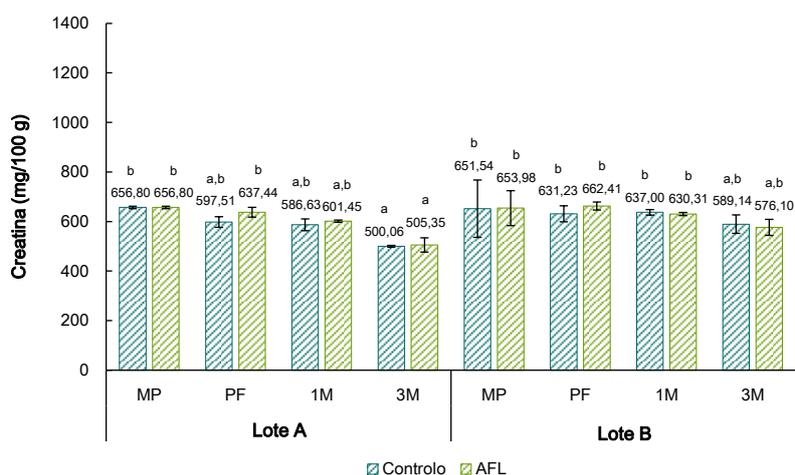
i)



ii)



iii)



**Figura 54.** Evolução do teor em carnosina (i), anserina (ii) e creatina (iii) (resultados expressos em mg/100 g em matéria seca).

Barras de erro representam o desvio-padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas (Teste HSD,  $p = 0,05$ ).

MP: massa condimentada, PF: produto final, 1M e 3M: enchidos após 1 e 3 meses de armazenamento, respectivamente.

## 6.4. DISCUSSÃO

O recurso a condensados de fumo, associados à secagem em câmara, integra algumas vantagens que justificam a sua crescente utilização por parte das indústrias cárneas. De referir, por exemplo, a maior homogeneidade entre lotes de produção, maior controlo sobre o crescimento microbiano e sobre o processo fermentativo (Simon *et al.*, 2010). Por outro lado, no que respeita à contaminação com PAH, os condensados de fumo constituem uma alternativa bastante conveniente para minimizar este risco químico. Neste contexto, foram avaliados diversos parâmetros relacionados com a segurança e qualidade organoléptica do chouriço de carne em função da tecnologia de processamento adoptada, mais concretamente parâmetros físico-químicos, perfil de aminoácidos livres, AB e compostos bioactivos. Um dos aspectos mais importantes que distingue esta tecnologia da secagem em fumeiro diz respeito às diferenças de temperaturas experimentadas pelos produtos. Seria, por isso expectável que fossem notadas diferenças nos parâmetros referidos, entre os enchidos fumados e os homólogos processados em câmara, em consequência de os primeiros serem submetidos a temperaturas necessariamente mais elevadas. Adicionalmente, a utilização de diferentes lotes de carne permitiu simultaneamente aferir acerca da influência das características da matéria-prima nos vários factores avaliados.

No que ao pH diz respeito, as principais diferenças encontradas relacionaram-se com o factor “Tempo”, sendo que a maior variação ocorreu na etapa correspondente ao processamento dos enchidos. O decréscimo verificado nesta fase reflecte o aumento, que ocorre normalmente nesta fase, das bactérias do ácido láctico (BAL) e que, dado o seu rápido desenvolvimento, libertam ácidos orgânicos, entre os quais o ácido láctico, que é tipicamente um dos compostos responsáveis pelo decréscimo do pH nos produtos cárneos fermentados. Comparativamente aos produtos “Controlo”, o chouriço de carne processado com aroma de fumo líquido apresentou uma redução menos acentuada, sendo este efeito particularmente evidente nos produtos do Lote B. Não se tendo verificado diferenças nos níveis de ABVT, que pudesse indiciar a libertação de compostos azotados como a amónia, estes resultados parecem a indicar que a adição do condensado de fumo tem um efeito idêntico ao que se atribui à adição de sal. Por outras palavras, a utilização deste ingrediente directamente na formulação poderá ter favorecido uma maior extracção das proteínas que são responsáveis por um efeito tampão (Laranjo *et al.*, 2015).

À luz dos conhecimentos actuais, as práticas tecnológicas como a temperatura, período de fermentação, condições de secagem, fumagem e a extensão do processamento são factores igualmente apontados como decisivos para a explicação de alterações específicas ao nível do teor e perfil de AA que variam consideravelmente entre estudos (Beriain *et al.*, 2000). Uma vez na sua forma livre, os aminoácidos podem seguir diversos mecanismos de degradação por meios de desaminação, descarboxilação, entre outras (Toldrá, 2006a). Em termos práticos, uma forma de avaliar as consequências dos diferentes factores sobre a extensão da actividade proteolítica

consiste na quantificação das fracções azotadas presentes nas amostras na medida em que durante a evolução da maturação dos enchidos, o azoto de origem não proteica aumenta progressivamente em resultado desta actividade proteolítica. A fracção de ANP engloba o teor de azoto respeitante aos polipéptidos, péptidos, assim como do AAL e do ABVT.

A degradação da miosina e actina da carne, que ocorre nas fases iniciais, é protagonizada por enzimas endógenas, tais como as catepsinas e as calpaínas, muito embora se reconheça que as proteases microbianas podem também intervir nesta fase (Bover-Cid *et al.*, 2006; Toldrá, 2006a; Mora *et al.*, 2009). Os fragmentos de proteína entretanto gerados pelas catepsinas e calpaínas têm, por sua vez, uma forte influência enquanto substratos para a acção das aminopeptidases e posterior libertação de aminoácidos (Toldrá *et al.*, 2000). Como refere Ordoñez *et al.* (1999), as peptidases e aminopeptidases intervêm já numa fase mais avançada da fermentação, tendo como principal efeito a libertação de péptidos de pequenas dimensões e aminoácidos. Consequentemente, tal como se verifica pelos resultados apresentados, a influência do tempo nas fracções azotadas traduz-se na crescente degradação proteica e peptídica. A comprová-lo está o aumento das fracções ANP e AAL que decorrem da libertação de quantidades assinaláveis de pequenos péptidos e aminoácidos, no seu estado livre, ao longo da produção. A acumulação de aminoácidos estendeu-se durante o período correspondente ao armazenamento, embora esta tenha sofrido um forte abrandamento que se ficou a dever, essencialmente, à convergência de dois factores fundamentais enumerados por Toldrá *et al.* (2000): a libertação de aminoácidos livres que produz um efeito de “feedback” e contribui para a inibição das aminopeptidases, afectando negativamente a sua actividade enzimática e, por outro lado, as reacções de degradação dos aminoácidos, nomeadamente em compostos voláteis. De acordo com a literatura, a catepsina D constitui um dos agentes mais directamente envolvidos na fragmentação das proteínas (Molly *et al.*, 1997; Durá *et al.*, 2004b), sendo a sua actividade inibida a valores de pH básicos (Roseiro *et al.*, 2010). Neste sentido, seria expectável o aparecimento de maiores quantidades de péptidos e aminoácidos nas massas onde se registaram níveis de pH inferiores, facto que acabou por se confirmar. Com base no tratamento estatístico efectuado verificou-se uma importante correlação negativa (cf. Tabela A.18 do Apêndice) entre o pH e os níveis de ANP ( $r = -0,44$ ,  $p < 0,01$ ). A este respeito importa ainda salientar algumas flutuações da fracção ANP que se observaram tanto durante a fase de produção, bem como durante o armazenamento. Uma tendência similar havia já sido reportada por Roseiro *et al.* (2008), tendo os autores atribuídos essas variações a oscilações relacionadas com a cadeia proteolítica, onde as proteínas são sequencialmente degradadas a polipéptidos, péptidos e posteriormente aos seus constituintes fundamentais, os aminoácidos. Tal como refere Toldrá (2006a), as aminopeptidases apresentam também maior actividade enzimática a pH ácido, facto também confirmado pela correlação negativa (Tabela A.18 do Apêndice) entre a fracção AAL e o pH ( $r = -0,88$ ,  $p < 0,01$ ).

Tal como seria expectável, a fracção ABVT correlacionou-se positivamente com as fracções AAL e ANP (respectivamente,  $r = 0,89$  e  $r = 0,75$ ,  $p < 0,01$ ; cf. Tabela A.18 do Apêndice). As

diferenças entretanto identificadas para os níveis de ANP e AAL são transversais a ambos os lotes, não obstante de se evidenciarem em fases distintas. No caso do Lote B as diferenças entre as amostras “Controlo” e “AFL” surgiram logo no final do processamento (“PF”), enquanto no Lote A estas só se evidenciaram após um período de armazenamento de 3 meses. A tecnologia utilizada para a incorporação do aroma de fumo líquido terá sido o elemento diferenciador, já que as menores reduções de pH foram registadas precisamente nos produtos em que se adicionou o condensado directamente na formulação da massa, afectando desta forma a intensidade da proteólise.

De entre os três factores considerados, o efeito do tempo foi o que mais influenciou o teor de aminoácidos. Muito embora se tenham identificado diferenças pontuais, para o teor de aminoácidos, entre os resultados das amostras “Controlo” e “AFL” registados pelo método clássico e que não foram corroboradas pela análise cromatográfica, em termos gerais os resultados obtidos por estas duas técnicas analíticas denotaram uma forte consistência. As diferenças encontradas procedem exclusivamente do desvio-padrão determinado para cada um dos métodos, cujos valores se revelaram compreensivelmente superiores para a análise realizada segundo o método cromatográfico (ao contrário do que sucede para o método clássico, o desvio-padrão do teor total de AA depende necessariamente do erro associado à determinação de cada um dos 19 AA). Independentemente deste facto, a correlação de Pearson ( $r = 0,94$ ,  $p < 0,001$ ) verificada entre o teor do azoto dos aminoácidos livres e o teor total de AA, é indicativa da elevada consistência entre estes dois métodos analíticos.

A derivatização com a OPA, pela sua conveniência, encontra-se entre os métodos mais utilizados para a determinação dos aminoácidos nos produtos cárneos (Alfaia, 2004; Koros *et al.*, 2007; Virgili *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2014). Apesar disso, este agente de derivatização tem o inconveniente de reagir apenas com aminoácidos primários, inviabilizando a quantificação da prolina, cistina e cisteína (aminoácidos secundários) por este método (Dai *et al.*, 2014). Do conjunto de 19 aminoácidos analisados, a alanina, foi geralmente o aminoácido encontrado em maiores quantidades, mesmo apesar dos seus níveis terem permanecido praticamente constantes, quer durante o processamento, quer na fase de armazenamento. Segundo Toldrá (2006b) a redução da  $a_w$ , contribui para a inibição das enzimas envolvidas na libertação da alanina, as alanilaminopeptidase. Em contrapartida, a actividade das arginilaminopeptidase é favorecida com a diminuição da  $a_w$  (Toldrá, 2006b), com a concomitante acumulação da arginina cujo teor duplicou comparativamente às concentrações inicialmente detectadas. Na verdade, a evolução do teor total de aminoácidos relacionou-se em grande medida com a libertação da arginina, mas também de outros aminoácidos presentes inicialmente em menores quantidades como é o caso da leucina, ornitina e lisina. Estes mesmos quatro aminoácidos encontraram-se entre os que mais aumentaram também nos estudos desenvolvidos por Bermúdez *et al.* (2014) e Toldrá *et al.* (2000). De acordo com Toldrá *et al.* (2000), a acumulação de lisina, deve-se à actividade exopeptídica de duas enzimas em particular: a alanilaminopeptidase (com elevada especificidade para a libertação de resíduos de alanina e lisina) e a arginilaminopeptidase

(responsável pela produção de resíduos de arginina e lisina). Compreensivelmente, os níveis destas enzimas desempenham um papel crucial na evolução do perfil de aminoácidos ao longo do tempo, como refere Toldrá (2006b). Este parece ter sido o caso do chouriço de carne produzido para esta investigação, como atestam os aumentos verificados para a arginina e lisina, que parecem indicar maior actividade por parte das arginilaminopeptidase. A formação da ornitina, por seu turno, pode ocorrer através de dois mecanismos distintos: ciclo da ureia (que decorre principalmente nas células do fígado onde aminoácidos como a glutamina e arginina podem ser convertidos a ornitina) ou através do catabolismo da arginina pela arginina desaminase (também conhecida por ADI), com a libertação de amónia (Virgili *et al.*, 2007). Neste caso particular, o aumento verificado durante o processamento do chouriço de carne dever-se-á exclusivamente à segunda via metabólica, sendo esta hipótese confirmada pela correlação positiva que se verificou a arginina e a ornitina ( $r = 0,58$ ,  $p < 0,05$ ; Tabela A.19 do Apêndice). Acresce ainda que no Lote A o teor em ornitina aumentou proporcionalmente ao da arginina, facto que é igualmente sustentado pelo rácio entre estes dois aminoácidos (arginina/ornitina). Ao longo quer do processamento, quer do armazenamento, este rácio apresentou-se bastante regular, tendo variado em média entre 2,49 e 2,21 (nas amostras “Controlo” e “AFL”, respectivamente). Um cenário diferente foi encontrado nas amostras armazenadas do Lote B, que se ficou a dever à diminuição da ornitina durante o armazenamento. A evolução de glutamina contrariou a tendência crescente geralmente constatada para a maioria dos aminoácidos em estudo, tendo diminuído de forma consistente ao longo do tempo, à semelhança das observações de Toldrá *et al.* (2000). Segundo Martuscelli *et al.* (2009) a diminuição dos aminoácidos na sua forma livre pode emergir devido à sua participação em reacções químicas e enzimáticas onde intervêm como substrato. Assim, no nosso entender, o decréscimo da concentração de glutamina poderá estar relacionado com a desaminação da glutamina com formação de glutamato e amónia. Esta reacção é catalisada por uma enzima de origem microbiana encontrada, nomeadamente em leveduras *Debaryomyces* frequentemente presente na superfície dos enchidos e designada por glutaminase (Durá *et al.*, 2004a). Esta é uma transformação desejável na medida em que o glutamato contribui de forma apreciável para o desenvolvimento do sabor no chouriço de carne. O período de maior actividade da glutaminase concentra-se principalmente durante a fase de fermentação, onde as condições são mais favoráveis (por exemplo, pH menos ácido), sendo progressivamente inactivada ao longo do tempo (Durá *et al.*, 2004a). Na verdade, a maior diminuição no menor espaço de tempo coincidiu precisamente com o período correspondente à secagem do chouriço de carne, quando o pH é mais elevado.

A formação e acumulação de AB dependem de uma complexa interacção de factores, o que torna impossível a previsão dos seus níveis de contaminação com base, única e exclusivamente nas condições tecnológicas a que decorre o processamento. Com base no delineamento experimental seguido nesta investigação, a utilização de diferentes lotes de matérias-primas, os processos de secagem distintos e o tempo compreendem os principais factores de variação. A qualidade microbiológica das matérias-primas processadas na indústria é, desde logo, referida

pela maior parte dos autores como crucial no que se refere à actividade aminogénica (Kalač, 2006; Naila *et al.*, 2010; Latorre-Moratalla *et al.*, 2014). Se atendermos ao facto de que o músculo é estéril, é compreensível que a microbiota presente na carne e nos produtos cárneos, nomeadamente no que respeita aos microrganismos mesófilos aeróbios e das enterobactérias (Martins e Germano, 2008), seja considerada como sendo um bom indicador da qualidade e frescura das matérias-primas, mas também das condições higio-sanitárias em que decorre o processamento. Um raciocínio similar é aplicável às AB, em virtude de estas surgirem em consequência do crescimento microbiano estabelecido nos produtos. Além disso, Flores *et al.* (1997) relembra que a matéria-prima de diferentes origens pode apresentar diferentes padrões de enzimas proteolíticas e, desta forma, afectar consideravelmente o perfil dos aminoácidos libertados e que poderão mais tarde sofrer descarboxilação. De facto, os resultados relativos às AB recolhidos ao longo desta investigação pautaram-se por grandes diferenças em função do lote de produção, visíveis logo nos estágios iniciais, tanto nas massas do chouriço de carne como no produto acabado, diferenças essas que acabaram por se acentuar ao longo do período de armazenamento. Das massas de chouriço de carne testadas em três delas foram detectadas aminas de origem bacteriana. A  $\beta$ -feniletilamina, por exemplo, só não foi detectada nas amostras “Controlo\_MP” do Lote B. A cadaverina, por sua vez, foi identificada na massa do Lote B à qual se adicionou condensado de fumo líquido (“AFL”). Mesmo em quantidades que podem ser consideradas reduzidas, a presença destas aminas na massa do chouriço de carne indicia desde logo a presença de bactérias com capacidade descarboxilativa, que podem estar na origem da acumulação de quantidades importantes de aminas exógenas nas fases mais tardias, como aliás se veio a confirmar, com especial incidência nos enchidos do Lote B. Na verdade, pelo facto do ABVT estar frequentemente relacionado ao desenvolvimento microbiano, a detecção de maiores níveis deste indicador contribuem para consolidar esta conclusão.

Com o processamento dos produtos e apesar do aumento generalizado das aminas de origem bacteriana (exceptuando a  $\beta$ -feniletilamina, que esteve globalmente ausente), a tiramina foi sempre a mais prevalente nas amostras do Lote A. Nos enchidos do Lote B os teores de tiramina acabaram por ser igualados, ou até mesmo superados, pelos níveis de putrescina. Por outro lado, o Lote B destacou-se invariavelmente pelos maiores níveis totais de AB, entre duas a três vezes superiores aos registados nas amostras homólogas do Lote A. Estes resultados serão, no nosso entender, reflexo da microflora existente nos dois lotes de matéria-prima e que tem por base o facto de a maior produção de AB ter ocorrido em ambos os tipos de produtos provenientes deste lote, independentemente do processo de secagem ter decorrido em fumeiro ou exclusivamente em câmara de ambiente controlado com recurso a aroma de fumo líquido. Através deste facto é possível presumir acerca da presença de microrganismos com capacidade para produzir as enzimas envolvidas na produção de cadaverina (e, putrescina). Este é caso das enterobactérias que estão usualmente associadas a este tipo de resultados e que se encontram presentes habitualmente na matéria-prima e durante as etapas iniciais do processamento (Ferreira *et al.*, 2007; Lorenzo *et al.*, 2007; Bover-Cid *et al.*, 2009), mas que são responsáveis

pela acumulação de putrescina e cadaverina mesmo na ausência de células viáveis, durante o armazenamento.

A presença de tiramina em produtos fermentados está relacionada principalmente com a actividade das BAL (Suzzi e Gardini, 2003). Por serem as bactérias que participam mais activamente no processo fermentativo que se desenvolve durante o fabrico dos enchidos, facilmente se compreende o facto de esta ser geralmente a amina predominante. À semelhança de outros estudos (Vidal-Carou *et al.*, 2007; Leggio *et al.*, 2012; Papavergou *et al.*, 2012), a tiramina foi a amina prevalente nas amostras do Lote A, associada a menores concentrações de putrescina e cadaverina, contrariamente ao que se verificou para o Lote B. Para estes resultados terão contribuído ainda as diferenças encontradas para os teores de tirosina num e noutro lote. Em ambos os casos, o teor inicial do aminoácido precursor da tiramina ficou aquém dos 4 mg/100 g. Não obstante, enquanto no Lote A este valor foi rapidamente suplantado durante o processamento, o mesmo não se verificou no Lote B, na medida em que a tirosina libertada seria imediatamente descarboxilada e convertida em tiramina (devido ao maior aumento de tiramina no Lote B relativamente ao Lote A). Quando as duas tecnologias de processamento são comparadas, no Lote B a exposição dos enchidos “Controlo” a temperaturas mais elevadas no decurso da sua produção parece ter estimulado a actividade das enzimas tirosina descarboxilases. Opostamente, no Lote A, não se encontraram diferenças decorrentes da tecnologia de processamento. A discrepância de tendências aqui verificadas poderá dever-se às estirpes presentes em cada um dos lotes de matérias-primas usadas, na medida em que a produção de AB é dependente da estirpe e não do género do microrganismo em causa, tal como é referido por Fernández *et al.* (2007). Por último, importa considerar que a capacidade de descarboxilar a tirosina não é exclusiva das BAL. De facto, esta actividade foi igualmente identificada em microrganismos de outros géneros, como é o caso dos estafilococos coagulase-negativos (Martín *et al.*, 2006). Neste sentido é admissível a acumulação de quantidades tão distintas de tiramina, mesmo na presença de contagens idênticas de BAL.

A utilização de alguns aditivos ou ingredientes na formulação do chouriço de carne tem vindo a ser equacionada como uma alternativa viável para o controlo das AB. Na literatura dedicada a este tema é possível encontrar diversos estudos onde são avaliados os efeitos devidos à adição de açúcares (Bover-Cid *et al.*, 2001b; González-Fernández *et al.*, 2003), sorbato de potássio (Shalaby, 1996) e nitritos (Bozkurt e Erkmen, 2004; Kurt e Zorba, 2009). Apesar disso, à data da realização do presente estudo não se conhecem outros trabalhos que incidam especificamente no impacto da substituição da fumagem convencional pela adição de aroma de fumo líquido, nomeadamente na formação de AB em produtos cárneos curados crus.

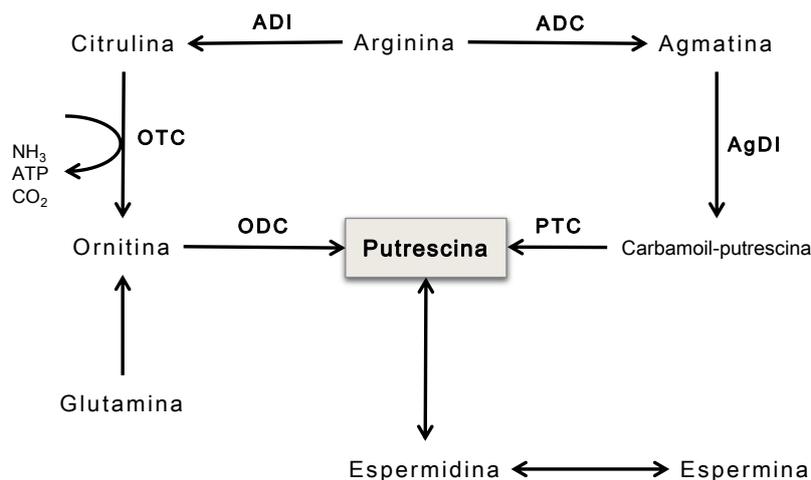
No contexto da formação das AB, a análise dos resultados relativos à comparação dos dois métodos de secagem abordados neste estudo deve, necessariamente, considerar dois pressupostos fundamentais. Por um lado, através do seu efeito antimicrobiano, o fumo contribui para a estabilidade microbiológica dos produtos cárneos fermentados crus. Muito embora

Montazeri *et al.* (2013) tenha identificado no condensado de fumo líquido um efeito benéfico enquanto agente antimicrobiano, nomeadamente no controlo de *Listeria monocytogenes* (Martin *et al.*, 2010), as espécies afectadas podem divergir e assim surgir diferentes níveis de AB. Simultaneamente, condições de secagem diferenciadas deverão inevitavelmente afectar a velocidade de desidratação, redução da actividade da água e, concomitantemente o perfil microbiológico e actividade aminogénica associada. A detecção de maiores níveis de aminas nos produtos fumados foi verificada para ambos os lotes. Para este facto terão contribuído as temperaturas mais elevadas a que os produtos são expostos durante a sua permanência no fumeiro, na medida em que temperaturas mais elevadas potenciam a actividade das enzimas descarboxilases, assim como a produção dos aminoácidos precursores das AB.

A influência devida às diferentes tecnologias de processamento no nível de aminogénese foi evidente em ambos os lotes, no entanto em fases distintas. No Lote A, as diferenças entre as amostras “Controlo” e “AFL” surgiram durante o armazenamento enquanto no Lote B, o efeito devido à tecnologia de processamento foi prontamente observado no produto acabado, sendo que a secagem em câmara associada à incorporação de condensado de fumo contribuiu notoriamente para minimizar a presença das várias aminas de origem bacteriana analisadas. À luz destes resultados, o impacto da tecnologia de secagem parece ser assim fortemente condicionado pela qualidade da matéria-prima. No contexto do controlo da aminogénese, a combinação do aroma de fumo líquido com a secagem em câmara alternativamente à fumagem, revelou exercer uma influência positiva, em especial nos produtos do Lote B. Assim, quando as duas tecnologias são comparadas facilmente se conclui que o facto de o chouriço de carne “AFL” ter sido sujeito a temperaturas mais baixas constituiu um factor decisivo para que a actividade descarboxilásica fosse minimizada. A temperatura está directamente envolvida na regulação da actividade proteolítica, nas taxas de crescimento microbiano, bem como na acção das enzimas descarboxilativas. De acordo com diversas fontes, as enzimas responsáveis pela descarboxilação da ornitina, lisina e tirosina tem actividades óptimas a uma temperatura de 37 °C (Abell e Marion, 1988; Yarlett *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1998). Por este motivo, mesmo na presença de maiores contaminações microbianas, a capacidade descarboxilativa é inibida a temperaturas inferiores, o que se traduz na menor libertação de putrescina, cadaverina e tiramina, respectivamente.

A forma como o perfil das AB evoluiu ao longo do tempo é facilmente explicado pela evolução do processo proteolítico que resulta na libertação dos aminoácidos precursores, tal como o demonstram várias correlações estatísticas que foram identificadas. No caso particular da putrescina, a sua formação pode ocorrer através de várias vias metabólicas que se desenrolam em simultâneo, razão pela qual esta amina pode apresentar diversos aminoácidos precursores. Na Figura 55 são esquematizadas as vias metabólicas conhecidas para a formação de putrescina. Com base em Stadnik e Dolatowski (2010) a glutamina, por conversão em ornitina, representa um dos precursores indirectos desta amina, por exemplo, apresentou uma forte correlação negativa com a putrescina ( $r = -0,85$ ,  $p < 0,05$ ; cf. Tabela A.19 do Apêndice). Da

mesma forma, de acordo com Pereira *et al.* (2009) a desaminação da arginina é o principal mecanismo catabólico que envolve este aminoácido, através do qual esta é convertida em ornitina (Figura 55) que por descarboxilação dá origem à putrescina (Morris, 2007). Com efeito este é um mecanismo que já se encontra descrito para os *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* (Pereira *et al.*, 2009), que são frequentemente encontrados nos produtos cárneos. Durante este processo ocorre a libertação de amónia e ATP que permite melhorar a viabilidade das células, nomeadamente de algumas BAL, durante a fase estacionária (Vergès *et al.*, 1999). Apesar dos resultados obtidos nesta investigação não terem permitido identificar uma correlação directa entre a ornitina e a putrescina verificou-se, contudo, uma importante correlação entre este aminoácido e a arginina ( $r = 0,58$ ,  $p < 0,05$ ; cf. Tabela A.19 do Apêndice). De salientar ainda que nas amostras “PF” do Lote A e, até ao final do armazenamento, registou-se um rácio quase constante, sendo que a proporção média de arginina *vs.* ornitina equivaleu a 2,35. No Lote B, devido ao acentuado incremento de arginina comparativamente à ornitina, este rácio aumentou de forma progressiva, mas de forma idêntica para o chouriço de carne “Controlo” e “AFL”: 3,61; 4,70 e 6,39 (amostras “PF”, “1M” e “3M”, respectivamente). Em termos estatísticos, destaca-se a forte correlação entre a arginina e a putrescina ( $r = 0,80$ ,  $p < 0,05$ ; cf. Tabela A.19 do Apêndice), o que pode indiciar igualmente a relevância deste aminoácido. Contudo, esta não é a única via metabólica que envolve a formação de putrescina a partir da arginina. Alternativamente, quando sujeita à acção da enzima arginina descarboxilase, a arginina é transformada em agmatina (também ela uma amina biogénica, Figura 55) que, por via de desaminação conduz à formação de putrescina. Não tendo a agmatina sido uma das AB estudadas, não é possível concluir acerca da sua relevância na formação de putrescina. Acresce ainda o facto de a espermina e espermidina serem interconvertíveis entre si e, a esta última, em putrescina (Landete *et al.*, 2008). Desta forma, a presença destas duas aminas endógenas pode também contribuir para a formação de putrescina no chouriço de carne. No seu trabalho, Landete *et al.* (2008) constataram que a produção de putrescina em resposta à adição de espermina e espermidina dependia do microrganismo em causa. No caso dos resultados agora apresentados, verificou-se uma progressiva diminuição de espermina ao longo do tempo, por oposição ao incremento de espermidina, acompanhado de um incremento da concentração de putrescina. Esta observação é corroborada estatisticamente pela correlação negativa encontrada entre a espermina e espermidina ( $r = -0,40$ ,  $p < 0,05$ ; cf. Tabela A.19 do Apêndice) e da última com a putrescina ( $r = 0,90$ ,  $p < 0,05$ ; cf. Tabela A.19 do Apêndice).



**Figura 55.** Vias metabólicas da arginina e putrescina.

Adaptado de Molderings e Haenisch (2012).

ADI: arginina desaminase; OTC: ornitina carbamoiltransferase; ODC: ornitina descarboxilase; ADC: arginina descarboxilase; AgDI: agmatina desaminase; PTC: putrescina carbamoiltransferase.

Em termos globais, os teores das aminas de origem bacteriana aqui encontrados são equiparáveis com os resultados que têm vindo a ser reportados por diversos autores, nos mais variados produtos cárneos, sejam eles produzidos em Portugal ou de outras origens (Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero, 2004b, 2004a; Roseiro *et al.*, 2006; Latorre-Moratalla *et al.*, 2008; Komprda *et al.*, 2009; Roseiro *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012). Do ponto de vista da segurança do consumidor não existe, à data, qualquer legislação que determine teores máximos de AB aplicáveis aos produtos de salsicharia. Assim sendo, são frequentemente considerados como referência os níveis a partir dos quais são verificados efeitos toxicológicos devido à ingestão de aminas, ou seja, 100 mg/kg para a histamina bem como para a tiramina, 30 mg/kg para a  $\beta$ -feniletilamina e 200 mg/kg para o conjunto das aminas vasoactivas (Shalaby, 1996; Eerola *et al.*, 1998). Um dos perigos do consumo de produtos que contenham elevadas contaminações com este grupo de aminas advém do seu carácter vasoactivo, o qual, pode conduzir à ocorrência de alguns efeitos adversos, tais como dores de cabeça, transpiração e vómitos (Bover-Cid *et al.*, 2014). Com excepção do chouriço de carne “Controlo” do Lote A com 90 dias de armazenamento (“3M”) onde se detectou a  $\beta$ -feniletilamina (onde o teor verificado não atingiu 1 mg/kg), a presença de aminas vasoactivas reduziu-se à tiramina. Os enchidos “Controlo” armazenados por 3 meses foram os mais contaminados com esta amina, onde se detectaram 128,56 e 204,65 mg/kg (Lotes A e B, respectivamente). Com efeito, os segundos foram mesmo os únicos em que a quantidade média de aminas vasoactivas superou os 200 mg/kg aconselhados.

As aminas endógenas, espermina e espermidina, estão envolvidas em diversos processos fisiológicos (Urdiales *et al.*, 2001; Larqué *et al.*, 2007), por este motivo elas ocorrem naturalmente nas células musculares e na carne utilizada como matéria-prima nos produtos de salsicharia. Como tal, estas são habitualmente as mais prevalentes nas fases iniciais do processamento tecnológico, à semelhança do que se constatou para o chouriço de carne produzido aquando da

realização deste ensaio-piloto. Das duas aminas endógenas avaliadas, a espermina é a que surge em maiores quantidades na carne de porco (Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero, 2004b; Larqué *et al.*, 2007; Paulsen e Bauer, 2007), facto que justifica a sua prevalência sobre a espermidina, tal como se verifica pela análise dos resultados agora obtidos. Globalmente os teores aqui encontrados para estas duas aminas apresentaram-se um pouco superiores aos determinados por Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero (2004b), Kalač (2006), Gençcelep *et al.* (2007) e Papavergou *et al.* (2012) mas, ainda assim, ligeiramente inferiores àqueles encontrados por Roseiro *et al.* (2010). Ao longo do processamento, e com base nos dados agora obtidos, observou-se o decréscimo dos níveis de espermina e de aumento da espermidina comparativamente aos teores inicialmente encontrados nas amostras “MP”. Na opinião de diversos autores, os teores destas poliaminas não são habitualmente afectados pelo processamento dos produtos (Hernández-Jover *et al.*, 1997; Kalač, 2006; Paulsen e Bauer, 2007). Todavia, os teores destas poliaminas dependem de vários factores que não se encontram ainda totalmente explicados, nomeadamente da sua utilização como fonte de azoto para o desenvolvimento de alguns microrganismos, mas igualmente da conversão da espermina em espermidina (Bover-Cid *et al.*, 2001b; Urdiales *et al.*, 2001; Roseiro *et al.*, 2006; Roseiro *et al.*, 2010).

Ao longo dos últimos anos, tem vindo a instalar-se uma crescente consciencialização da importância que a alimentação exerce sobre a saúde dos consumidores. O conhecimento dos benefícios associados aos alimentos funcionais têm, desta forma, impulsionado fortemente a investigação nesta vertente da indústria alimentar. Consequentemente inúmeros compostos com propriedades fisiológicas benéficas para a saúde dos consumidores têm vindo a ser isolados e caracterizados a partir dos mais diversos alimentos, desde os vegetais ao leite e até mesmo à carne. Nesta última são já conhecidos, por exemplo, o ácido linoleico conjugado (usualmente designado por CLA), a carnosina, anserina, L-carnitina, glutatona, taurina, coenzima Q10 e a creatina (Arihara e Ohata, 2008). A presença destes compostos nos produtos cárneos, nomeadamente nos produtos de salsicharia tradicional, constitui inequivocamente uma mais-valia. Como já foi referido, é sobejamente conhecida a grande diversidade de reacções químicas e bioquímicas, que têm lugar durante o processo de fabrico dos enchidos que envolvem as fracções azotadas (como sejam as proteínas, péptidos e aminoácidos) e que promovem alterações decisivas na sua composição química. Em resultado da proteólise que se desenvolve são libertados péptidos que possuem actividade bioactiva. Outros compostos bioactivos porém, existem naturalmente na carne como é o caso da carnosina, anserina e creatina. No corpo humano, a carnosina e anserina integram o sistema antioxidativo cuja actividade biológica está relacionada com a sua capacidade para captar radicais livres (Lafarga e Hayes, 2014), podendo a sua presença no organismo ocorrer tanto por via endógena, como pela ingestão de alimentos que contenham estes compostos.

A acção dos dipéptidos carnosina e anserina, nos alimentos, e em particular nos produtos cárneos, está relacionada com a prevenção da oxidação lipídica e a estabilização da cor (Aristoy

e Toldrá, 1998). Tanto a creatina como a carnosina podem ser encontradas em maiores quantidades em músculos com metabolismo glicolítico (Mora *et al.*, 2008b). A primeira porque intervém no fornecimento de energia nas fibras musculares e a segunda pelo seu efeito de tamponização do pH, responsável por neutralizar o ácido láctico que se forma durante o metabolismo anaeróbico característico deste tipo de músculos (Suzuki *et al.*, 2002). Acerca da catálise e da influência que o processamento exerce sobre estes dois dipéptidos, ainda pouco se sabe. Bauchart *et al.* (2006), contudo, chamam a atenção para o facto de as enzimas que intervêm na degradação destes dois péptidos bioactivos, as aminoacilhistidina dipeptidase, estarem habitualmente localizadas no fígado, rins e plasma sanguíneo, mas não o músculo-esquelético, o que torna a sua acção limitada ou mesmo inexistente em produtos de salsicharia, onde estes tecidos não sejam adicionados. Assim sendo os níveis de carnosina, anserina e creatina são habitualmente atribuídos à composição original na matéria-prima e não devido ao tempo ou mesmo ao tipo de processamento. Aliás, a qualidade da matéria-prima tem vindo a ser indicado por diversos autores como sendo o principal factor a afectar os teores em péptidos bioactivos na carne e produtos cárneos, seja devido às características do animal que lhe dá origem (Roseiro *et al.*, 2014a) ou ao tipo de músculo (Cornet e Bousset, 1999; Mora *et al.*, 2008b). Este facto parece ter sido, uma vez mais, confirmado com os resultados obtidos no presente estudo, porque à parte das diferenças encontradas nas massas dos dois lotes, os teores de anserina e carnosina inicialmente encontrados permaneceram globalmente inalterados ao longo do tempo, independentemente da tecnologia de processamento seguida. Uma tendência semelhante havia já sido reportada por Toldrá *et al.* (2000) que verificou que a concentração de carnosina se mantinha constante ao longo dos primeiros 100 dias de maturação do presunto. Segundo Moya *et al.* (2001) uma das razões pelas quais o teor em dipéptidos se manteve globalmente constante ao longo do tempo deveu-se precisamente à ausência de enzimas com capacidade para os hidrolisar. Aristoy *et al.* (2016) destacam também a grande estabilidade destes dipéptidos, com base na sua evolução durante o processamento de outros produtos cárneos, como o presunto. Estes autores acrescentam que a evolução destes dipéptidos depende necessariamente da presença de enzimas com capacidade para os hidrolisar, como é o caso da carnosinase.

À data da redacção do presente trabalho não foi possível encontrar literatura relativamente à presença e evolução destes compostos, especificamente em produtos cárneos fermentados crus. Em qualquer caso, se os restantes componentes da massa de chouriço de carne forem ignorados e apenas o teor em carne for tido em conta, os níveis de carnosina e anserina estão de acordo com os habitualmente encontrados na carne de porco e que foram encontrados por outros autores (Gil-Agustí *et al.*, 2008; Peiretti *et al.*, 2011). Tradicionalmente, a carne de porco é mais rica em carnosina do que em anserina, que é geralmente a mais abundante em carnes de aves como o frango e peru (Mora *et al.*, 2007; Gil-Agustí *et al.*, 2008), facto igualmente comprovado nesta investigação.

No que se refere à creatina foram encontradas inicialmente quantidades similares deste composto em ambas as massas do chouriço de carne (amostras “MP”). Com a progressão do processamento e armazenamento, contudo, os produtos experimentaram uma tendência de decréscimo deste composto bioactivo, em especial no chouriço de carne do Lote A, onde este se mostrou mais acentuado. A este respeito, Mora *et al.* (2010) observaram um aumento de creatinina na mesma proporção do desaparecimento de creatina, em resultado da conversão da primeira na segunda, o que poderá explicar os resultados agora obtidos. Estes autores confirmaram ainda que, durante a produção de presunto, a conversão não enzimática da creatina em creatinina é favorecida a maiores temperaturas. Naturalmente, os produtos sujeitos a fumagem, ainda que temporariamente, foram expostos a temperaturas mais elevadas que poderiam ter potenciado esta conversão. No entanto, não se observaram diferenças nos teores de creatina em função do tipo de processamento seguido, facto que leva a crer que as diferenças de temperaturas existentes entre os dois métodos de processamento testados não terão sido suficientes para que variações entre os dois tipos de amostras (“Controlo” e “AFL”) fossem observadas. Segundo Mora *et al.* (2008b) a conversão da creatina é também influenciada quer pelo seu teor inicial, quer pelo pH, todavia o mesmo não pode ser comprovado pelos dados recolhidos neste estudo. Por um lado, porque as amostras “MP” continham níveis idênticos de creatina. Por outro lado não foi possível estabelecer uma correlação clara entre a diminuição do pH e a diminuição dos teores de creatina.

## 6.5. CONCLUSÃO

Entre outros aspectos, a utilização de condensado de fumo líquido em produtos de salsicharia caracterizou-se por conduzir a níveis de pH globalmente mais elevados. Sendo o pH um factor determinante, no que concerne à regulação da actividade enzimática, esta alteração condicionou a extensão do processo proteolítico (que ficou patente não só através dos menores níveis das fracções ANP e AAL, como do teor total de AA). Por este motivo, os produtos onde se registaram níveis de pH inferiores, ou seja, nas amostras fumadas, estiveram sujeitos a uma proteólise mais intensa, sendo que a arginina, leucina, isoleucina, fenilalanina e valina foram alguns dos aminoácidos livres onde esta tendência foi mais evidente. Por sua vez, quando as duas tecnologias, aspersão e incorporação, são comparadas, verificou-se que os níveis de pH mais elevados ocorrerem principalmente naquelas amostras cujo processamento compreendeu a incorporação do aroma na massa.

Foram igualmente as amostras fumadas que evidenciaram maiores níveis de contaminações com AB que se ficaram a dever a uma convergência de factores: maior disponibilidade de aminoácidos precursores, assim como temperaturas de secagem mais elevadas. Em suma, os resultados agora obtidos atestam a importância da tecnologia de secagem no grau de

aminogénese e evidenciam os benefícios da utilização de aroma de fumo líquido para o controlo da acumulação de AB. Na medida em que não foi possível atestar acerca da qualidade microbiológica da matéria-prima, este efeito constituiu uma salvaguarda adicional na prevenção da formação destes contaminantes químicos.

Paralelamente, ficou uma vez mais demonstrado o impacto da importância da matéria-prima na qualidade e segurança dos produtos de salsicharia tradicional, nomeadamente no que respeita ao teor em compostos bioactivos e à formação de AB durante o seu processamento e, mais tarde, durante o armazenamento.

A modificação ao processo tecnológico aqui proposta (tratamento com aromas de fumo) comporta alterações que se podem revelar de grande importância para as propriedades sensoriais dos produtos pelo que a sua aplicação deve ser cuidadosamente sustentada por estudos de análise sensorial, no sentido de avaliar a sua aceitabilidade por parte dos consumidores. Por outro lado, pelo facto de a introdução do aroma de fumo líquido no momento da formulação não requerer, do ponto de vista tecnológico, qualquer investimento por parte da indústria cárnea, torna-a uma tecnologia extremamente vantajosa, especialmente se forem considerados os benefícios já referidos ao nível da redução de PAH, bem como de AB.

## 7.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

## 7.1. CONCLUSÕES GERAIS

### Perfil de PAH em produtos de salsicharia

Os resultados relativos à presença de PAH em produtos de salsicharia tradicional portuguesa evidenciaram alguns aspectos que se revelaram transversais, quer ao estudo de incidência, quer aos restantes produtos processados à escala piloto, nomeadamente:

- ◆ A distribuição heterogénea dos PAH que se concentraram maioritariamente à superfície (na tripa), em particular os PAH pesados, pelo que a remoção da tripa antes do consumo dos produtos permite minimizar a exposição dos consumidores a estes contaminantes cancerígenos. No caso dos produtos Transmontanos avaliados no estudo de incidência este procedimento resultaria numa redução média de mais de 40% dos PAH pesados;
- ◆ Os PAH leves (com até 4 anéis aromáticos inclusive) foram inequivocamente aqueles que se encontraram em maiores quantidades, comparativamente com os PAH pesados (com 5 ou mais anéis benzénicos), tendo correspondido a cerca de 99% do teor total de PAH.

### Incidência de PAH em produtos de salsicharia tradicional portuguesa

- ◆ As amostras de produtos Transmontanos destacaram-se pelos níveis de contaminação significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores aos registados nas amostras de produtos Alentejanos. No chouriço de carne, um produto fabricado em ambas as regiões, foi possível identificar diferenças assinaláveis, com as amostras da região Norte a apresentarem cerca de três vezes mais PAH (teor total). Embora esta tendência tenha sido observada para todos os compostos a nível individual assim como para o total de PAH, PAH leves, PAH pesados e PAH4, as diferenças foram particularmente notórias no BaA e CHR, ambos carcinogénicos;
- ◆ Salvo algumas amostras pontuais, todos os produtos recolhidos junto de produtores Alentejanos apresentaram teores de BaP e PAH4 em conformidade com os limites máximos regulamentados de 2 e 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Estes mesmos limites foram, em contrapartida repetidamente ultrapassados nas amostras de origem transmontana, em particular os níveis de PAH4 que em média oscilaram entre 86,76 e 298,33  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;
- ◆ Com base na análise de risco efectuada a partir dos teores de BaP e PAH4, o consumo de produtos de salsicharia Transmontanos representa um risco superior comparativamente aos produtos da região do Alentejo.

## **Efeito do teor de gordura, tipo de tripa e regime de fumagem no teor em PAH em produtos de salsicharia**

- ◆ Este estudo demonstrou que o tipo de tripa utilizado revelou-se com o factor mais influente no que respeita à acumulação de PAH, sobrepondo-se quer ao teor de gordura quer ao regime de fumagem seguido. A utilização de invólucros à base de colagénio permitiu reduzir drasticamente a quantidade de PAH adsorvidas à superfície assim como a sua posterior migração para as camadas internas. Ainda assim o regime de fumagem indirecto demonstrou ser eficaz para a redução de PAH nos produtos, em particular os PAH pesados. Pelo contrário, o aumento do teor de gordura contribuiu para facilitar a difusão dos PAH para as camadas internas dos produtos;
- ◆ Os resultados obtidos demonstraram a importância da embalagem sobre os níveis de PAH determinados. Ao serem absorvidos pelo material da embalagem, é possível a sua remoção dos produtos, sendo este processo tanto mais eficaz quanto maior a diferença de polaridades existente entre os compostos do filme da embalagem e a matriz onde os PAH estão retidos (neste caso a tripa). Terá sido esta a causa para o maior grau de remoção registado nos produtos com tripa de colagénio. Por outro lado, apesar deste tipo de invólucro dificultar a penetração de PAH no interior nos produtos, parece ser permeável à sua saída, para o filme da embalagem. No mesmo contexto, produtos com tripa natural e com elevado teor de gordura embalados em LDPE também apresentaram um grau de redução assinalável, facto que confirma que maiores teores de gordura facilitam a mobilidade destes contaminantes e a sua remoção para a embalagem. De salientar ainda que o armazenamento do chouriço de carne resultou numa diminuição assinalável nos teores de PAH carcinogénicos como o BaA e CHR. À luz dos nossos resultados, é assim aconselhável, sempre que possível, o armazenamento deste tipo de produtos em LDPE por um mês previamente à sua comercialização;
- ◆ Paralelamente, através da realização do ensaio em meio líquido, em que água e azeite contaminados foram armazenados em filme de LDPE, foi possível concluir que:
  - ◇ A maior taxa de remoção dos PAH da matriz ocorre durante as primeiras horas de contacto da matriz com o filme da embalagem;
  - ◇ A velocidade de migração dos PAH para a rede polimérica diminuiu com o seu peso molecular.

## **Avaliação do perfil de PAH em condensados de fumo gerados através da combustão de diferentes madeiras e estudo do efeito da utilização de aromas de fumo em chouriço de carne**

- ◆ Concluiu-se que para os tipos de madeiras estudados (azinho, sobro, oliveira, carvalho e castanho) e sempre que a combustão ocorreu a 400 °C os teores de PAH determinados

nos concentrados de fumo não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), com excepção dos teores de BaA que foram mais elevados ( $p < 0,05$ ) nas madeiras de carvalho e castanho, facto que pode explicar os teores mais elevados deste contaminante nas amostras transmontanas e que foram analisadas no decurso do estudo de incidência. As maiores diferenças surgiram quando a pirólise ocorreu a 600 °C. Os resultados obtidos demonstraram que o azinho é o tipo de madeira que pode envolver maiores riscos, pois foi o que gerou condensados de fumo com maior grau de contaminação com PAH, especialmente de PAH pesados como o BbFA, BkFA, BaP e DBahA. Somente no caso do BghiP e do IP, os níveis quantificados nos condensados de azinho foram superados ( $p < 0,05$ ) pelos determinados nos condensados produzidos a partir das madeiras mais frequentemente utilizadas na região de Trás-os-Montes: a oliveira, o carvalho e o castanho. Face a estes resultados, é possível concluir que a composição do fumo do sobro é, do ponto de vista da quantidade e tipo de PAH formados, a mais segura para a fumagem de produtos de salsicharia. Com excepção do azinho, os resultados parecem indicar a existência de uma correlação entre a composição da madeira em lenhina e o teor em PAH presente no fumo;

- ◆ A utilização de aromas de fumo permitiu a redução de PAH, em especial os PAH pesados que nunca foram detectados, ainda que importantes reduções tenham sido também verificadas ao nível dos compostos leves. Quando as duas técnicas de aplicação dos aromas de fumo são comparadas, aquela que considerou a sua incorporação demonstrou ser a mais funcional do ponto de vista tecnológico. Constatou-se ainda que mesmo quando são seguidos procedimentos idênticos, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre lotes podem ocorrer. Os resultados obtidos permitiram ainda atestar que os PAH pesados são preferencialmente retidos à superfície, em vez de se difundirem para o interior, quando o processo de secagem em fumeiro é realizado em condições controladas, por curtos períodos de tempo impedindo que os produtos sejam sujeitos a temperaturas excessivamente elevadas.

#### **Incidência de aminas biogénicas em produtos de salsicharia tradicional portuguesa**

- ◆ Com a realização do estudo de incidência de aminas biogénicas (AB) em produtos de salsicharia tradicionais verificou-se que os maiores níveis de contaminação recaíram sobre as amostras recolhidas junto dos produtores Alentejanos e que esta maior contaminação se deve ao maior grau de proteólise observado nestes produtos (e que foi notado, designadamente, no chouriço de carne que é comum ao Alentejo e Trás-os-Montes). Efectivamente, o teor em AB apresentou correlação significativa com as fracções azotadas estudadas (AAL, ABVT, ANP e teor de proteína). Por outro lado, verificou-se a ocorrência de diferenças assinaláveis mesmo entre produtores da mesma zona geográfica;

- ◆ O perfil de AB foi influenciado pelo calibre dos produtos, sendo que nos de maior calibre a tiramina foi mais abundante, enquanto a putrescina e cadaverina prevaleceram nos de menor calibre;
- ◆ Demonstrou-se a presença de níveis consideráveis de histamina (acima de 100mg/kg, nível considerado seguro) nas amostras de painho e chouriço de carne Alentejanos. De igual modo, os produtos Transmontanos apresentaram concentrações de aminas vasoactivas (triptamina,  $\beta$ -feniletilamina, histamina e tiramina) superiores as 200 mg/kg (teor considerado seguro).

#### **Efeito da utilização de aroma de fumo líquido no perfil de aminoácidos, aminas biogénicas e compostos bioactivos em chouriço de carne**

- ◆ Face aos resultados obtidos neste estudo não se observaram diferenças assinaláveis no perfil de aminoácidos decorrente da utilização de aromas de fumo. Em contrapartida o factor tempo (de armazenamento) redundou em aumentos expressivos de arginina, leucina, ornitina e lisina. Contrariando a tendência observada para os restantes aminoácidos, a glutamina denotou um decréscimo significativo ao longo do tempo;
- ◆ Demonstrou-se que a qualidade da matéria-prima é o aspecto mais preponderante para a ocorrência de AB quer no produto final, quer durante o armazenamento, sobrepondo-se ao efeito da tecnologia de processamento, isto é, a fumagem convencional *vs.* utilização de aromas de fumo. Todavia, a adição de aroma de fumo demonstrou ser eficaz no que se refere à redução do teor em AB no chouriço de carne, em particular quando esta foi directamente da formulação. Relativamente às aminas susceptíveis de causar sintomas adversos nos consumidores, verificou-se a ausência da histamina, todavia teores assinaláveis de aminas vasoactivas (em especial de tiramina) foram encontrados nos produtos de um dos lotes de chouriço de carne;
- ◆ No que respeita à presença de compostos bioactivos, a qualidade da matéria-prima provou ser o factor com maior influência nos níveis de carnosina e anserina, independentemente do tipo de processamento seguido. Ainda que ao longo do tempo de armazenamento a carnosina se tenha mantido globalmente inalterada, os teores de anserina (concretamente no Lote B) e creatinina (apenas no Lote A) experimentaram uma redução relativamente aos teores iniciais.

## 7.2. PERSPECTIVAS DE DESENVOLVIMENTOS FUTUROS

Os produtos de salsicharia tradicional compreendem um sector de mercado que tem vindo a crescer nos últimos anos. Neste cenário, e considerando o maior grau de informação dos consumidores actuais, o desenvolvimento dos produtos será amplamente beneficiado pela implementação de tecnologias que privilegiem a sua segurança. Complementarmente, a presença de compostos com propriedades benéficas para a saúde dos consumidores constitui uma importante mais-valia.

Para a obtenção de produtos mais seguros e saudáveis, e à luz dos resultados agora apresentados, é necessário continuar a investigar a incidência de contaminantes químicos como sejam os PAH e as AB, estendendo a avaliação, agora iniciada, a produtos de outras regiões do país. Os resultados encorajadores relativos à utilização de aromas de fumo agora apresentados justificam, no nosso entender, que esta linha de investigação seja aprofundada, preferencialmente em contexto industrial, designadamente em cooperação com produtores tradicionais. Neste estudo, além dos contaminantes agora abordados, seria interessante avaliar de uma forma integrada outras metodologias tecnológicas alternativas às testadas no nosso trabalho, nomeadamente através da combinação com outras tecnologias de secagem já implementadas (câmaras de secagem e regime de fumagem convencional). Dada a ausência de resultados a este nível em produtos de salsicharia tradicional portuguesa o impacto deste condimento noutros aspectos também importantes como sejam a flora microbiana, características organolépticas e perfil de ácidos gordos, deve ser cuidadosamente estudado.

Pela importância que o processo de fumagem exerce na segurança dos enchidos, parece-nos igualmente importante desenvolver estudos no sentido de conhecer com maior rigor o impacto da fumagem com os diferentes tipos de madeira nos teores de PAH, assim como avaliar a composição do fumo de outros tipos de madeira ou combinações de diferentes madeiras que possam ser usados pelos produtores na fumagem dos produtos.

Por fim, e considerando o impacto que a embalagem pode ter na contaminação dos produtos em PAH, parece-nos pertinente o desenvolvimento de estudos complementares no sentido de avaliar a eficiência de outros materiais de embalagem na eliminação destes contaminantes a partir da matriz dos enchidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Aaslyng, M. D., Vestergaard, C., e Koch, A. G. (2014). The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham and salami. *Meat Science*, *96*, 47-55.
- Abell, L. M., e Marion, H. O. L. (1988). Isotope effect studies of the pyridoxal 5'-phosphate dependent histidine decarboxylase from *Morganella morganii*. *Biochemistry*, *27*, 5927-5933.
- Ahn, D. U., Lee, E. J., e Mendonca, A. F. (2006). Meat decontamination by irradiation. In L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Advanced technologies for meat processing* (pp. 151-191). Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Al Bulushi, I., Poole, S., Deeth, H. C., e Dykes, G. A. (2009). Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation - a review. *Critical Reviews in Food Science and Technology*, *49*, 369-377.
- Alfaia, C. M. (2004). Changes in the profile of free amino acids and biogenic amines during the extended short ripening of portuguese dry-cured ham. *Food Science and Technology International*, *10*, 297-304.
- Alfaia, C. M., Irani, M. G., Fernandes, M. H., Fernandes, M. J., e Barreto, A. S. (2013). *Biogenic amines production by Lactobacillus, Staphylococcus and Enterococcus isolated from portuguese fermented/smoked meat products*. Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology, Izmir, Turquia.
- Alomirah, H., Al-Zenki, S., Al-Hooti, S., Zaghloul, S., Sawaya, W., Ahmed, N., e Kannan, K. (2011). Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control*, *22*, 2028-2035.
- Alvarez, M. F. (1994). *Efectos de la adición de lipase pancreática en la maduración de embutidos crudos curados*. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Veterinária. Universidade Complutense de Madrid, Madrid.
- Andrée, S., Jira, W., Schwind, K. H., Wagner, H., e Schwagele, F. (2010). Chemical safety of meat and meat products. *Meat Science*, *86*, 38-48.
- Ansorena, D., Montel, M. C., Rokka, M., Talon, R., Eerola, S., Rizzo, A., . . . Demeyer, D. (2002). Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, *61*, 141-147.
- Antoine, F. R., Wei, C. I., Littell, R. C., e Marshall, M. R. (1999). HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthalaldehyde precolumn derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 5100-5107.
- Anyakora, C. (2007). Polynuclear aromatic hydrocarbons. In L. Nollet (Ed.), *Handbook of water analysis* (pp. 579-597). Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Arihara, K., e Ohata, M. (2008). Bioactive compounds in meat. In F. Toldrá (Ed.), *Meat biotechnology* (pp. 231-249). Nova Iorque, E. U. A.: Springer.
- Aristoy, M.-C., Mora, L., e Toldrá, F. (2016). Histidine-containing dipeptides: properties and occurrence in foods *Encyclopedia of food and health* (pp. 338-342). Oxford, Reino Unido: Elsevier.

- Aristoy, M.-C., Sentandreu, M. A., e Toldrá, F. (2009). Peptides. In L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of muscle food analysis* (pp. 41-56). Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Aristoy, M.-C., e Toldrá, F. (1991). Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*, 1792-1795.
- Aristoy, M.-C., e Toldrá, F. (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science*, *50*, 327-332.
- Aristoy, M. C., Soler, C., e Toldrá, F. (2004). A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food Chemistry*, *84*, 485-491.
- Aro, J. M. A., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K.-i., Fukushima, M., e Sekikawa, M. (2010). The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry*, *119*, 279-285.
- Arrebola, F. J., Frenich, A. G., Gonzalez Rodriguez, M. J., Bolanos, P. P., e Martinez Vidal, J. L. (2006). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil by a completely automated headspace technique coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, *41*, 822-829.
- Associação Comercial e Industrial de Mirandela. (2011). Caderno de especificações da Alheira de Mirandela. Disponível em: [http://www.dgadr.mamaot.pt/IMAGES/DOCS/VAL/DOP\\_IGP\\_ETG/VALOR/ALHEIRA\\_MIRANDELA.PDF](http://www.dgadr.mamaot.pt/IMAGES/DOCS/VAL/DOP_IGP_ETG/VALOR/ALHEIRA_MIRANDELA.PDF). Consultada em: 03/09/2016.
- ATSDR. (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>. Consultada em: 04/01/2016.
- Aurore, G. S., Rodin-bercion, S., Budzinski, H., Abaul, J., e Bourgeois, P. (2000). Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the smoke from six woods and comparative study of their distribution. *Polycyclic Aromatic Compounds*, *13*, 345-359.
- Babrauskas, V. (2001). *Ignition of wood: a review of the state of the art*. Proceedings of the 9th Interflam, Londres.
- Baer, A. A., e Dilger, A. C. (2014). Effect of fat quality on sausage processing, texture, and sensory characteristics. *Meat Science*, *96*, 1242-1249.
- Baka, A. M., Papavergou, E. J., Pragalaki, T., Bloukas, J. G., e Kotzekidou, P. (2011). Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology*, *44*, 54-61.
- Bansal, V., e Kim, K.-H. (2015). Review of PAH contamination in food products and their health hazards. *Environment International*, *84*, 26-38.
- Barbut, S. (2015). Texture. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. G. Sebranek & R. Talon (Eds.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2ª ed., pp. 207-216). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science & Technology*, *6*, 341-346.

- Barlow, S., Renwick, A. G., Kleiner, J., Bridges, J. W., Busk, L., Dybing, E., . . . Würtzen, G. (2006). Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic: Report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe. *Food and Chemical Toxicology*, *44*, 1636-1650.
- Bassi, D., Puglisi, E., e Cocconcelli, P. (2015). Comparing natural and selected starter cultures in meat and cheese fermentations. *Current Opinion in Food Science*, *2*, 118-122.
- Bauchart, C., Rémond, D., Chambon, C., Patureau Mirand, P., Savary-Auzeloux, I., Reynès, C., e Morzel, M. (2006). Small peptides (<5kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Science*, *74*, 658-666.
- Benford, D., Leblanc, J.-C., e Setzer, R. W. (2010). Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: Example: Aflatoxin B1 (AFB1). *Food and Chemical Toxicology*, *48*, Supplement 1, S34-S41.
- Beriain, M. J., Lizaso, G., e Chasco, J. (2000). Free amino acids and proteolysis involved in "salchichon" processing. *Food Control*, *11*, 41-47.
- Bermúdez, R., Franco, D., Carballo, J., Sentandreu, M. Á., e Lorenzo, J. M. (2014). Influence of muscle type on the evolution of free amino acids and sarcoplasmic and myofibrillar proteins through the manufacturing process of Celta dry-cured ham. *Food Research International*, *56*, 226-235.
- Boldyrev, A., e Abe, H. (1999). Metabolic transformation of neuropeptide carnosine modifies its biological activity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *19*, 163-175.
- Borys, A. (2004). Smoking: Liquid smoke application In W. K. Jensen (Ed.), *Encyclopedia of meat sciences* (pp. 1272-1277). Oxford, Reino Unido: Elsevier.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., e Vidal-Carou, M. C. (2001a). Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, *66*, 185-189.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., e Vidal-Carou, M. C. (2001b). Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science*, *57*, 215-221.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., e Vidal-Carou, M. C. (2001c). Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, *65*, 113-123.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., e Vidal-Carou, M. C. (2001d). Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *Journal of Food Protection*, *64*, 367-373.
- Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T., e Vidal-Carou, M. C. (2014). Processing contaminants: biogenic amines. In Y. Motarjemi (Ed.), *Encyclopedia of food safety - Volume 2* (pp. 381-391). Oxford, Reino Unido: Elsevier.

- Bover-Cid, S., Miguélez-Arrizado, M. J., Luz Latorre Moratalla, L., e Vidal Carou, M. C. (2006). Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausages. *Meat Science*, *72*, 62-68.
- Bover-Cid, S., Miguélez-Arrizado, M. J., e Vidal-Carou, M. C. (2001e). Biogenic amine accumulation in ripened sausages affected by the addition of sodium sulphite. *Meat Science*, *59*.
- Bover-Cid, S., Schoppen, S., Izquierdo-Pulido, M., e Vidal-Carou, M. C. (1999). Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science*, *51*, 305-311.
- Bover-Cid, S., Torriani, S., Gatto, V., Tofalo, R., Suzzi, G., Belletti, N., e Gardini, F. (2009). Relationships between microbial population dynamics and putrescine and cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening. *Journal of Applied Microbiology*, *106*, 1397-1407.
- Bover Cid, S., Miguélez-Arrizado, M. J., Becker, B., Holzapfel, W. H., e Vidal-Carou, M. C. (2008). Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*, *25*, 269-277.
- Bovolenta, S., Boscolo, D., Dovier, S., Morgante, M., Pallotti, A., e Piasentier, E. (2008). Effect of pork lard content on the chemical, microbiological and sensory properties of a typical fermented meat product (Pitina) obtained from Alpagota sheep. *Meat Science*, *80*, 771-779.
- Bozkurt, H., e Erkmen, O. (2002). Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). *Meat Science*, *61*, 149-156.
- Bozkurt, H., e Erkmen, O. (2004). Effects of temperature, humidity and additives on the formation of biogenic amines in sucuk during ripening and storage periods. *Food Science and Technology International*, *10*, 21-28.
- Brody, J. G., Moysich, K. B., Humblet, O., Attfield, K. R., Beehler, G. P., e Rudel, R. A. (2007). Environmental pollutants and breast cancer. *Cancer*, *109*, 2667-2711.
- Brosnan, M. E., e Brosnan, J. T. (2016). The role of dietary creatine. *Amino Acids*, 1-7.
- Buzala, M., Słomka, A., e Janicki, B. (2016). Heme iron in meat as the main source of iron in the human diet. *Journal of Elementology*, *21*, 303-314.
- CAC. (2009). Code of practice for the reduction of contamination of food with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from smoking and direct drying processes (CAC/RCP 68/2009). Disponível em: <http://www.fao.org>. Consultada em: 2016/04/13.
- Cai, J., Chen, Q., Wan, X., e Zhao, J. (2011). Determination of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content and Warner-Bratzler shear force (WBSF) in pork using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Food Chemistry*, *126*, 1354-1360.
- Camargo, M. C. R., e Toledo, M. C. I. F. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, *14*, 49-53.

- Campelos, M. I. P. S. (2012). *Hazards and control of risks in artisanal meat products in Portugal*. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia. Universidade Católica Portuguesa, Porto.
- Canto, A. C. V. C. S., Costa Lima, B. R. C., Suman, S. P., Lazaro, C. A., Santana, A. S., Conte-Junior, C. A., . . . Silva, T. J. P. (2014). High hydrostatic pressure minimizes formation of biogenic amines in refrigerated caiman meat. *Meat Science*, *96*, 481.
- Carvalho, L. (2010). *Identificação e caracterização de isolados de Staphylococcus: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestrado em Segurança Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Casaburi, A., Aristoy, M. C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., e Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, *76*, 295-307.
- Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D., e Villani, F. (2008). Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology*, *25*, 335-347.
- Castaño, A., García Fontan, M. C., Fresno, M., Tornadijo, M. E., e Carballo, J. (2002). Survival of Enterobacteriaceae during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage. *Food Control*, *13*, 107-115.
- Castro, D. J., Löhr, C. V., Fischer, K. A., Pereira, C. B., e Williams, D. E. (2008). Lymphoma and lung cancer in offspring born to pregnant mice dosed with dibenzo[a,l]pyrene: The importance of in utero vs. lactational exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *233*, 454-458.
- Cava, R., Tárrega, R., Ramirez, M. R., Mingoarranz, F. J., e Carrasco, A. (2005). Effect of irradiation on colour and lipid oxidation of dry-cured hams from free-range reared and intensively reared pigs. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *6*, 135-141.
- CE. (2003a). Health implications of dietary amines. Disponível em: <http://cordis.europa.eu/>. Consultada em: 2016/04/26.
- CE. (2003b). Regulamento (CE) N.º 2065/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de Novembro de 2003 relativo aos aromatizantes de fumo utilizados ou destinados a serem utilizados nos ou sobre os géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, *L 309*, 1-8.
- CE. (2005a). Regulamento (CE) N.º 208/2005 da Comissão de 4 de Fevereiro de 2005 que altera o Regulamento (CE) N.º 466/2001 no que diz respeito aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Jornal Oficial da União Europeia*, *L 34*, 3-5.
- CE. (2005b). Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005. *Jornal Oficial da União Europeia*, *L 338*, 1-26.
- CE. (2007). Regulamento (CE) N.º 510/2006 do Conselho - Chouriça doce de Vinhais. *Jornal Oficial da União Europeia*, *C 268*, 33-35.

- CE. (2011a). Regulamento (CE) N.º 835/2011 da Comissão de 19 de Agosto que altera o Regulamento (CE) N.º 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia, L 215*, 4-8.
- CE. (2011b). Regulamento (UE) N. o 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n. o 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia, L 295*, 1-177.
- Chakravarti, D., Venugopal, D., Mailander, P. C., Meza, J. L., Higginbotham, S., Cavalieri, E. L., e Rogan, E. G. (2008). The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutation Research, 649*, 161-178.
- Chen, J., e Chen, S. (2005). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by low density polyethylene from liquid model and roasted meat. *Food Chemistry, 90*, 461-469.
- Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammes, W. P., e Holzapfel, W. H. (1990). Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. *Letters in Applied Microbiology, 11*, 278-281.
- Chung, S. Y., Yettella, R. R., Kim, J. S., Kwon, K., Kim, M. C., e Min, D. B. (2011). Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. *Food Chemistry, 129*, 1420-1426.
- Ciecierska, M., e Obiedziński, M. (2007). Influence of smoking process on polycyclic aromatic hydrocarbons' content. *ACTA Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 6*, 17-28.
- Cocconcelli, P., e Fontana, C. (2015). Bacteria. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. G. Sebranek & R. Talon (Eds.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2ª ed., pp. 117-128). Oxford, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Coisson, J. D., Cerutti, C., Travaglia, F., e Arlorio, M. (2004). Production of biogenic amines in "Salamini italiani alla cacciatora PDO". *Meat Science, 67*, 343-349.
- Cornet, M., e Bousset, J. (1999). Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Science, 51*, 215-219.
- Corral, S., Salvador, A., Belloch, C., e Flores, M. (2014). Effect of fat and salt reduction on the sensory quality of slow fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast. *Food Control, 45*, 1-7.
- Cross, A. J., e Sinha, R. (2004). Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis, 44*, 44-55.
- Cui, H., Gabriel, A. A., e Nakano, H. (2010). Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. *Food Control, 21*, 1030-1036.
- Culp, S. J., Gaylor, D. W., Sheldon, W. G., Goldstein, L. S., e Beland, F. A. (1998). A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay. *Carcinogenesis, 19*, 117-124.

- Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., e Wu, G. (2014). Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, *964*, 116-127.
- de Las Rivas, B., Ruiz-Capillas, C., Carrascosa, A. V., Curiel, J. A., Jiménez-Colmenero, F., e Muñoz, R. (2008). Biogenic amine production by Gram-positive bacteria isolated from Spanish dry-cured "chorizo" sausage treated with high pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*, *80*, 272-277.
- De Mey, E., De Klerck, K., De Maere, H., Dewulf, L., Derdelinckx, G., Peeters, M.-C., . . . Paelinck, H. (2014). The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *Meat Science*, *96*, 821-828.
- De Mey, E., De Maere, H., Paelinck, H., e Fraeye, I. (2015). Volatile N-nitrosamines in meat products: potential precursors, influence of processing and mitigation strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *Aceite para publicação*.
- De Mey, E., Drabik-Markiewicz, G., De Maere, H., Peeters, M. C., Derdelinckx, G., Paelinck, H., e Kowalska, T. (2012). Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, *130*, 1017-1023.
- Decker, E. A., e Crum, A. D. (1991). Inhibition of Oxidative Rancidity in Salted Ground Pork by Carnosine. *Journal of Food Science*, *56*, 1179-1181.
- Delistraty, D. (1997). Toxic equivalency factor approach for risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *64*, 81-108.
- Demarquoy, J., Georges, B., Rigault, C., Royer, M.-C., Clairet, A., Soty, M., . . . Le Borgne, F. (2004). Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries. *Food Chemistry*, *86*, 137-142.
- Dennis, M. J., Massey, R. C., Cripps, G., Venn, I., Howarth, N., e Lee, G. (1991). Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Additives & Contaminants*, *8*, 517-530.
- Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, *74*, 188-196.
- DGADR. (2014). Evolução dos produtos tradicionais qualificados (produção, valor da produção, índices de quantidades, preços e valores) 2002 a 2009.
- Di Cagno, R., Lòpez, C. C., Tofalo, R., Gallo, G., De Angelis, M., Paparella, A., . . . Gobbetti, M. (2008). Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Science*, *79*, 224-335.
- Djinovic, J., Popovic, A., e Jira, W. (2008a). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. *Meat Science*, *80*, 449-456.
- Djinovic, J., Popovic, A., e Jira, W. (2008b). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditional and industrial smoked beef and pork ham from Serbia. *European Food Research and Technology*, *227*, 1191-1198.

- Djordjevic, J., Pecanac, B., Todorovic, M., Dokmanovic, M., Glamoclija, N., Tadic, V., e Baltic, M. Z. (2015). Fermented sausage casings. *Procedia Food Science*, 5, 69-72.
- Drabik-Markiewicz, G., Dejaegher, B., De Mey, E., Kowalska, T., Paelinck, H., e Vander Heyden, Y. (2011). Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food Chemistry*, 126, 1539-1545.
- Drozak, J., Chrobok, L., Poleszak, O., Jagielski, A. K., e Derlacz, R. (2013). Molecular identification of carnosine N-methyltransferase as chicken histamine N-nethyltransferase-like protein (HNMT-Like). *PLoS ONE*, 8, e64805.
- Duedahl-Olesen, L., Aaslyng, M., Meinert, L., Christensen, T., Jensen, A. H., e Binderup, M. L. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Danish barbecued meat. *Food Control*, 57, 169-176.
- Duedahl-Olesen, L., White, S., e Binderup, M. L. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in danish smoked fish and meat products. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 26, 163-184.
- Durá, M. A., Flores, M., e Toldrá, F. (2004a). Effect of Debaryomyces spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Science*, 68, 319-328.
- Durá, M. A., Flores, M., e Toldrá, F. (2004b). Effects of curing agents and the stability of a glutaminase from Debaryomyces spp. *Food Chemistry*, 86, 385-389.
- Durack, E., Alonso-Gomez, M., e Wilkinson, M. (2008). Salt: a review of its role in food science and public health. *Current Nutrition & Food Science*, 4, 290-297.
- EC. (2002). *Polycyclic aromatic hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects*. Bruxelas, Bélgica.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., e Hirvi, T. (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International*, 76, 575-577.
- Eerola, S., Sagués, A., e Hirvi, T. (1998). Biogenic amines in finnish dry sausages. *Journal of Food Safety*, 18, 127-138.
- EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *The EFSA Journal*, 282, 1-31.
- EFSA. (2007). Risk assesement of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with food (AFC) on the smoke flavouring primary product. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/>. Consultada em: 2016/02/08.
- EFSA. (2008a). Findings of the EFSA data collection on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. A report from the Unit of data Collection and Exposure on a Request from the European Comission. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/>. Consultada em: 2015/07/05.
- EFSA. (2008b). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 724, 1-114.
- EFSA. (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *The EFSA Journal*, 9, 1-93.

- Elias, M. (2004). *Caracterização, conservação e produção biotecnológica de paio de porco Alentejano*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Alimentar. Universidade de Évora.
- Elias, M., e Carrascosa, A. V. (2010). Characterisation of the Paio do Alentejo, a traditional Portuguese Iberian sausage, in respect to its safety. *Food Control*, 21, 97-102.
- Elias, M., e Carrascosa, A. V. (2013). Physicochemical, microbiological and sensory changes during storage in “Paio do Alentejo”, a traditional Portuguese Iberian sausage. *FleischWirtschaft International*, 28, 128-133.
- Elias, M., Potes, M. E., Roseiro, L. C., Santos, C., Gomes, A., e Agulheiro-Santos, A. C. (2014). The effect of starter cultures on the Portuguese traditional sausage “Paio do Alentejo” in terms of its sensory and textural characteristics and polycyclic aromatic hydrocarbons profile. *Journal of Food Research*, 3, 45-56.
- Erdmann, K., Cheung, B. W., e Schroder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 643-654.
- Erkmen, O., e Bozkurt, H. (2004). Quality characteristics of retailed Sucuk (Turkish dry-fermented sausage). *Food Technology and Biotechnology*, 42, 63-69.
- Esteves, A. (2005). *Perigos microbiológicos em alheira - Principais vias de contaminação por Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens e Salmonella spp.* Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Eugenio, M. E., Alaejos, J., Díaz, M. J., López, F., e Vidal, T. (2006). Evaluation of Holm oak (*Quercus Ilex*) wood as alternative source for cellulose pulp. *Cellulose Chemistry and Technology*, 40, 53-61.
- Falcó, G., Domingo, J. L., Llobet, J. M., Teixidó, A., Casas, C., e Müller, L. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection*, 66, 2325-2331.
- FAO/WHO. (2005a). Evaluation of certain food contaminants - Sixty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43258/1/WHO\\_TRS\\_930\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43258/1/WHO_TRS_930_eng.pdf). Consultada em: 04/01/2016.
- FAO/WHO. (2005b). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - sixty-fourth meeting: summary and conclusions. Disponível em: <http://www.fao.org/>. Consultada em: 2015/06/10.
- Farhadian, A., Jinap, S., Hanifah, H. N., e Zaidul, I. S. (2011). Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. *Food Chemistry*, 124, 141-146.
- Fasano, E., Yebra-Pimentel, I., Martínez-Carballo, E., e Simal-Gándara, J. (2016). Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods. *Food Control*, 59, 581-590.

- Feiner, G. (2006). *Meat products handbook: practical science and technology*. Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Fengel, D., e Wegener, G. (1989). *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlim, Nova Iorque: Walter De Gruyter Incorporated.
- Ferguson, L. R. (2010). Meat and cancer. *Meat Science*, *84*, 308-313.
- Fernández, M., Linares, D. M., Rodríguez, A., e Alvarez, M. A. (2007). Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *73*, 1400-1406.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., . . . Teixeira, P. (2007). Chemical and microbiological characterisation of "Salpicão de Vinhais" and "Chouriça de Vinhais": traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Food Microbiology*, *24*, 618-623.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., Monteiro, M. J., . . . 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*, 570-575.
- Flores, M., Aristoy, M. C., Spanier, A. M., e Toldrá, F. (1997). Non-volatile components effects on quality of "Serrano" dry-cured ham as related to processing time. *Journal of Food Science*, *62*, 1235-1239.
- Flores, M., e Olivares, A. (2015). Flavor. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. G. Sebranek & R. Talon (Eds.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2ª ed., pp. 217-225). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Flores, M., e Toldrá, F. (2011). Microbial enzymatic activities for improved fermented meats. *Trends in Food Science and Technology*, *22*, 81-90.
- Folch, J., Lees, M., e Sloane, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*, 497-509.
- Fries, E., e Zarfl, C. (2012). Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to low and high density polyethylene (PE). *Environmental Science and Pollution Research*, *19*, 1296-1304.
- FSAI. (2006). Investigation into levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food on the Irish market. Disponível em: [https://www.fsai.ie/uploadedFiles/PAH\\_levels.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/PAH_levels.pdf). Consultada em: 03/03/2016.
- Fu, H., Katsumura, Y., Lin, M., Muroya, Y., Hata, K., Fujii, K., . . . Hatano, Y. (2009). Free radical scavenging and radioprotective effects of carnosine and anserine. *Radiation Physics and Chemistry*, *78*, 1192-1197.
- Furton, K., e Pentzke, G. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons. In T. Shibamoto (Ed.), *Chromatographic analysis of environmental and food toxicants* (pp. 1 - 30). Nova Iorque: Marcel Dekker.

- Galgano, F., Favati, F., Bonadio, M., Lorusso, V., e Romano, P. (2009). Role of biogenic amines as index of freshness in beef meat packed with different biopolymeric materials. *Food Research International*, 42, 1147-1152.
- García-Falcón, M. S., e Simal-Gándara, J. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from different woods and their transfer during traditional smoking into chorizo sausages with collagen and tripe casings. *Food Additives & Contaminants*, 22, 1-8.
- García-Maraver, A., Salvachúa, D., Martínez, M. J., Díaz, L. F., e Zamorano, M. (2013). Analysis of the relation between the cellulose, hemicellulose and lignin content and the thermal behavior of residual biomass from olive trees. *Waste Management*, 33, 2245-2249.
- García Falcon, M. S., Gonzalez Amigo, S., Lage Yusty, M. A., e Simal Lozano, J. (1999). Determination of benzo[a]pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL. *Food Additives & Contaminants*, 16, 9-14.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., . . . Suzzi, G. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 105-117.
- Gençcelep, H., Kaban, G., e Kaya, M. (2007). Effects of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in sucuk. *Meat Science*, 77, 424-430.
- Gibis, M., Kruwinnus, M., e Weiss, J. (2015). Impact of different pan-frying conditions on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality in fried bacon. *Food Chemistry*, 168, 383-389.
- Gil-Agustí, M., Esteve-Romero, J., e Carda-Broch, S. (2008). Anserine and carnosine determination in meat samples by pure micellar liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1189, 444-450.
- Girard, J. P. (1991). The smoking *Meat and meat products technology* (pp. 183-229). Saragoça, Espanha: Acribia.
- Giroto, J. M., Masson, M. L., e Haracemiv, S. M. C. (2010). Aminas biogênicas em embutidos cárneos e em outros alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13, 01-10.
- Gomaa, E. A., Gray, J. I., Rabie, S., Lopez-Bote, C., e Booren, A. M. (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. *Food Additives & Contaminants*, 10, 503-521.
- González-Fernández, C., Santos, E. M., Jaime, I., e Rovira, J. (2003). Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology*, 20, 275-284.
- González-Tenorio, R., Fonseca, B., Caro, I., Fernández-Diez, A., Kuri, V., Soto, S., e Mateo, J. (2013). Changes in biogenic amine levels during storage of Mexican-style soft and Spanish-style dry-ripened sausages with different  $a_w$  values under modified atmosphere. *Meat Science*, 94, 369-375.
- González de Llano, D., Cuesta, P., e Rodríguez, A. (1998). Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 270-274.

- Gorji, M. E. h., Ahmadkhaniha, R., Moazzen, M., Yunesian, M., Azari, A., e Rastkari, N. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Iranian Kebabs. *Food Control*, *60*, 57-63.
- Gou, P., Comaposada, J., Arnau, J., e Pakowski, Z. (2005). On-line determination of water activity at the lean surface of meat products during drying and its relationship with the crusting development. *Drying Technology*, *23*, 1641-1652.
- Goulas, A. E., e Kontominas, M. G. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, *93*, 511-520.
- GPP. (2014a). Inquérito aos agrupamentos gestores de produtos DOP/IGP/ETG - 2010/2011. Disponível em: [http://www.gpp.pt/estatistica/DOP\\_IGP\\_ETG\\_Inquerito\\_10-11.pdf](http://www.gpp.pt/estatistica/DOP_IGP_ETG_Inquerito_10-11.pdf). Consultada em: 10/07/2016.
- GPP. (2014b). Inquérito aos agrupamentos gestores de produtos DOP/IGP/ETG - 2012. Disponível em: [http://www.gpp.pt/estatistica/Relatorio\\_2012\\_DOP\\_IGP\\_ETG.pdf](http://www.gpp.pt/estatistica/Relatorio_2012_DOP_IGP_ETG.pdf). Consultada em: 10/07/2016.
- Grau, R., Andres, A., e Barat, J. (2015). Principles of drying. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. G. Sebranek & R. Talon (Eds.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2ª ed., pp. 31-38). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Guillén, M. D., Sopelana, P., e Partearroyo, M. A. (2000a). Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke flavourings. *Polycyclic Aromatic Compounds*, *21*, 215-229.
- Guillén, M. D., Sopelana, P., e Partearroyo, M. A. (2000b). Study of several aspects of a general method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavourings by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants*, *17*, 27-44.
- Guillén, M. D., Sopelana, P., e Parterroyo, M. A. (2000c). Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 5083-5087.
- Gunter, M. J., Probst-Hensch, N. M., Cortessis, V. K., Kulldorff, M., Haile, R. W., e Sinha, R. (2005). Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. *Carcinogenesis*, *26*, 637-642.
- Habermeyer, M., Roth, A., Guth, S., Diel, P., Engel, K.-H., Epe, B., . . . Eisenbrand, G. (2015). Nitrate and nitrite in the diet: How to assess their benefit and risk for human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, *59*, 106-128.
- Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., e Holzapfel, W. H. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, *5*, 42-49.
- Hanczakowska, E., Świątkiewicz, M., e Grela, E. R. (2015). Effect of dietary inclusion of a herbal extract mixture and different oils on pig performance and meat quality. *Meat Science*, *108*, 61-66.
- Heinz, G., e Hautzinger, P. (2007). *Meat processing technology for small to medium scale producers*. Banguocoque: Regional Office for Asia and the Pacific of the United Nations.

- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., e Vidal-Carou, M. C. (1997). Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2098-2102.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., e Vidal-Carou, M. C. (1996). Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 3097-3101.
- Hierro, E., Fernández, M., de la Hoz, L., e Ordonez, J. A. (2015). Mediterranean products. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. G. Sebranek & R. Talon (Eds.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2ª ed., pp. 301-312). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Hitzel, A., Pöhlmann, M., Schwägele, F., Speer, K., e Jira, W. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in meat products smoked with different types of wood and smoking spices. *Food Chemistry*, *139*, 955-962.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, *78*, 68-76.
- Hospital, X. F., Carballo, J., Fernández, M., Arnau, J., Gratacós, M., e Hierro, E. (2015). Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. *Food Control*, *57*, 275-281.
- Hugas, M. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, *88*, 223-233.
- Hutkins, R. W. (2006). Meat fermentation *Microbiology and technology of fermented foods* (pp. 207-232). Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- IARC. (2015). Press release nº 240 - IARC monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. Lyon, França: IARC.
- IARC. (2016). List of classifications. Disponível em: [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php). Consultada em: 2016/03/30.
- INE. (2004). Estatísticas Agrícolas 2003. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2005). Estatísticas Agrícolas 2004. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2006). Estatísticas Agrícolas 2005. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2007). Estatísticas Agrícolas 2006. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2008). Estatísticas Agrícolas 2007. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2009). Estatísticas Agrícolas 2008. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2010). Estatísticas Agrícolas 2009. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2011). Estatísticas Agrícolas 2010. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt).
- INE. (2012). Estatísticas Agrícolas 2011. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2013). Estatísticas Agrícolas 2012. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2014). Estatísticas Agrícolas 2013. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/05/08.
- INE. (2015). Estatísticas Agrícolas 2014. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Consultada em: 2015/09/11.
- ISO 2917 (1999). Meat and meat products - Measurement of pH (Reference method).

- Jayasena, D. D., Jung, S., Kim, S. H., Kim, H. J., Alahakoon, A. U., Lee, J. H., e Jo, C. (2015). Endogenous functional compounds in Korean native chicken meat are dependent on sex, thermal processing and meat cut. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*, 771-775.
- Jira, W. (2004). A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes. *European Food Research and Technology*, *218*, 208-212.
- Jira, W. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons in German smoked meat products. *European Food Research and Technology*, *230*, 447-455.
- Jira, W., Pöhlmann, M., Hitzel, A., e Schwägele, F. (2013). *Smoked meat products - innovative strategies for reduction of polycyclic aromatic hydrocarbons by optimisation of the smoking process*. Paper presented at the International 57th Meat Industry Conference, Belgrado, Sérvia.
- Joncquel-Chevalier Curt, M., Voicu, P.-M., Fontaine, M., Dessein, A.-F., Porchet, N., Mention-Mulliez, K., . . . Vamecq, J. (2015). Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie*, *119*, 146-165.
- Jung, K. H., Yan, B., Chillrud, S. N., Perera, F. P., Whyatt, R., Camann, D., . . . Miller, R. L. (2010). Assessment of benzo(a)pyrene-equivalent carcinogenicity and mutagenicity of residential indoor versus outdoor polycyclic aromatic hydrocarbons exposing young children in New York City. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *7*, 1889-1900.
- Jurado, A., Garcia, C., Timon, M. L., e Carrapiso, A. I. (2007). Effect of ripening time and rearing system on amino acid-related flavour compounds of Iberian ham. *Meat Science*, *75*, 585-594.
- Kai, S., Watanabe, G., Kubota, M., Kadowaki, M., e Fujimura, S. (2015). Effect of dietary histidine on contents of carnosine and anserine in muscles of broilers. *Animal Science Journal*, *86*, 541-546.
- Kalač, P. (2006). Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: a review. *Meat Science*, *73*, 1-11.
- Kalač, P. (2009). Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine*, *7*, 65-74.
- Kalač, P., e Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, *90*, 219-230.
- Kameník, J., Saláková, A., Bořilová, G., e Pavlík, Z. (2012). Effect of storage temperature on the quality of dry fermented sausage Poličan. *Czech Journal of Food Science*, *30*, 293-301.
- Karovičová, J., e Kohajdová, Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, *59*, 70-79.
- Kim, H. S., Kim, B. H., e Cho, Y. D. (1998). Purification and characterization of monomeric lysine decarboxylase from soybean (*Glycine max*) axes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *354*, 40-46.

- Kim, J.-H., Ahn, H.-J., Kim, D.-H., Jo, C., Yook, H.-S., Park, H.-J., e Byun, M.-W. (2003). Irradiation effects on biogenic amines in Korean fermented soybean paste during fermentation. *Journal of Food Science*, *68*, 80-84.
- Kim, J.-H., Ahn, H.-J., Lee, J.-W., Park, H.-J., Ryu, G.-H., Kang, I.-J., e Byun, M.-W. (2005). Effects of gamma irradiation on the biogenic amines in pepperoni with different packaging conditions. *Food Chemistry*, *89*, 199-205.
- Kligerman, A. D., Nelson, G. B., Ross, J. A., e Erexson, G. L. (2002). Effect of the route of administration on the induction of cytogenetic damage and DNA adducts in peripheral blood lymphocytes of rats and mice by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compounds*, *22*, 841-851.
- Komprda, T., Neznalová, J., Standara, S., e Bover-Cid, S. (2001). Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat Science*, *59*, 267-276.
- Komprda, T., Sladkova, P., e Dohnal, V. (2009). Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening. *Meat Science*, *83*, 534-542.
- Komprda, T., Smela, D., Pechova, P., Kalhotka, L., Stencl, J., e Klejdus, B. (2004). Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Science*, *67*, 607-616.
- Kopec, W., Wilczkiewicz, A., Jamroz, D., Biazik, E., Pudlo, A., Hikawczuk, T., . . . Korzeniowska, M. (2016). Antioxidant status of turkey breast meat and blood after feeding a diet enriched with histidine. *Poultry Science*, *95*, 53-61.
- Korhonen, H., e Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, *16*, 945-960.
- Koros, A., Hanczko, R., Jambor, A., Qian, Y., Perl, A., e Molnar-Perl, I. (2007). Analysis of amino acids and biogenic amines in biological tissues as their o-phthalaldehyde/ethanethiol/fluorenylmethyl chloroformate derivatives by high-performance liquid chromatography. A deproteinization study. *Journal of Chromatography A*, *1149*, 46-55.
- Korsh, J., Shen, A., Aliano, K., e Davenport, T. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer: a review of the literature. *Breast Care*, *10*, 316-318.
- Kostyra, E., e Barylko-Pikielna, N. (2006). Volatiles composition and flavour profile identity of smoke flavourings. *Food Quality and Preference*, *17*, 85-95.
- Koutros, S., Cross, A. J., Sandler, D. P., Hoppin, J. A., Ma, X., Zheng, T., . . . Sinha, R. (2008). Meat and meat mutagens and risk of prostate cancer in the agricultural health study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *17*, 80-87.
- Kumar, P., Chatli, M. K., Verma, A. K., Mehta, N., Malav, O. P., Kumar, D., e Sharma, N. (2015). Quality, functionality and shelf life of fermented meat and meat products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Aceite para publicação.

- Kuroda, M., e Harada, T. (2000). Incorporation of histidine and  $\beta$ -alanine into the macromolecular fraction of beef soup stock during heating. *Journal of Food Science*, *65*, 596-603.
- Kurt, S., e Zorba, O. (2009). The effects of ripening period, nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation of "sucuk" - A Turkish dry fermented sausage. *Meat Science*, *82*, 179-184.
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., e A. Alvarez, M. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, *6*, 145-156.
- Lafarga, T., e Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, *98*, 227-239.
- Lan, Q., Shen, M., Berndt, S. I., Bonner, M. R., He, X., Yeager, M., . . . Chanock, S. (2005). Smoky coal exposure, NBS1 polymorphisms, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer*, *49*, 317-323.
- Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Munoz, R., e de las Rivas, B. (2013). Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*, *95*, 272-280.
- Landete, J. M., Arena, M. E., Pardo, I., Manca de Nadra, M. C., e Ferrer, S. (2008). Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. *Food Microbiology*, *25*, 882-887.
- Laranjo, M., Agulheiro-Santos, A. C., Potes, M. E., Cabrita, M. J., Garcia, R., Fraqueza, M. J., e Elias, M. (2015). Effects of genotype, salt content and calibre on quality of traditional dryfermented sausages. *Food Control*, *56*, 119-127.
- Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A. C., Potes, M. E., Cabrita, M. J., e Garcia, R. (2016a). Characterisation of "Catalão" and "Salsichão" Portuguese traditional sausages with salt reduction. *Meat Science*, *116*, 34-42.
- Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A. C., Potes, M. E., Cabrita, M. J., Garcia, R., . . . Elias, M. (2016b). Impact of salt reduction on biogenic amines, fatty acids, microbiota, texture and sensory profile in traditional blood dry-cured sausages. *Food Chemistry*, *218*, 129-136.
- Laranjo, M., Gomes, A., Potes, M. E., Fernandes, M. J., Fraqueza, M. J., e Elias, M. (2016c). Development of a long-life vacuum-packaged ready-to-eat meat product based on a traditional Portuguese seasoned meat. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*, 1150-1158.
- Larqué, E., Sabater-Molina, M., e Zamora, S. (2007). Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, *23*, 87-95.
- Larrigaudière, C., Lentheric, I., Puy, J., e Pintó, E. (2004). Biochemical characterisation of core browning and brown heart disorders in pear by multivariate analysis. *Postharvest Biology and Technology*, *31*, 29-39.

- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Aymerich, T., Marcos, B., Vidal-Carou, M. C., e Garriga, M. (2007). Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science*, *75*, 460-469.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M. T., e Vidal-Carou, M. C. (2014). Amino acid availability as an influential factor on the biogenic amine formation in dry fermented sausages. *Food Control*, *36*, 76-81.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M. T., e Vidal-Carou, M. C. (2012). Control of biogenic amines in fermented sausages: role of starter cultures. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 169.
- Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, T., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., . . . Vidal-Carou, M. C. (2008). Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*, *107*, 912-921.
- Lawler, J. M., Barnes, W. S., Wu, G., Song, W., e Demaree, S. (2002). Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and biophysical research communications*, *290*, 47-52.
- Ledesma, E., Laca, A., Rendueles, M., e Díaz, M. (2016a). Texture, colour and optical characteristics of a meat product depending on smoking time and casing type. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 164-172.
- Ledesma, E., Rendueles, M., e Diaz, M. (2014). Benzo(a)pyrene penetration on a smoked meat product during smoking time. *Food Additives & Contaminants*, *31*, 1688-1698.
- Ledesma, E., Rendueles, M., e Díaz, M. (2015). Characterization of natural and synthetic casings and mechanism of BaP penetration in smoked meat products. *Food Control*, *51*, 195-205.
- Ledesma, E., Rendueles, M., e Díaz, M. (2016b). Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and prevention. *Food Control*, *60*, 64-87.
- Lee, G., e Lee, C. (2014). Safety aspects of alkaline-fermented foods. In P. Sarkar & J. Nout (Eds.), *Handbook of indigenous foods involving alkaline fermentation* (pp. 439-424). Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Leggio, A., Belsito, E. L., Marco, R. D., Di Gioia, M. L., Liguori, A., Siciliano, C., e Spinella, M. (2012). Dry fermented sausages of Southern Italy: a comparison of free amino acids and biogenic amines between industrial and homemade products. *Journal of Food Science*, *77*, S170-S175.
- Leroy, F., Verluyten, J., e De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *106*, 270-285.
- Li, G., Wu, S., Wang, L., e Akoh, C. C. (2016). Concentration, dietary exposure and health risk estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in youtiao, a Chinese traditional fried food. *Food Control*, *59*, 328-336.

- Li, J. L., Guo, Z. Y., Li, Y. J., Zhang, L., Gao, F., e Zhou, G. H. (2015). Effect of creatine monohydrate supplementation on carcass traits, meat quality and postmortem energy metabolism of finishing pigs. *Animal Production Science*, *56*, 48-54.
- Li, M., Tian, L., Zhao, G., Zhang, Q., Gao, X., Huang, X., e Sun, L. (2014). Formation of biogenic amines and growth of spoilage-related microorganisms in pork stored under different packaging conditions applying PCA. *Meat Science*, *96*, 843-848.
- Linares, V., Perelló, G., Nadal, M., Gómez-Catalán, J., Llobet, J. M., e Domingo, J. L. (2010). Environmental versus dietary exposure to POPs and metals: a probabilistic assessment of human health risks. *Journal of Environmental Monitoring*, *12*, 681-688.
- Lingbeck, J. M., Cordero, P., O'Bryan, C. A., Johnson, M. G., Ricke, S. C., e Crandall, P. G. (2014). Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Science*, *97*, 197-206.
- López, C. M., Bru, E., Vignolo, G. M., e Fadda, S. G. (2015). Identification of small peptides arising from hydrolysis of meat proteins in dry fermented sausages. *Meat Science*, *104*, 20-29.
- Lorenzo, J. M., García Fontán, M. C., Franco, I., e Carballo, J. (2008). Proteolytic and lipolytic modifications during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. *Food Chemistry*, *110*, 137-149.
- Lorenzo, J. M., Gómez, M., e Fonseca, S. (2014). Effect of commercial starter cultures on physicochemical characteristics, microbial counts and free fatty acid composition of dry-cured foal sausage. *Food Control*, *46*, 382-389.
- Lorenzo, J. M., Martínez, S., Franco, I., e Carballo, J. (2007). Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacon, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. *Meat Science*, *77*, 287-293.
- Lorenzo, J. M., Purrinos, L., Fontan, M. C., e Franco, D. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: "Androlla" and "Botillo". *Meat Science*, *86*, 660-664.
- Loureiro, S., Gata, L., Almeida, J., Lontro, R., Diogo, L., e Oliveira, G. (2010). Déficit cognitivo por defeito da síntese de creatina. *Acta Pediátrica Portuguesa*, *41*, 131-134.
- Lu, S., Xu, X., Zhou, G., Zhu, Z., Meng, Y., e Sun, Y. (2010). Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control*, *21*, 444-449.
- Luch, A. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced carcinogenesis - An introduction. In A. Luch (Ed.), *The carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons* (pp. 1-18). Londres, Reino Unido: Imperial College Press.
- Madhavan, N., e Naidu, K. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta, maternal blood, umbilical cord blood and milk of Indian women. *Human & Experimental Toxicology*, *14*, 503-506.
- Maga, J. A. (1988). *Smoke in food processing*. Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Mah, J.-H., e Hwang, H.-J. (2009). Effects of food additives on biogenic amine formation in Myeolchi-jeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*). *Food Chemistry*, *114*, 168-173.

- Maijala, R., Nurmi, E., e Fischer, A. (1995). Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Meat Science*, *39*, 9-22.
- Maikhunthod, B., e Intarapichet, K. O. (2005). Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. *Meat Science*, *71*, 364-374.
- Marco, A., Navarro, J. L., e Flores, M. (2008). The sensory quality of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents. *European Food Research and Technology*, *226*, 449-458.
- Marcobal, A., De las Rivas, B., Landete, J. M., Tabera, L., e Munoz, R. (2012). Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*, 448-467.
- Marcolini, E., Babini, E., Bordoni, A., Di Nunzio, M., Laghi, L., Macz , A., . . . Capozzi, F. (2015). Bioaccessibility of the bioactive peptide carnosine during in vitro digestion of cured beef meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 4973-4978.
- Martí-Cid, R., Llobet, J. M., Castell, V., e Domingo, J. L. (2008). Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain. *Food and Chemical Toxicology*, *46*, 3163-3171.
- Martín, A., Colón, B., Aranda, E., Benito, M. J., e Córdoba, M. G. (2007). Characterization of Micrococcaceae isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Science*, *75*, 696-708.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., e Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, *107*, 148-158.
- Martin, E. M., O'Bryan, C. A., Lary, R. Y., Jr., Griffis, C. L., Vaughn, K. L., Marcy, J. A., . . . Crandall, P. G. (2010). Spray application of liquid smoke to reduce or eliminate *Listeria monocytogenes* surface inoculated on frankfurters. *Meat Science*, *85*, 640-644.
- Martins, E. A., e Germano, P. M. L. (2008). Microbiological indicators for the assessment of performance in the hazard analysis and critical control points (HACCP) system in meat lasagna production. *Food Control*, *19*, 764-771.
- Martorell, I., Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J. M., e Domingo, J. L. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. *Environment International*, *36*, 424-432.
- Martuscelli, M., Pittia, P., Casamassima, L. M., Manetta, A. C., Lupieri, L., e Neri, L. (2009). Effect of intensity of smoking treatment on the free amino acids and biogenic amines occurrence in dry cured ham. *Food Chemistry*, *116*, 955-962.
- Maru i , N., Aristoy, M. C., e Toldrá, F. (2013). Nutritional pork meat compounds as affected by ham dry-curing. *Meat Science*, *93*, 53-60.
- Masson, F., Talon, R., e Montel, M. C. (1996). Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*, *32*, 199-207.

- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., e Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science*, *67*, 149-158.
- Mcgrath, T., Sharma, R., e Hajaligol, M. (2001). An experimental investigation into the formation of polycyclic-aromatic hydrocarbons (PAH) from pyrolysis of biomass materials. *Fuel*, *80*, 1787-1797.
- McGrath, T. E., Chan, W. G., e Hajaligol, R. M. (2003). Low temperature mechanism for the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from the pyrolysis of cellulose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *66*, 51-70.
- Meier, D. (2009). Additives: smoke flavorings. In F. Toldrá & L. Nollet (Eds.), *Handbook of processed meats and poultry analysis* (pp. 109-128). Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Melendez-Colon, V. J., Luch, A., Seidel, A., e Baird, W. M. (2000). Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of Bay and Fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures. *Chemical Research in Toxicology*, *13*, 10-17.
- Mietz, J. L., e Karmas, E. (1977). Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*, *42*, 155-158.
- Miguélez-Arrizado, M. J., Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M. L., e Vidal-Carou, M. C. (2006). Biogenic amines in Spanish fermented sausages as a function of diameter and artisanal or industrial origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*, 549-557.
- Min, J.-S., Lee, S.-O., Jang, A., Jo, C., e Lee, M. (2007). Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork. *Food Chemistry*, *104*, 791-799.
- Moinard, C., Cynober, L., e de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, *24*, 184-197.
- Molderings, G. J., e Haenisch, B. (2012). Agmatine (decarboxylated l-arginine): Physiological role and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics*, *133*, 351-365.
- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M., e Geenenc, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chemistry*, *59*, 539-545.
- Montazeri, N., Oliveira, A. C. M., Himelbloom, B. H., Leigh, M. B., e Crapo, C. A. (2013). Chemical characterization of commercial liquid smoke products. *Food Science & Nutrition*, *1*, 102-115.
- Monteiro, J. G., Goulão, M. H., Gouveia, A., e Silva, A. M. (1974). Cancro do estômago e hidrocarbonetos policíclicos alimentares. *Jornal das Ciências Médicas de Lisboa*, *139*, 793-815.
- Monteiro, J. G., Goulão, M. H., e Oliveira, M. G. d. (1983). Fumagem de alimentos e hidrocarbonetos policíclicos. *Coimbra Médica*, *4*, 81-83.
- Montel, M., Masson, F., e Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, *49*, S111-S123.

- Mora, L., Gallego, M., Escudero, E., Reig, M., Aristoy, M.-C., e Toldrá, F. (2015). Small peptides hydrolysis in dry-cured meats. *International Journal of Food Microbiology*, *212*, 9-15.
- Mora, L., Hernández-Cázares, A. S., Sentandreu, M. A., e Toldrá, F. (2010). Creatine and creatinine evolution during the processing of dry-cured ham. *Meat Science*, *84*, 384-389.
- Mora, L., Sentandreu, M., e Toldrá, F. (2007). Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4664-4669.
- Mora, L., Sentandreu, M., e Toldrá, F. (2008a). Effect of cooking conditions on creatinine formation in cooked ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 11279-11284.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Toldrá, F., e Bramley, P. M. (2009). Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 3228-3234.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., e Toldrá, F. (2008b). Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Science*, *79*, 709-715.
- Moret, S., e Conte, L. S. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *Journal of Chromatography A*, *882*, 245-253.
- Moret, S., Smela, D., Populin, T., e Conte, L. S. (2005). A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*, *89*, 355-361.
- Moroney, N. C., O'Grady, M. N., Robertson, R. C., Stanton, C., O'Doherty, J. V., e Kerry, J. P. (2015). Influence of level and duration of feeding polysaccharide (laminarin and fucoidan) extracts from brown seaweed (*Laminaria digitata*) on quality indices of fresh pork. *Meat Science*, *99*, 132-141.
- Morris, S. M. (2007). Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *The Journal of Nutrition*, *137*, 1602S-1609S.
- Moya, V. J., Flores, M., Aristoy, M. C., e Toldrá, F. (2001). Pork meat quality affects peptide and amino acid profiles during the ageing process. *Meat Science*, *58*, 197-206.
- Naeher, L. P., Brauer, M., Lipsett, M., Zelikoff, J. T., Simpson, C. D., Koenig, J. Q., e Smith, K. R. (2007). Woodsmoke health effects: a review. *Inhalation Toxicology*, *19*, 67-106.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., e Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food - Existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, *75*, R139-150.
- Nasrallah, F., Feki, M., e Kaabachi, N. (2010). Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. *Pediatric Neurology*, *42*, 163-171.
- Nisbet, I. C. T., e LaGoy, P. K. (1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *16*, 290-300.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Roig-Sagués, A. X., Trujillo-Mesa, A. J., e Vidal-Carou, M. C. (2004). Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*, *71*, 245-252.
- NP 1848 (1987). Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de azoto básico volátil total. Método das células de Conway.

- NP 3443 (1990). Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de azoto dos ácidos aminados livres.
- NP 3442 (1999). Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de azoto não proteico.
- Nuñez, M., del Olmo, A., e Calzada, J. (2016). Biogenic Amines *Encyclopedia of food and health* (pp. 416-423). Oxford, Reunio Unido: Academic Press.
- Oberg, E., Jones, F. D., Horton, H. L., e Ryffel, H. H. (2012). *Machinery's handbook* (29ª Edição ed.). Nova Iorque, E. U. A.: Industrial Press.
- Olesen, P., Meyer, A., e Stahnke, L. (2004). Generation of flavour compounds in fermented sausages - The influence of curing ingredients, Staphylococcus starter culture and ripening time. *Meat Science*, *66*, 675-687.
- Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, *103*, 1475-1486.
- Oostindjer, M., Alexander, J., Amdam, G. V., Andersen, G., Bryan, N. S., Chen, D., . . . Egelandsdal, B. (2014). The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Science*, *97*, 583-596.
- Ordoñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., e de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *39*, 329-367.
- Paiva-Martins, F., Barbosa, S., Pinheiro, V., Mourão, J. L., e Otor-Monteiro, D. (2009). The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. *Meat Science*, *82*, 438-443.
- Papavergou, E. J., Savvaidis, I. N., e Ambrosiadis, I. A. (2012). Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chemistry*, *135*, 2750-2755.
- Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M. a., e Suzzi, G. (2001). Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, *90*, 882-891.
- Park, Y. J., Volpe, S. L., e Decker, E. A. (2005). Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 4736-4739.
- Paulsen, P., e Bauer, F. (2007). Spermine and spermidine concentrations in pork loin as affected by storage, curing and thermal processing. *European Food Research and Technology*, *225*, 921-924.
- Pecanac, B., Djordjevic, J., Baltic, M. Z., Djordjevic, V., Nedic, D. N., Starcevic, M., . . . Baltic, T. (2015). Comparison of bacteriological status during ripening of traditional fermented sausages filled into different diameter artificial casings. *Procedia Food Science*, *5*, 223-226.
- Pegg, R., e Honikel, K. O. (2015). Principles of curing. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. G. Sebranek & R. Talon (Eds.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2ª ed., pp. 19-30). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.

- Pegg, R., e Shahidi, F. (2000). *Nitrite curing of meat*. Trumbull, Connecticut: Food & Nutrition Press.
- Peiretti, P. G., Medana, C., Visentin, S., Giacotti, V., Zunino, V., e Meineri, G. (2011). Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid reactive substances contents in meat from different animal species. *Food Chemistry*, *126*, 1939-1947.
- Peiretti, P. G., e Meineri, G. (2008). Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (*Salvia hispanica* L.) seed supplements. *Meat Science*, *80*, 1116-1121.
- Pereira, C. I., San Romão, M. V., Lolkema, J. S., e Barreto Crespo, M. T. (2009). Weissella halotolerans W22 combines arginine deiminase and ornithine decarboxylation pathways and converts arginine to putrescine. *Journal of Applied Microbiology*, *107*, 1894-1902.
- Pereira, H. (1988). Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L. *Wood Science and Technology*, *22*, 211-218.
- Pereira, P. M. d. C. C., e Vicente, A. F. d. R. B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, *93*, 586-592.
- Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J. M., e Domingo, J. L. (2009). Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, hexachlorobenzene and polycyclic aromatic hydrocarbons in various foodstuffs before and after cooking. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 709-715.
- Phillips, D. H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *443*, 139-147.
- Plaza-Bolaños, P., Frenich, A. G., e Vidal, J. L. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 6303-6326.
- Pöhlmann, M., Hitzel, A., Schwägele, F., Speer, K., e Jira, W. (2012). Contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in Frankfurter-type sausages depending on smoking conditions using glow smoke. *Meat Science*, *90*, 176-184.
- Pöhlmann, M., Hitzel, A., Schwägele, F., Speer, K., e Jira, W. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in smoked Frankfurter-type sausages depending on type of casing and fat content. *Food Control*, *1136-144*.
- Predrag, I. M., Tatjana, T. A., Ljiljana, P. S., Marija, J. R., Savatić, B., Snežana, S., . . . Branislav, Š. (2011). Effect of drying and ripening methods on proteolysis and biogenic amines formation in traditional dry-fermented sausage Petroská Klobása. *Food and Feed Research*, *38*, 1-8.
- Purchas, R., Rutherford, S., Pearce, P., Vather, R., e Wilkinson, B. (2004a). Cooking temperature effects on the forms of iron and levels of several other compounds in beef semitendinosus muscle. *Meat Science*, *68*, 201-207.

- Purchas, R. W., Rutherford, S. M., Pearce, P. D., Vather, R., e Wilkinson, B. H. P. (2004b). Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q<sub>10</sub>, and creatine. *Meat Science*, *66*, 629-637.
- Rabie, M. A., Peres, C., e Malcata, F. X. (2014). Evolution of amino acids and biogenic amines throughout storage in sausages made of horse, beef and turkey meats. *Meat Science*, *96*, 82-87.
- Rabie, M. A., Siliha, H., el-Saidy, S., el-Badawy, A.-A., e Malcata, F. X. (2010). Effects of  $\gamma$ -irradiation upon biogenic amine formation in Egyptian ripened sausages during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *11*, 661-665.
- Rae, C. D., e Bröer, S. (2015). Creatine as a booster for human brain function. How might it work? *Neurochemistry International*, *89*, 249-259.
- Rahman, U. u., Sahar, A., Khan, M. I., e Nadeem, M. (2014). Production of heterocyclic aromatic amines in meat: chemistry, health risks and inhibition. A review. *LWT - Food Science and Technology*, *59*, 229-233.
- Ramesh, A., Walker, S. A., Hood, D. B., Guillen, M. D., Schneider, K., e Weyand, E. H. (2004). Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Toxicology*, *23*, 301-333.
- Ranucci, D., Beghelli, D., Trabalza-Marinucci, M., Branciarri, R., Forte, C., Olivieri, O., . . . Acuti, G. (2015). Dietary effects of a mix derived from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood extract on pig performance, oxidative status and pork quality traits. *Meat Science*, *100*, 319-326.
- Rath, S., e Reyes, F. G. (2009). Nitrosamines. In L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of processed meats and poultry analysis* (pp. 687-705). Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Reig, M., Aristoy, M. C., e Toldrá, F. (2013). Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. *Food Chemistry*, *140*, 478-482.
- Reinik, M., Tamme, T., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T., e Kiis, A. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in meat products and estimated PAH intake by children and the general population in Estonia. *Food Additives & Contaminants*, *24*, 429-437.
- Rey-Salgueiro, L., García-Falcón, M. S., Martínez-Carballo, E., e Simal-Gándara, J. (2008). Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chemistry*, *108*, 607-615.
- Roda, A., Simoni, P., Ferri, E. N., Girotti, S., lus, A., Rauch, P., . . . Fukal, L. (1999). Determination of PAHs in various smoked meat products and different samples by enzyme immunoassay. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*, 58-62.
- Roncalés, P. (2015). Additives. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. G. Sebranek & R. Talon (Eds.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2<sup>a</sup> ed., pp. 69-78). Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Rose, M., Holland, J., Dowding, A., Petch, S., White, S., Fernandes, A., e Mortimer, D. (2015). Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the

- effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food and Chemical Toxicology*, *78*, 1-9.
- Roseiro, L. C., Gomes, A., Goncalves, H., Sol, M., Cercas, R., e Santos, C. (2010). Effect of processing on proteolysis and biogenic amines formation in a Portuguese traditional dry-fermented ripened sausage "Chouriço Grosso de Estremoz e Borba PGI". *Meat Science*, *84*, 172-179.
- Roseiro, L. C., Gomes, A., e Santos, C. (2011). Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food and Chemical Toxicology*, *49*, 1340-1345.
- Roseiro, L. C., Santos, C., Gonçalves, H., Moniz, C., Afonso, I., Tavares, M., e da Ponte, D. J. B. (2014a). Concentration of antioxidants in two muscles of mature dairy cows from Azores. *Meat Science*, *96*, 870-875.
- Roseiro, L. C., Santos, C., Gonçalves, H., Moniz, C., Afonso, I., Tavares, M., e da Ponte, D. J. B. (2014b). Concentration of antioxidants in two muscles of mature dairy cows from Azores. *Meat Science*, *96*, 870-875.
- Roseiro, L. C., Santos, C., Sol, M., Borges, M. J., Anjos, M., Goncalves, H., e Carvalho, A. S. (2008). Proteolysis in Painho de Portalegre dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. *Meat Science*, *79*, 784-794.
- Roseiro, L. C., Santos, C., Sol, M., Silva, L., e Fernandes, I. (2006). Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Science*, *74*, 557-563.
- Rozentāle, I., Stumpe-Vīksna, I., Začs, D., Siksnā, I., Melngaile, A., e Bartkevičs, V. (2015). Assessment of dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat products produced in Latvia. *Food Control*, *54*, 16-22.
- Rozum, J. J. (2009). Smoke flavour. In R. Tarté (Ed.), *Ingredients in meat products* (pp. 211-226). Nova Iorque, E. U. A.: Springer Science LLC.
- Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., e Jimenez Colmenero, F. (2007a). Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. *Meat Science*, *75*, 397-405.
- Ruiz-Capillas, C., e Jiménez-Colmenero, F. (2004a). Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *European Food Research and Technology*, *218*, 237-241.
- Ruiz-Capillas, C., e Jiménez-Colmenero, F. (2004b). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*, 489-599.
- Ruiz-Capillas, C., Jimenez Colmenero, F., Carrascosa, A. V., e Munoz, R. (2007b). Biogenic amine production in Spanish dry-cured "chorizo" sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*, *77*, 365-371.
- Ruiz-Ramirez, J., Serra, X., Arnau, J., e Gou, P. (2005). Profiles of water content, water activity and texture in crusted dry-cured loin and in non-crusted dry-cured loin. *Meat Science*, *69*, 519-525.

- Ruiz, J. (2007). Ingredients. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 59-76). Iowa, E. U. A.: Blackwell Publishing.
- Ruiz, J. (2015). Ingredients. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. G. Sebranek & R. Talon (Eds.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2<sup>a</sup> ed., pp. 59-76). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Sachse, C., Smith, G., Wilkie, M. J. V., Barrett, J. H., Waxman, R., Sullivan, F., . . . Group, t. C. C. S. (2002). A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, *23*, 1839-1850.
- Salavessa, J. J. (2009). *Salsicharia tradicional da zona do Pinhal - Caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia Animal. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Santos, C., Gomes, A., e Roseiro, L. C. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons incidence in Portuguese traditional smoked meat products. *Food and Chemical Toxicology*, *49*, 2343-2347.
- Santos, C., Roseiro, L. C., Gomes, A., Golçalves, H., Sol, M., e Partidário, A. (2012). Influence of curing salts and storage conditions in oroteolysis and lipid oxidation stability of a low acidity dry fermented sausage produced with DFD meat. *Journal of Food Processing & Technology*, *03*, 153.
- Santos, E. M., González-Fernández, C., Jaime, I., e Rovira, J. (1998). Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of 'chorizo'. *International Journal of Food Microbiology*, *39*, 123-128.
- Sanz, Y., Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M. C., Oliver, G., e Toldrá, F. (1999). Hydrolytic action of *Lactobacillus casei* CRL 705 on pork muscle sarcoplasmic and myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*.
- Scollan, N. D., Enser, M., Gulati, S. K., Richardson, I., e Wood, J. D. (2003). Effects of including a ruminally protected lipid supplement in the diet on the fatty acid composition of beef muscle. *British Journal of Nutrition*, *90*, 709-716.
- Sestili, P., Martinelli, C., Colombo, E., Barbieri, E., Potenza, L., Sartini, S., e Fimognari, C. (2011). Creatine as an antioxidant. *Amino Acids*, *40*, 1385-1396.
- Shalaby, A. R. (1993). Survey on biogenic amines in Egyptian foods: sausage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *62*, 291-293.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, *29*, 675-690.
- Sikorski, Z. E., e Kołakowski, E. (2010). Smoking. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of meat processing*. Iowa, E. U. A.: Blackwell Publishing.
- Sikorski, Z. E., e Sinkiewicz, I. (2015). Principles of smoking. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 39 - 46). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Silla Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, *29*, 213-231.

- Silla Santos, M. H. (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal of Food Microbiology*, *39*, 227-230.
- Simion, A., Vizireanu, C., Alexe, P., Franco, I., e Carballo, J. (2014). Effect of the use of selected starter cultures on some quality, safety and sensorial properties of Dacia sausage, a traditional Romanian dry-sausage variety. *Food Control*, *35*, 123-131.
- Šimko, P. (2002). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B*, *770*, 3-18.
- Šimko, P. (2005). Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings. *Molecular Nutrition & Food Research*, *49*, 637-647.
- Simko, P., Gergely, S., Karovicova, J., Drdak, M., e Knezo, J. (1993). Influence of cooking on benzo(a)pyrene content in smoked sausages. *Meat Science*, *34*, 301-309.
- Šimko, P., Šimon, P., e Belajová, E. (2004). Lowering of concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media by sorption into polyethylene terephthalate - a model study. *European Food Research and Technology*, *219*, 273-276.
- Šimko, P., Šimon, P., e Khunová, V. (1999). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from water by migration into polyethylene. *Food Chemistry*, *64*, 157-161.
- Šimko, P., Skláršova, B., Šimon, P., e Belajová, E. (2006). Effect of plastic packages on benzo[a]pyrene concentration in sunflower oil. *Czech Journal of Food Science*, *24*, 143-148.
- Šimko, P., Skláršová, B., Šimon, P., e Belajová, E. (2005). Decreased benzo(a)pyrene concentration in rapeseed oil packed in polyethylene terephthalate. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *107*, 187-192.
- Simon-Sarkadi, L., Pásztor-Huszár, K., Dalmadi, I., e Kiskó, G. (2012). Effect of high hydrostatic pressure processing on biogenic amine content of sausage during storage. *Food Research International*, *47*, 380-384.
- Simon, R., de la Calle, B., Palme, S., Meier, D., e Anklam, E. (2005). Composition and analysis of liquid smoke flavouring primary products. *Journal of Separation Science*, *28*, 871-882.
- Simon, R., Gómez-Ruiz, J. Á., e Wenzl, T. (2010). Results of an European inter-laboratory comparison study on the determination of the 15+1 EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in liquid smoke condensates. *Food Chemistry*, *123*, 819-826.
- Singh, L., Varshney, J. G., e Agarwal, T. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. *Food Chemistry*, *199*, 768-781.
- Sinha, R., Kulldorff, M., Gunter, M. J., Strickland, P., e Rothman, N. (2005). Dietary Benzo[a]pyrene intake and risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *14*, 2030-2034.
- Škaljac, S., Petrović, L., Tasić, T., Ikonić, P., Jakanović, M., Tomović, V., . . . Škrbić, B. (2014). Influence of smoking in traditional and industrial conditions on polycyclic aromatic

- hydrocarbons content in dry fermented sausages (Petrovská klobása) from Serbia. *Food Control*, *40*, 12-18.
- Skláršová, B., Šimko, P., Šimon, P., e Belajová, E. (2006). Diffusion and adsorption of BaP from vegetable oils onto polyethylene terephthalate and low density polyethylene package. *Journal of Food and Nutrition Research*, *45*, 12-16.
- Škrbić, B., Đurišić-Mladenović, N., Mačvanin, N., Tjapkin, A., e Škaljac, S. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked dry fermented sausages with protected designation of origin Petrovská klobása from Serbia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, *33*, 227-236.
- Slobodan, L., e Vesna, M.-s. (2011). Salt reduction in meat products – challenge for meat industry. *Technologija Mesa*, *52*, 22-30.
- Soldera, S., Sebastianutto, N., e Bortolomeazzi, R. (2008). Composition of phenolic compounds and antioxidant activity of commercial aqueous smoke flavorings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 2727-2734.
- Sousa, V., Cardoso, S., Miranda, I., e Pereira, H. (2009). *Caracterização da composição química da madeira de Quercus faginea*. Proceedings of the 6<sup>o</sup> Congresso Florestal Nacional, Ponta Delgada, Portugal.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., . . . Lolkema, J. S. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, *64 Suppl 3*, S95-100.
- Stadnik, J., e Dolatowski, Z. J. (2010). Biogenic amines in meat and fermented meat products. *ACTA Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, *9*, 251-263.
- Standarová, E., Borkovcová, I., e Vorlová, L. (2008). The occurrence of biogenic amines in dairy products on the Czech market. *ACTA Scientiarum Polonorum., Medicina Veterinaria*, *7*, 35-42.
- Stumpe-Vīksna, I., Bartkevičs, V., Kukāre, A., e Morozovs, A. (2008a). Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chemistry*, *110*, 794-797.
- Stumpe-Vīksna, I., Morozovs, A., Bartkevičs, V., e Kukāre, A. (2008b). Levels of benzo(a)pyrene (BaP) in fish, smoked according to different procedures. *LLu Raksti*, *21*, 24-29.
- Suzuki, Y. S., Ito, O. I., Mukai, N. M., Takahashi, H. T., e Takamatsu, K. T. (2002). High level of skeletal muscle carnosine contributes to the latter half of exercise performance during 30-s maximal cycle ergometer sprinting. *Japanese Journal of Physiology*, *52*, 199-205.
- Suzzi, G., e Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, *88*, 41-54.
- Szterk, A. (2015). Heterocyclic aromatic amines in grilled beef: the influence of free amino acids, nitrogenous bases, nucleosides, protein and glucose on HAAs content. *Journal of Food Composition and Analysis*, *40*, 39-46.

- Tabanelli, G., Montanari, C., Grazia, L., Lanciotti, R., e Gardini, F. (2013). Effects of  $a_w$  at packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. *Meat Science*, *94*, 177-186.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., e Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, *21*, 1199-1218.
- Tasić, T., Ikonić, P., Mandić, A., Jokanović, M., Tomović, V., Savatić, S., e Petrović, L. (2012). Biogenic amines content in traditional dry fermented sausage Petrovská klobása as possible indicator of good manufacturing practice. *Food Control*, *23*, 107-112.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., e Huis In t'Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, *11*, 73-84.
- Thomas, T., e Thomas, T. J. (2003). Polyamine metabolism and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *7*, 113-126.
- Tjapkin, A., e Sad, N. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked dry fermented sausages with protected designation of origin Petrovská klobása. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, *33*, 227-236.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science*, *49*, S101-S110.
- Toldrá, F. (2006a). Biochemical proteolysis basis for improved processing of dry-cured meats. In L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Advanced technologies for meat processing* (pp. 329-351). Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Toldrá, F. (2006b). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology*, *17*, 164-168.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., e Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International*, *33*, 181-185.
- Toldrá, F., e Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *38*, 331-352.
- Topinka, J., Schwarz, L. R., Kiefer, F., Wiebel, F. J., Gajdos, O., Vidová, P., . . . Wolff, T. (1998). DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract. *Mutation Research*, *419*, 91-105.
- Tóth, L., e Blaas, W. (1972). The effect of smoking technology on the content of carcinogenic hydrocarbons in smoked meat products. II. Effect of smoldering temperature of wood and cooling, washing and filtering of smoke. *Fleischwirtschaft*, *52*, 1419-1422.
- Treviño, E., Beil, D., e Steinhart, H. (1997). Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage. *Food Chemistry*, *60*, 521-526.
- Troy, D. J., e Kerry, J. P. (2010). Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Science*, *86*, 214-226.

- Underwood, G., e Shoop, J. (2007). Smoke flavourings. In H. Ziegler (Ed.), *Flavourings: production, composition, applications, regulations* (2ª ed., pp. 298-313). Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH.
- Urdiales, J. L., Medina, M. A., e Sánchez-Jiménez, F. (2001). Polyamine metabolism revisited. *European journal of gastroenterology & hepatology*, *13*, 1015-1019.
- US EPA. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Disponível em: <https://archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/pahs.pdf>. Consultada em: 2016/03/27.
- US EPA. (2014). Priority pollutant list. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>. Consultada em: 2016/05/30.
- USDA. (2016). National nutrient database for standard reference - Release 28 Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/index>. Consultada em: 2016/06/02.
- Varlet, V., Serot, T., Knockaert, C., Cornet, J., Cardinal, M., Monteau, F., . . . Prost, C. (2007). Organoleptic characterization and PAH content of salmon (*Salmo salar*) fillets smoked according to four industrial smoking techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *87*, 847-854.
- Vergès, M.-C. C., Zuñiga, M., Morel-Deville, F., Pérez-Martínez, G., Zagorec, M., e Ehrlich, S. D. (1999). Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiology Letters*, *180*, 297-304.
- Vidal-Carou, M. C., Izquierdo-Pulido, M. L., e Martín-Morro, M. C. (1990). Histamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage. *Food Chemistry*, *37*, 239-249.
- Vidal-Carou, M. C., Latorre-Moratalla, M. L., e Bover-Cid, S. (2009). Biogenic amines. In L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of processed meats and poultry analysis* (pp. 665-686). Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Vidal-Carou, M. C., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., e Bover-Cid, S. (2007). Biogenic amines: Risks and control. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 455-468). Iwoa, E. U. A.: Blackwel Publishing.
- Vidal-Carou, M. C., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., e Bover-Cid, S. (2015). Biogenic amines: Risks and control. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2ª ed., pp. 413-428). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Viegas, O., Novo, P., Pinto, E., Pinho, O., e Ferreira, I. M. (2012). Effect of charcoal types and grilling conditions on formation of heterocyclic aromatic amines (HAs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled muscle foods. *Food and Chemical Toxicology*, *50*, 2128-2134.
- Vignolo, G., Fontana, C., e Fadda, S. (2010). Semidry and dry fermented sausages. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Meat Processing* (pp. 379-398). Ames, Iowa, E. U. A.: Blackwell Publishing.

- Virgili, R., Saccani, G., Gabba, L., Tanzi, E., e Soresi Bordini, C. (2007). Changes of free amino acids and biogenic amines during extended ageing of Italian dry-cured ham. *LWT - Food Science and Technology*, *40*, 871-878.
- Vural, H., e Özvural, E. (2007). Fermented sausages from other meats. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry*. Ames, Iowa, E. U. A.: Blackwell Publishing.
- Walters, C. L. (1992). Reactions of nitrate and nitrite in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. *Food Additives & Contaminants*, *9*, 441-447.
- Wang, Y., Hui, T., Zhang, Y. W., Liu, B., Wang, F. L., Li, J. K., . . . Peng, Z. Q. (2015). Effects of frying conditions on the formation of heterocyclic amines and trans fatty acids in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Food Chemistry*, *167*, 251-257.
- Ward, M. H., Sinha, R., Heineman, E. F., Rothman, N., Markin, R., Weisenburger, D. D., . . . Zahm, S. H. (1997). Risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus with meat cooking method and doneness preference. *International Journal of Cancer*, *71*, 14-19.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., e Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*, *86*, 196-213.
- Wenzl, T., Simon, R., Anklam, E., e Kleiner, J. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, *25*, 716-725.
- Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., . . . Enser, M. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, *66*, 21-32.
- Wretling, S., Eriksson, A., Eskhult, G. A., e Larsson, B. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. *Journal of Food Composition and Analysis*, *23*, 264-272.
- Wu, Y. C., Chi, S. P., e Christiesans, S. (2015). Casings. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. G. Sebranek & R. Talon (Eds.), *Handbook of fermented meat and poultry* (2<sup>a</sup> ed., pp. 89-96). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Xue, W., e Warshawsky, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *206*, 73-93.
- Yabiku, H. Y., Martins, M. S., e Takahashi, M. Y. (1993). Levels of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and smoked foods. *Food Additives and Contaminants*, *10*, 399-405.
- Yarlett, N., Goldberg, B., Moharrami, M. A., e Bacchi, C. J. (1993). *Trichomonas vaginalis*: characterization of ornithine decarboxylase. *The Biochemical Journal*, *293*, 487-493.
- Yebrá-Pimentel, I., Fernández-González, R., Martínez-Carballo, E., e Simal-Gándara, J. (2015). A critical review about the health risk assessment of PAHs and their metabolites in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*, 1383-1405.
- Young, J. F., Therkildsen, M., Ekstrand, B., Che, B. N., Larsen, M. K., Oksbjerg, N., e Stagsted, J. (2013). Novel aspects of health promoting compounds in meat. *Meat Science*, *95*, 904-911.

- Yu, Z., Loehr, C. V., Fischer, K. A., Louderback, M. A., Krueger, S. K., Dashwood, R. H., . . . Williams, D. E. (2006). In utero exposure of mice to dibenzo[a,l]pyrene produces lymphoma in the offspring: Role of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Research*, *66*, 755-762.
- Yurchenko, S., e Mölder, U. (2005). The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. *Journal of Food Composition and Analysis*, *18*, 857-869.
- Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A., e Chizzolini, R. (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, *66*, 415-423.
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J., e Ahn, D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, *86*, 15-31.
- Zhang, Y., Ding, J., Shen, G., Zhong, J., Wang, C., Wei, S., . . . Tao, S. (2014). Dietary and inhalation exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary excretion of monohydroxy metabolites – A controlled case study in Beijing, China. *Environmental Pollution*, *184*, 515-522.
- Zhou, H., Wu, C., Meng, A., Zhang, Y., e Williams, P. T. (2014). Effect of interactions of biomass constituents on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) formation during fast pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *110*, 264-269.
- Zhou, H., Wu, C., Onwudili, J. A., Meng, A., Zhang, Y., e Williams, P. T. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) formation from the pyrolysis of different municipal solid waste fractions. *Waste Management*, *36*, 136-146.

## APÊNDICE

---

## Efeito do teor de gordura, tipo de tripa e regime de fumagem no teor em PAH

**Tabela A.1.** Influência dos factores principais: teor de gordura, tipo de tripa, regime de fumagem e respectivas interacções no teor em PAH quantificados no chouriço de carne.

	Factores			Interacções			
	<i>Gordura</i>	<i>Tripa</i>	<i>Fumagem</i>	<i>G x T</i>	<i>G x F</i>	<i>T x F</i>	<i>G x T x F</i>
<i>ACL</i>	ns	***	*	ns	*	***	ns
<i>NA</i>	***	***	**	*	**	**	***
<i>AC</i>	***	***	***	***	**	***	***
<i>FL</i>	***	***	**	**	ns	*	**
<i>PHE</i>	***	***	***	*	ns	ns	ns
<i>AN</i>	**	***	***	***	*	***	***
<i>FA</i>	**	***	ns	***	***	*	**
<i>PY</i>	***	***	**	***	**	ns	ns
<i>BaA</i>	***	ns	**	**	**	ns	ns
<i>CHR</i>	***	***	***	***	*	ns	ns
<i>BbFA</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>BkFA</i>	ns	***	***	***	***	**	***
<i>BaP</i>	ns	***	***	***	*	***	***
<i>DBahA</i>	*	***	***	***	***	***	**
<i>BghiP</i>	ns	***	*	ns	ns	ns	***
<i>IP</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>PAH leves</i>	*	***	***	*	**	***	**
<i>PAH pesados</i>	ns	***	***	***	***	***	***
<i>PAH4</i>	***	***	***	ns	*	ns	ns
<i>Total PAH</i>	*	***	***	*	**	***	**

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ns - não significativo.

G x T: Teor de gordura x Tipo de tripa, G x F: Teor de gordura x Tempo de armazenamento, T x F: Tipo de tripa x Tempo de armazenamento, G x T x F: Teor de gordura x Tipo de tripa x Tempo de armazenamento.

**Tabela A.2.** Influência dos factores principais: teor de gordura, tipo de tripa, tempo de armazenamento e respectivas interacções no teor de PAH quantificados no chouriço de carne.

	Factores			Interacções			
	<i>Gordura</i>	<i>Tripa</i>	<i>Armazenamento</i>	<i>G x T</i>	<i>G x A</i>	<i>T x A</i>	<i>G x T x A</i>
<i>ACL</i>	*	***	ns	***	ns	ns	ns
<i>NA</i>	***	***	ns	***	ns	*	ns
<i>AC</i>	***	***	***	***	ns	***	ns
<i>FL</i>	***	***	*	***	ns	ns	ns
<i>PHE</i>	ns	***	***	ns	*	***	ns
<i>AN</i>	ns	***	***	*	*	***	*
<i>FA</i>	ns	***	**	***	*	***	***
<i>PY</i>	ns	***	**	ns	*	ns	ns
<i>BaA</i>	***	**	***	ns	***	***	***
<i>CHR</i>	***	***	ns	***	***	ns	***
<i>BbFA</i>	***	**	ns	*	*	ns	ns
<i>BkFA</i>	***	***	***	***	**	ns	*
<i>BaP</i>	ns	***	***	***	ns	ns	ns
<i>DBahA</i>	***	***	***	***	ns	ns	***
<i>BghiP</i>	ns	***	***	*	ns	*	ns
<i>IP</i>	**	***	*	***	ns	ns	*
<i>PAH leves</i>	***	***	ns	***	ns	ns	ns
<i>PAH pesados</i>	ns	***	***	***	ns	ns	ns
<i>PAH4</i>	**	***	***	***	***	*	**
<i>Total PAH</i>	***	***	ns	***	ns	ns	ns

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ns - não significativo.

G x T: Gordura x Tripa, G x A: Gordura x Armazenamento, T x A: Tripa x Armazenamento, G x T x A: Gordura x Tripa x Armazenamento.

**Tabela A.3.** Teores médios de PAH na tripa do chouriço de carne no produto final e durante o armazenamento (resultados expressos em µg/kg, sob a forma média ± DP).

	20% Gordura					
	<i>T. Natural</i>			<i>T. Colagénio</i>		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
<i>ACL</i>	799,45 <sup>c,d</sup> ± 316,72	759,84 <sup>c,d</sup> ± 165,57	1009,24 <sup>d,e</sup> ± 280,90	251,31 <sup>a</sup> ± 244,58	461,35 <sup>a,b,c</sup> ± 198,91	419,51 <sup>a,b</sup> ± 148,99
<i>NA</i>	412,77 <sup>d</sup> ± 124,47	185,77 <sup>a,b</sup> ± 84,17	372,18 <sup>c,d</sup> ± 145,18	73,38 <sup>a</sup> ± 45,48	69,02 <sup>a</sup> ± 72,21	60,42 <sup>a</sup> ± 37,48
<i>AC</i>	588,18 <sup>e</sup> ± 172,75	235,46 <sup>c,d</sup> ± 84,17	304,25 <sup>d</sup> ± 80,82	132,16 <sup>a,b,c</sup> ± 59,11	52,24 <sup>a,b</sup> ± 42,46	60,61 <sup>a,b</sup> ± 27,49
<i>FL</i>	437,72 <sup>c</sup> ± 184,94	391,70 <sup>b,c</sup> ± 129,15	458,99 <sup>c</sup> ± 129,14	78,46 <sup>a</sup> ± 21,48	84,00 <sup>a</sup> ± 49,15	64,35 <sup>a</sup> ± 31,32
<i>PHE</i>	336,20 <sup>c</sup> ± 71,87	269,67 <sup>b,c</sup> ± 113,19	292,59 <sup>c</sup> ± 58,85	80,34 <sup>a</sup> ± 27,20	97,41 <sup>a</sup> ± 24,69	69,82 <sup>a</sup> ± 50,02
<i>AN</i>	45,62 <sup>b,c</sup> ± 9,41	53,87 <sup>b,c</sup> ± 24,49	60,52 <sup>c</sup> ± 13,33	9,67 <sup>a</sup> ± 3,45	12,75 <sup>a</sup> ± 6,82	12,61 <sup>a</sup> ± 6,31
<i>FA</i>	190,05 <sup>d</sup> ± 41,23	103,38 <sup>b,c</sup> ± 34,40	100,28 <sup>b,c</sup> ± 14,62	103,22 <sup>b,c</sup> ± 34,03	36,49 <sup>a</sup> ± 5,13	26,09 <sup>a</sup> ± 12,08
<i>PY</i>	180,25 <sup>f</sup> ± 35,50	81,63 <sup>c</sup> ± 27,17	80,25 <sup>c</sup> ± 13,89	113,82 <sup>d</sup> ± 33,68	28,60 <sup>a,b</sup> ± 6,14	19,92 <sup>a</sup> ± 10,58
<i>BaA</i>	51,99 <sup>g</sup> ± 14,80	21,43 <sup>c,d,e</sup> ± 12,62	23,30 <sup>d,e,f</sup> ± 3,93	26,20 <sup>e,f</sup> ± 9,71	10,21 <sup>a,b</sup> ± 3,73	6,57 <sup>a</sup> ± 2,85
<i>CHR</i>	56,85 <sup>g</sup> ± 16,44	42,55 <sup>e,f,g</sup> ± 23,74	44,87 <sup>f,g</sup> ± 6,73	28,21 <sup>b,c,d,e</sup> ± 9,66	18,87 <sup>a,b,c</sup> ± 7,14	11,35 <sup>a</sup> ± 4,56
<i>BbFA</i>	14,64 <sup>e</sup> ± 4,92	6,72 <sup>b,c,d</sup> ± 5,20	8,11 <sup>c,d</sup> ± 1,86	4,96 <sup>a,b,c</sup> ± 2,57	2,01 <sup>a</sup> ± 1,21	2,01 <sup>a</sup> ± 1,41
<i>BkFA</i>	3,57 <sup>i</sup> ± 0,99	1,38 <sup>c,d</sup> ± 1,00	1,63 <sup>c,d,e</sup> ± 0,40	0,91 <sup>b,c</sup> ± 0,23	0,08 <sup>a</sup> ± 0,02	0,19 <sup>a,b</sup> ± 0,05
<i>BaP</i>	15,48 <sup>f</sup> ± 4,88	5,51 <sup>b,c,d</sup> ± 3,66	6,06 <sup>c,d</sup> ± 1,39	6,46 <sup>d</sup> ± 2,77	3,93 <sup>a,b,c,d</sup> ± 2,73	1,79 <sup>a</sup> ± 0,61
<i>DBahA</i>	27,27 <sup>e</sup> ± 10,16	7,57 <sup>b,c</sup> ± 4,88	8,56 <sup>b,c,d</sup> ± 3,08	5,66 <sup>a,b</sup> ± 3,81	1,11 <sup>a</sup> ± 0,72	0,15 <sup>a</sup> ± 0,07
<i>BghiP</i>	3,18 <sup>a,b</sup> ± 0,54	8,21 <sup>c,d</sup> ± 7,10	10,34 <sup>d</sup> ± 4,53	1,03 <sup>a</sup> ± 1,20	1,03 <sup>a</sup> ± 0,12	1,40 <sup>a</sup> ± 1,74
<i>IP</i>	6,07 <sup>i</sup> ± 3,85	3,36 <sup>c,d,e</sup> ± 2,83	4,53 <sup>d,e,f</sup> ± 0,78	1,04 <sup>a,b</sup> ± 0,18	0,96 <sup>a,b</sup> ± 0,76	0,68 <sup>a</sup> ± 0,26
<i>PAH leves</i>	108,85 <sup>g</sup> ± 30,61	63,99 <sup>d,e,f</sup> ± 36,23	68,18 <sup>d,e,f</sup> ± 10,64	54,41 <sup>c,d,e</sup> ± 19,37	29,08 <sup>a,b</sup> ± 10,81	17,92 <sup>a</sup> ± 7,37
<i>PAH pesados</i>	70,21 <sup>e</sup> ± 24,33	32,76 <sup>b,c</sup> ± 22,8	39,22 <sup>c,d</sup> ± 6,94	20,06 <sup>a,b</sup> ± 12,06	9,12 <sup>a</sup> ± 0,56	6,23 <sup>a</sup> ± 4,69

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

**Tabela A.3.** (Continuação)

	40% Gordura					
	<i>T. Natural</i>			<i>T. Colagénio</i>		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
<i>ACL</i>	672,79 <sup>b,c,d</sup> ± 131,80	1317,73 <sup>e</sup> ± 769,69	898,41 <sup>d</sup> ± 288,82	329,91 <sup>a,b</sup> ± 37,87	406,53 <sup>a,b,c</sup> ± 139,20	302,62 <sup>a,b</sup> ± 73,70
<i>NA</i>	363,01 <sup>b,c,d</sup> ± 17,54	483,34 <sup>d</sup> ± 344,16	384,28 <sup>d</sup> ± 189,65	58,96 <sup>a</sup> ± 2,15	190,65 <sup>a,b,c</sup> ± 98,71	131,27 <sup>a</sup> ± 79,14
<i>AC</i>	522,51 <sup>e</sup> ± 13,09	363,50 <sup>d</sup> ± 215,18	360,21 <sup>d</sup> ± 160,66	160,69 <sup>b,c</sup> ± 24,42	15,98 <sup>a</sup> ± 28,92	20,11 <sup>a</sup> ± 36,49
<i>FL</i>	288,95 <sup>b</sup> ± 11,13	340,28 <sup>b,c</sup> ± 141,65	335,48 <sup>b,c</sup> ± 155,40	127,13 <sup>a</sup> ± 24,12	73,19 <sup>a</sup> ± 12,20	60,49 <sup>a</sup> ± 19,29
<i>PHE</i>	286,01 <sup>c</sup> ± 19,22	352,71 <sup>c</sup> ± 181,25	337,14 <sup>c</sup> ± 105,86	108,84 <sup>a</sup> ± 17,10	172,32 <sup>a,b</sup> ± 28,34	150,60 <sup>a</sup> ± 32,04
<i>AN</i>	38,41 <sup>b</sup> ± 2,83	53,58 <sup>b,c</sup> ± 24,57	48,46 <sup>b,c</sup> ± 10,28	13,47 <sup>a</sup> ± 2,82	14,28 <sup>a</sup> ± 3,14	12,05 <sup>a</sup> ± 3,54
<i>FA</i>	169,43 <sup>d</sup> ± 11,13	89,78 <sup>b</sup> ± 40,17	80,85 <sup>b</sup> ± 16,67	122,24 <sup>c</sup> ± 14,30	42,54 <sup>a</sup> ± 4,96	35,00 <sup>a</sup> ± 8,86
<i>PY</i>	156,71 <sup>e,f</sup> ± 10,69	67,03 <sup>c</sup> ± 36,51	55,70 <sup>b,c</sup> ± 15,96	137,53 <sup>d,e</sup> ± 13,47	29,22 <sup>a,b</sup> ± 4,84	23,34 <sup>a</sup> ± 5,40
<i>BaA</i>	45,76 <sup>g</sup> ± 2,98	16,86 <sup>b,c,d,e</sup> ± 7,89	14,04 <sup>a,b,c,d</sup> ± 2,09	32,35 <sup>f</sup> ± 2,95	12,30 <sup>a,b,c</sup> ± 3,93	7,70 <sup>a,b</sup> ± 2,42
<i>CHR</i>	39,34 <sup>d,e,f</sup> ± 2,72	35,93 <sup>d,e,f</sup> ± 15,56	33,08 <sup>c,d,e,f</sup> ± 9,55	39,21 <sup>d,e,f</sup> ± 1,85	27,11 <sup>b,c,d</sup> ± 8,43	17,35 <sup>a,b</sup> ± 3,29
<i>BbFA</i>	12,91 <sup>e</sup> ± 0,98	4,09 <sup>a,b</sup> ± 2,75	3,68 <sup>a,b</sup> ± 1,10	8,74 <sup>d</sup> ± 0,34	3,52 <sup>a,b</sup> ± 2,35	1,61 <sup>a</sup> ± 1,22
<i>BkFA</i>	2,33 <sup>e</sup> ± 0,60	0,59 <sup>a,b</sup> ± 0,15	0,13 <sup>a,b</sup> ± 0,03	1,69 <sup>d,e</sup> ± 0,12	0,28 <sup>a,b</sup> ± 0,06	ND
<i>BaP</i>	13,21 <sup>f</sup> ± 1,15	3,29 <sup>a,b,c</sup> ± 1,62	2,76 <sup>a,b</sup> ± 0,85	10,06 <sup>e</sup> ± 0,54	2,85 <sup>a,b</sup> ± 1,77	1,49 <sup>a</sup> ± 0,55
<i>DBahA</i>	11,88 <sup>c,d</sup> ± 2,90	4,21 <sup>a,b</sup> ± 1,18	0,40 <sup>a</sup> ± 0,17	13,45 <sup>d</sup> ± 4,89	1,16 <sup>a</sup> ± 0,34	0,36 <sup>a</sup> ± 0,02
<i>BghiP</i>	3,43 <sup>a,b</sup> ± 0,78	6,03 <sup>b,c</sup> ± 4,14	5,79 <sup>b,c</sup> ± 2,81	1,43 <sup>a</sup> ± 0,72	3,24 <sup>a,b</sup> ± 2,42	2,11 <sup>a,b</sup> ± 1,64
<i>IP</i>	4,86 <sup>e,f</sup> ± 0,88	2,68 <sup>a,b,c,d</sup> ± 1,52	2,34 <sup>a,b,c</sup> ± 1,34	3,02 <sup>b,c,d,e</sup> ± 0,31	1,52 <sup>a,b,c</sup> ± 0,95	1,07 <sup>a,b</sup> ± 0,32
<i>PAH leves</i>	85,10 <sup>f</sup> ± 5,62	52,78 <sup>c,d,e</sup> ± 73,10	47,12 <sup>b,c,d</sup> ± 10,86	71,56 <sup>e,f</sup> ± 4,29	39,41 <sup>a,b,c</sup> ± 12,14	25,05 <sup>a,b</sup> ± 4,82
<i>PAH pesados</i>	48,63 <sup>d</sup> ± 6,12	20,89 <sup>a,b</sup> ± 11,75	15,10 <sup>a</sup> ± 5,67	38,39 <sup>c,d</sup> ± 6,82	12,58 <sup>a</sup> ± 6,48	6,65 <sup>a</sup> ± 4,06

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

**Tabela A.4.** Teores médios em PAH no interior do chouriço de carne no produto final e durante o armazenamento (resultados expressos em µg/kg, sob a forma média ± DP).

	20% Gordura					
	<i>T. Natural</i>			<i>T. Colagénio</i>		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
<i>ACL</i>	213,40 <sup>c,d</sup> ± 57,91	178,09 <sup>c,d</sup> ± 26,87	165,76 <sup>b,c</sup> ± 68,93	88,21 <sup>a,b</sup> ± 60,76	94,49 <sup>a,b</sup> ± 45,65	99,23 <sup>a,b</sup> ± 29,02
<i>NA</i>	89,96 <sup>b</sup> ± 16,41	58,46 <sup>a,b</sup> ± 14,00	40,03 <sup>a,b</sup> ± 24,34	24,37 <sup>a</sup> ± 6,53	37,05 <sup>a,b</sup> ± 20,87	34,08 <sup>a</sup> ± 13,89
<i>AC</i>	51,01 <sup>d,e</sup> ± 6,23	38,90 <sup>c,d</sup> ± 7,45	32,48 <sup>b,c,d</sup> ± 14,04	17,04 <sup>a,b</sup> ± 3,43	25,40 <sup>a,b,c</sup> ± 24,11	26,14 <sup>a,b,c</sup> ± 24,20
<i>FL</i>	64,11 <sup>c,d</sup> ± 7,38	59,28 <sup>c</sup> ± 15,09	45,86 <sup>b,c</sup> ± 15,42	12,78 <sup>a</sup> ± 3,43	22,10 <sup>a</sup> ± 9,06	19,60 <sup>a</sup> ± 5,72
<i>PHE</i>	24,82 <sup>e</sup> ± 1,76	49,60 <sup>g</sup> ± 6,71	38,70 <sup>f</sup> ± 12,42	8,48 <sup>a,b</sup> ± 1,22	14,02 <sup>a,b,c</sup> ± 1,97	15,12 <sup>b,c</sup> ± 2,06
<i>AN</i>	2,98 <sup>a,b</sup> ± 0,43	10,24 <sup>d</sup> ± 1,49	7,25 <sup>c</sup> ± 3,06	0,76 <sup>a</sup> ± 0,14	2,81 <sup>a,b</sup> ± 0,46	2,86 <sup>a,b</sup> ± 0,42
<i>FA</i>	8,30 <sup>b,c</sup> ± 0,87	11,85 <sup>d</sup> ± 1,20	11,32 <sup>d</sup> ± 2,79	2,58 <sup>a</sup> ± 0,11	3,03 <sup>a</sup> ± 0,70	3,41 <sup>a</sup> ± 0,88
<i>PY</i>	9,85 <sup>b,c</sup> ± 0,85	9,33 <sup>b,c</sup> ± 0,63	9,70 <sup>b,c</sup> ± 2,32	2,79 <sup>a</sup> ± 0,23	2,62 <sup>a</sup> ± 0,67	2,91 <sup>a</sup> ± 0,66
<i>BaA</i>	1,20 <sup>d</sup> ± 0,09	1,06 <sup>c,d</sup> ± 0,54	0,89 <sup>b,c,d</sup> ± 0,43	2,86 <sup>e</sup> ± 0,38	ND	0,18 <sup>a,b</sup> ± 0,02
<i>CHR</i>	3,25 <sup>d,e</sup> ± 0,23	2,32 <sup>c,d</sup> ± 0,69	4,13 <sup>e</sup> ± 1,86	0,20 <sup>a</sup> ± 0,01	0,20 <sup>a</sup> ± 0,01	0,28 <sup>a</sup> ± 0,02
<i>BbFA</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>BkFA</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>BaP</i>	ND	0,16 <sup>b,c</sup> ± 0,06	0,09 <sup>a,b,c</sup> ± 0,03	ND	ND	ND
<i>IP</i>	ND	0,18 <sup>b</sup> ± 0,08	0,15 <sup>b</sup> ± 0,05	ND	ND	ND
<i>PAH leves</i> <sup>1</sup>	4,45 <sup>e,f</sup> ± 0,23	3,38 <sup>d,e</sup> ± 0,73	5,02 <sup>f,g</sup> ± 1,52	3,06 <sup>d</sup> ± 0,38	0,38 <sup>c</sup> ± 0,19	0,24 <sup>a,b,c</sup> ± 0,10
<i>PAH pesados</i> <sup>2</sup>	0,05 <sup>a,b</sup> ± 0,01	0,38 <sup>c</sup> ± 0,09	0,24 <sup>a,b,c</sup> ± 0,06	ND	ND	ND

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

<sup>1</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

<sup>2</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBaA, BghiP e IP.

**Tabela A.4.** (Continuação)

	40% Gordura					
	<i>T. Natural</i>			<i>T. Colagénio</i>		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
<i>ACL</i>	672,79 <sup>b,c,d</sup> ± 131,80	1317,73 <sup>e</sup> ± 769,69	898,41 <sup>d</sup> ± 288,82	329,91 <sup>a,b</sup> ± 37,87	406,53 <sup>a,b,c</sup> ± 139,20	302,62 <sup>a,b</sup> ± 73,70
<i>NA</i>	363,01 <sup>b,c,d</sup> ± 17,54	483,34 <sup>d</sup> ± 344,16	384,28 <sup>d</sup> ± 189,65	58,96 <sup>a</sup> ± 2,15	190,65 <sup>a,b,c</sup> ± 98,71	131,27 <sup>a</sup> ± 79,14
<i>AC</i>	522,51 <sup>e</sup> ± 13,09	363,50 <sup>d</sup> ± 215,18	360,21 <sup>d</sup> ± 160,66	160,69 <sup>b,c</sup> ± 24,42	15,98 <sup>a</sup> ± 28,92	20,11 <sup>a</sup> ± 36,49
<i>FL</i>	288,95 <sup>b</sup> ± 11,13	340,28 <sup>b,c</sup> ± 141,65	335,48 <sup>b,c</sup> ± 155,40	127,13 <sup>a</sup> ± 24,12	73,19 <sup>a</sup> ± 12,20	60,49 <sup>a</sup> ± 19,29
<i>PHE</i>	286,01 <sup>c</sup> ± 19,22	352,71 <sup>c</sup> ± 181,25	337,14 <sup>c</sup> ± 105,86	108,84 <sup>a</sup> ± 17,10	172,32 <sup>a,b</sup> ± 28,34	150,60 <sup>a</sup> ± 32,04
<i>AN</i>	38,41 <sup>b</sup> ± 2,83	53,58 <sup>b,c</sup> ± 24,57	48,46 <sup>b,c</sup> ± 10,28	13,47 <sup>a</sup> ± 2,82	14,28 <sup>a</sup> ± 3,14	12,05 <sup>a</sup> ± 3,54
<i>FA</i>	169,43 <sup>d</sup> ± 11,13	89,78 <sup>b</sup> ± 40,17	80,85 <sup>b</sup> ± 16,67	122,24 <sup>c</sup> ± 14,30	42,54 <sup>a</sup> ± 4,96	35,00 <sup>a</sup> ± 8,86
<i>PY</i>	156,71 <sup>e,f</sup> ± 10,69	67,03 <sup>c</sup> ± 36,51	55,70 <sup>b,c</sup> ± 15,96	137,53 <sup>d,e</sup> ± 13,47	29,22 <sup>a,b</sup> ± 4,84	23,34 <sup>a</sup> ± 5,40
<i>BaA</i>	45,76 <sup>g</sup> ± 2,98	16,86 <sup>b,c,d,e</sup> ± 7,89	14,04 <sup>a,b,c,d</sup> ± 2,09	32,35 <sup>f</sup> ± 2,95	12,30 <sup>a,b,c</sup> ± 3,93	7,70 <sup>a,b</sup> ± 2,42
<i>CHR</i>	39,34 <sup>d,e,f</sup> ± 2,72	35,93 <sup>d,e,f</sup> ± 15,56	33,08 <sup>c,d,e,f</sup> ± 9,55	39,21 <sup>d,e,f</sup> ± 1,85	27,11 <sup>b,c,d</sup> ± 8,43	17,35 <sup>a,b</sup> ± 3,29
<i>BbFA</i>	12,91 <sup>e</sup> ± 0,98	4,09 <sup>a,b</sup> ± 2,75	3,68 <sup>a,b</sup> ± 1,10	8,74 <sup>d</sup> ± 0,34	3,52 <sup>a,b</sup> ± 2,35	1,61 <sup>a</sup> ± 1,22
<i>BkFA</i>	2,33 <sup>e</sup> ± 0,60	0,59 <sup>a,b</sup> ± 0,15	0,13 <sup>a,b</sup> ± 0,03	1,69 <sup>d,e</sup> ± 0,12	0,28 <sup>a,b</sup> ± 0,01	ND
<i>BaP</i>	13,21 <sup>f</sup> ± 1,15	3,29 <sup>a,b,c</sup> ± 1,62	2,76 <sup>a,b</sup> ± 0,85	10,06 <sup>e</sup> ± 0,54	2,85 <sup>a,b</sup> ± 1,77	1,49 <sup>a</sup> ± 0,55
<i>DBahA</i>	11,88 <sup>c,d</sup> ± 2,90	4,21 <sup>a,b</sup> ± 1,68	0,40 <sup>a</sup> ± 0,07	13,45 <sup>d</sup> ± 4,89	1,16 <sup>a</sup> ± 0,54	0,36 <sup>a</sup> ± 0,19
<i>BghiP</i>	3,43 <sup>a,b</sup> ± 0,78	6,03 <sup>b,c</sup> ± 4,14	5,79 <sup>b,c</sup> ± 2,81	1,43 <sup>a</sup> ± 0,72	3,24 <sup>a,b</sup> ± 2,42	2,11 <sup>a,b</sup> ± 1,64
<i>IP</i>	4,86 <sup>e,f</sup> ± 0,88	2,68 <sup>a,b,c,d</sup> ± 1,52	2,34 <sup>a,b,c</sup> ± 1,34	3,02 <sup>b,c,d,e</sup> ± 0,31	1,52 <sup>a,b,c</sup> ± 0,95	1,07 <sup>a,b</sup> ± 0,32
<i>PAH leves</i> <sup>1</sup>	7,48 <sup>h</sup> ± 1,28	2,63 <sup>c,d</sup> ± 1,78	1,71 <sup>b,c</sup> ± 1,16	6,23 <sup>g,h</sup> ± 1,27	0,66 <sup>a,b</sup> ± 0,36	1,03 <sup>a,b</sup> ± 0,43
<i>PAH pesados</i> <sup>2</sup>	ND	0,37 <sup>c</sup> ± 0,19	0,32 <sup>c</sup> ± 0,1	ND	0,31 <sup>b,c</sup> ± 0,16	0,37 <sup>c</sup> ± 0,14

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

<sup>1</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

<sup>2</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBahA, BghiP e IP.

**Tabela A.5.** Coeficientes da correlação de Pearson para os PAH estudados na água e no material da embalagem.

	<b>Coeficiente de correlação</b>
AN	-0,72
FA	-0,83
PY	-0,82
BaA	-0,91
CHR	-0,92
BbFA	-0,90
BkFA	-0,91
BaP	-0,92
DBahA	-0,69
BghiP	-0,72
IP	-0,89

A vermelho são destacados os coeficientes significativos ( $p < 0,001$ ).

## Avaliação do perfil de PAH em condensados de fumo gerados através da combustão de diferentes madeiras e estudo do efeito da utilização de aromas de fumo em chouriço de carne

**Tabela A.6.** Efeito dos factores principais e respectiva interacção no teor dos 10 PAH estudados nos condensados de fumo.

	Factores		Interacção
	<i>Madeira</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Madeira x Temperatura</i>
<i>FA</i>	***	***	***
<i>PY</i>	***	***	***
<i>BaA</i>	***	***	***
<i>CHR</i>	***	***	***
<i>BbFA</i>	***	***	***
<i>BkFA</i>	***	***	***
<i>BaP</i>	***	***	***
<i>DBahA</i>	***	***	***
<i>BghiP</i>	***	***	***
<i>IP</i>	***	***	***
<i>4 PAH leves<sup>1</sup></i>	***	***	***
<i>PAH pesados<sup>2</sup></i>	***	***	***
<i>PAH<sub>4</sub><sup>3</sup></i>	***	***	***
<i>Total 10 PAH</i>	***	***	***

\*\*\*  $p < 0,001$ .

<sup>1</sup> O teor em PAH leves corresponde ao conjunto dos teores individuais de FA, PY, BaA e CHR.

<sup>2</sup> O teor em PAH pesados corresponde ao conjunto dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, DBahA, BghiP e IP.

<sup>3</sup> O teor em PAH<sub>4</sub> corresponde ao conjunto dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

**Tabela A.7.** Influência do lote, da substituição do regime de fumagem tradicional pela secagem em câmara e utilização de aroma de fumo líquido (processamento), bem como o tempo de armazenamento no teor em PAH.

	Factores			Interacções			
	Lote	Processamento	Armazenamento	L x P	L x A	P x A	L x P x A
<i>ACL</i>	ns	ns	***	ns	**	***	ns
<i>NA</i>	***	**	***	***	ns	***	ns
<i>AC</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>FL</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>PHE</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>AN</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>FA</i>	***	***	***	***	***	***	ns
<i>PY</i>	*	***	ns	**	ns	**	ns
<i>BaA</i>	***	***	**	***	ns	***	*
<i>CHR</i>	***	***	**	***	ns	***	***
<i>BbFA</i>	***	***	**	***	***	***	***
<i>BkFA</i>	***	***	***	***	**	***	**
<i>BaP</i>	***	***	**	***	*	**	*
<i>IP</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>PAH leves</i> <sup>1</sup>	***	ns	***	***	ns	***	*
<i>PAH pesados</i> <sup>2</sup>	***	***	***	***	***	***	***
<i>PAH</i> <sup>3</sup>	**	***	***	***	ns	***	ns
<i>Total PAH</i>	***	ns	***	***	ns	***	*

ns – não significativo, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

L x P: Lote x Processamento, L x T: Lote x Armazenamento, P x T: Processamento x Armazenamento, L x P x T: Lote x Processamento x Armazenamento.

<sup>1</sup> O teor de PAH leves corresponde ao conjunto dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

<sup>2</sup> O teor em PAH pesados corresponde ao conjunto dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, e IP.

<sup>3</sup> O teor em PAH4 corresponde ao conjunto dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

**Tabela A.8.** Evolução do teor em PAH na tripa (em µg/kg, sob a forma média ± DP) ao longo do tempo de armazenamento.

	Lote A (Aspersão)					
	Controlo			AFL		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
ACL	2628,17 <sup>d</sup> ± 739,83	1266,77 <sup>c</sup> ± 90,84	536,90 <sup>a,b</sup> ± 150,45	797,04 <sup>a,b</sup> ± 55,64	715,45 <sup>a,b</sup> ± 52,07	959,07 <sup>a,b</sup> ± 84,70
NA	6713,55 <sup>d</sup> ± 1865,36	2764,23 <sup>c</sup> ± 134,97	1053,61 <sup>a</sup> ± 336,09	1278,92 <sup>a</sup> ± 85,50	1261,09 <sup>a</sup> ± 24,57	1703,79 <sup>a,b</sup> ± 254,69
AC	174,20 <sup>a,b</sup> ± 59,78	127,86 <sup>a,b</sup> ± 16,78	128,56 <sup>a,b</sup> ± 63,89	ND	ND	ND
FA	221,90 <sup>a,b</sup> ± 39,83	249,88 <sup>a,b,c</sup> ± 12,43	130,16 <sup>a,b</sup> ± 49,48	24,05 <sup>a</sup> ± 27,83	69,21 <sup>a,b</sup> ± 9,87	81,12 <sup>a,b</sup> ± 8,24
PHE	330,97 <sup>c,d</sup> ± 85,65	138,30 <sup>a,b,c</sup> ± 8,85	125,83 <sup>a,b,c</sup> ± 64,27	30,48 <sup>a</sup> ± 1,09	26,43 <sup>a</sup> ± 0,34	25,13 <sup>a</sup> ± 2,93
AN	29,80 <sup>a,b,c</sup> ± 7,84	22,74 <sup>a,b,c</sup> ± 2,01	31,80 <sup>a,b</sup> ± 8,25	4,20 <sup>a</sup> ± 0,65	4,53 <sup>a,b</sup> ± 0,12	3,30 <sup>a</sup> ± 0,48
FA	91,60 <sup>a</sup> ± 26,28	82,67 <sup>a</sup> ± 17,26	87,89 <sup>a</sup> ± 15,38	35,26 <sup>a</sup> ± 4,20	18,22 <sup>a</sup> ± 4,43	14,72 <sup>a</sup> ± 0,94
PY	61,10 <sup>a</sup> ± 16,46	36,40 <sup>a</sup> ± 5,28	43,41 <sup>a</sup> ± 8,62	10,03 <sup>a</sup> ± 3,04	7,47 <sup>a</sup> ± 0,78	6,27 <sup>a</sup> ± 0,49
BaA	14,73 <sup>a</sup> ± 2,68	10,08 <sup>a</sup> ± 2,88	7,29 <sup>a</sup> ± 1,54	2,00 <sup>a</sup> ± 0,20	3,08 <sup>a</sup> ± 1,25	2,03 <sup>a</sup> ± 0,27
CHR	21,17 <sup>a</sup> ± 5,20	12,19 <sup>a</sup> ± 2,82	9,19 <sup>a</sup> ± 0,79	0,57 <sup>a</sup> ± 0,19	0,51 <sup>a</sup> ± 0,01	0,64 <sup>a</sup> ± 0,18
BbFA	5,13 <sup>a</sup> ± 0,25	ND	ND	ND	ND	ND
BkFA	1,18 <sup>a,b</sup> ± 0,07	ND	ND	ND	ND	ND
BaP	4,66 <sup>a</sup> ± 0,22	3,64 <sup>a</sup> ± 1,18	1,98 <sup>a</sup> ± 0,30	ND	ND	ND
DBahA	6,41 <sup>b,c</sup> ± 0,66	3,21 <sup>a,b</sup> ± 2,35	1,80 <sup>a,b</sup> ± 2,08	ND	ND	ND
BghiP	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IP	1,93 <sup>a</sup> ± 0,14	ND	ND	ND	ND	ND
PAH leves <sup>1</sup>	10287,19 <sup>d</sup> ± 2722,33	4711,11 <sup>b,c</sup> ± 168,34	2154,64 <sup>a</sup> ± 591,35	2182,55 <sup>a</sup> ± 117,26	2105,99 <sup>a</sup> ± 24,40	2796,06 <sup>a,b,c</sup> ± 351,11
PAH pesados <sup>2</sup>	19,31 <sup>a</sup> ± 0,37	6,86 <sup>a</sup> ± 2,45	3,79 <sup>a</sup> ± 2,38	ND	ND	ND
PAH4 <sup>3</sup>	45,70 <sup>b</sup> ± 8,29	25,91 <sup>a</sup> ± 6,87	18,47 <sup>a</sup> ± 2,58	2,57 <sup>a</sup> ± 0,38	3,58 <sup>a</sup> ± 1,24	2,66 <sup>a</sup> ± 0,19
Total PAH	10306,50 <sup>d</sup> ± 2722,64	4717,97 <sup>b,c</sup> ± 167,84	2158,43 <sup>a</sup> ± 589,05	2182,55 <sup>a,b</sup> ± 117,26	2105,99 <sup>a</sup> ± 24,40	2796,06 <sup>a,b,c</sup> ± 351,11

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

<sup>1</sup> O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

<sup>2</sup> O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, e IP.

<sup>3</sup> O teor em PAH4 foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

Tabela A.8. (Continuação)

	Lote B (Incorporação)					
	Controlo			AFL		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
ACL	1325,80 <sup>a,b</sup> ± 307,71	372,88 <sup>a</sup> ± 109,34	1175,84 <sup>a,b</sup> ± 515,16	737,59 <sup>a,b</sup> ± 124,70	558,73 <sup>a,b</sup> ± 87,83	726,59 <sup>a,b</sup> ± 88,53
NA	1687,29 <sup>a,b</sup> ± 215,45	1462,67 <sup>a,b</sup> ± 112,59	590,56 <sup>a</sup> ± 195,72	974,12 <sup>a</sup> ± 49,52	1021,78 <sup>a</sup> ± 10,56	404,06 <sup>a</sup> ± 6,80
AC	535,63 <sup>c</sup> ± 89,66	273,94 <sup>b,c</sup> ± 150,31	452,66 <sup>b,c</sup> ± 168,42	231,25 <sup>a,b</sup> ± 50,84	201,08 <sup>a,b</sup> ± 36,73	187,15 <sup>a,b</sup> ± 8,30
FA	672,19 <sup>d</sup> ± 88,86	523,87 <sup>c,d</sup> ± 281,44	419,75 <sup>b,c</sup> ± 163,69	150,40 <sup>a,b</sup> ± 14,28	97,99 <sup>a,b</sup> ± 5,49	31,41 <sup>a,b</sup> ± 4,60
PHE	517,24 <sup>d</sup> ± 149,50	276,66 <sup>a,b,c</sup> ± 130,60	318,71 <sup>a,b,c</sup> ± 125,08	49,49 <sup>a,b</sup> ± 11,27	42,33 <sup>a</sup> ± 11,31	45,65 <sup>a,b</sup> ± 2,13
AN	120,46 <sup>d</sup> ± 40,32	65,74 <sup>c,d</sup> ± 31,57	81,33 <sup>c,d</sup> ± 32,33	9,69 <sup>a,b</sup> ± 2,20	8,18 <sup>a,b</sup> ± 1,48	6,70 <sup>a,b</sup> ± 0,46
FA	316,80 <sup>b</sup> ± 124,69	134,77 <sup>a</sup> ± 34,43	142,74 <sup>a</sup> ± 55,34	19,38 <sup>a</sup> ± 4,31	18,21 <sup>a</sup> ± 0,87	13,79 <sup>a</sup> ± 2,13
PY	198,46 <sup>b</sup> ± 79,63	76,74 <sup>a</sup> ± 15,13	78,95 <sup>a</sup> ± 30,18	11,14 <sup>a</sup> ± 2,47	12,20 <sup>a</sup> ± 1,05	13,92 <sup>a</sup> ± 3,96
BaA	52,72 <sup>b</sup> ± 19,81	19,43 <sup>a</sup> ± 4,04	23,09 <sup>a</sup> ± 9,14	1,10 <sup>a</sup> ± 0,42	2,00 <sup>a</sup> ± 0,83	1,68 <sup>a</sup> ± 0,11
CHR	90,45 <sup>b</sup> ± 35,81	32,61 <sup>a</sup> ± 5,64	30,32 <sup>a</sup> ± 11,87	ND	1,45 <sup>a</sup> ± 0,07	1,96 <sup>a</sup> ± 0,13
BbFA	21,92 <sup>b</sup> ± 7,75	6,99 <sup>a</sup> ± 1,28	4,22 <sup>a</sup> ± 1,64	ND	ND	ND
BkFA	5,89 <sup>c</sup> ± 2,18	2,10 <sup>b</sup> ± 0,36	0,40 <sup>a,b</sup> ± 0,79	ND	ND	ND
BaP	20,74 <sup>b</sup> ± 7,40	6,56 <sup>a</sup> ± 1,05	6,43 <sup>a</sup> ± 2,41	ND	ND	ND
DBahA	10,93 <sup>c</sup> ± 4,43	1,75 <sup>a,b</sup> ± 2,02	5,50 <sup>a,b</sup> ± 2,57	ND	ND	ND
BghiP	18,28 <sup>b</sup> ± 6,32	5,26 <sup>a</sup> ± 0,91	ND	ND	ND	ND
IP	9,64 <sup>b</sup> ± 3,55	2,78 <sup>a</sup> ± 0,58	4,80 <sup>a</sup> ± 1,82	ND	ND	ND
PAH leves <sup>1</sup>	5517,05 <sup>c</sup> ± 532,59	3239,31 <sup>a,b,c</sup> ± 445,14	3313,94 <sup>b,c</sup> ± 1252,60	2184,17 <sup>a,b</sup> ± 22,30	1963,96 <sup>a</sup> ± 98,98	1432,90 <sup>a</sup> ± 91,15
PAH pesados <sup>2</sup>	87,40 <sup>b</sup> ± 31,61	25,44 <sup>a</sup> ± 6,14	21,35 <sup>a</sup> ± 8,92	ND	ND	ND
PAH4 <sup>3</sup>	185,84 <sup>a</sup> ± 70,74	65,59 <sup>a</sup> ± 11,90	64,05 <sup>a</sup> ± 25,06	1,10 <sup>a</sup> ± 0,42	3,45 <sup>a</sup> ± 0,90	3,63 <sup>a</sup> ± 0,02
Total PAH	5604,45 <sup>c</sup> ± 564,16	3264,75 <sup>a,b</sup> ± 451,13	3335,29 <sup>a,b</sup> ± 1260,92	2184,17 <sup>a,b</sup> ± 22,30	1963,96 <sup>a</sup> ± 98,98	1433,04 <sup>a</sup> ± 91,12

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

1 O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

2 O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, e IP.

3 O teor em PAH4 foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

**Tabela A.9.** Evolução do teor em PAH no interior do chouriço de carne (em µg/kg, sob a forma média ± DP) ao longo do tempo de armazenamento.

	Lote A (Aspersão)					
	<i>Controlo</i>			<i>AFL</i>		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
ACL	343,83 <sup>c,d,e</sup> ± 40,44	319,53 <sup>c,d,e</sup> ± 8,36	232,79 <sup>a,b</sup> ± 48,32	372,31 <sup>e</sup> ± 34,55	275,47 <sup>b,c,d</sup> ± 41,02	259,22 <sup>b,c</sup> ± 17,33
NA	745,54 <sup>e</sup> ± 56,03	686,22 <sup>d,e</sup> ± 46,93	594,18 <sup>c,d,e</sup> ± 120,78	668,27 <sup>d,e</sup> ± 24,49	469,31 <sup>c</sup> ± 44,40	554,12 <sup>c,d</sup> ± 46,72
AC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FA	35,73 <sup>c</sup> ± 1,13	30,89 <sup>c</sup> ± 4,10	33,34 <sup>c</sup> ± 4,84	ND	ND	22,15 <sup>a</sup> ± 0,44
PHE	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AN	2,30 <sup>b</sup> ± 0,05	2,14 <sup>b</sup> ± 0,06	2,23 <sup>b</sup> ± 0,37	0,76 <sup>a</sup> ± 0,06	0,50 <sup>a</sup> ± 0,05	0,74 <sup>a</sup> ± 0,06
FA	7,95 <sup>e</sup> ± 0,44	3,75 <sup>a,b</sup> ± 0,06	6,27 <sup>d,e</sup> ± 0,54	5,77 <sup>c,d</sup> ± 1,28	4,51 <sup>b,c</sup> ± 1,61	7,36 <sup>d,e</sup> ± 1,23
PY	2,89 <sup>b,c,d</sup> ± 0,41	2,98 <sup>a,b,c,d</sup> ± 0,69	2,75 <sup>b,c,d</sup> ± 0,26	1,66 <sup>a</sup> ± 0,15	1,47 <sup>a</sup> ± 0,30	2,19 <sup>a,b,c</sup> ± 0,04
BaA	0,69 <sup>e</sup> ± 0,09	0,36 <sup>d,e</sup> ± 0,06	0,34 <sup>a,b,c,d</sup> ± 0,02	0,32 <sup>a,b,c,d</sup> ± 0,05	0,56 <sup>d,e</sup> ± 0,25	0,46 <sup>c,d,e</sup> ± 0,17
CHR	0,47 <sup>d,e</sup> ± 0,05	0,51 <sup>d,e</sup> ± 0,05	0,37 <sup>d</sup> ± 0,05	0,27 <sup>b,c</sup> ± 0,02	0,22 <sup>a,b,c</sup> ± 0,04	0,20 <sup>a,b</sup> ± 0,02
BbFA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BkFA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BaP	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DBahA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BghiP	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IP	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PAH leves <sup>1</sup>	1139,39 <sup>d</sup> ± 96,71	1046,37 <sup>c,d</sup> ± 118,76	872,26 <sup>b,c</sup> ± 174,20	1071,18 <sup>c,d</sup> ± 57,70	752,04 <sup>b</sup> ± 85,29	846,44 <sup>b,c</sup> ± 45,48
PAH pesados <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PAH4 <sup>3</sup>	1,16 <sup>d,e,f</sup> ± 0,13	0,87 <sup>c,d</sup> ± 0,11	0,71 <sup>c</sup> ± 0,06	0,59 <sup>b,c</sup> ± 0,04	0,78 <sup>c,d</sup> ± 0,26	0,66 <sup>b,c</sup> ± 0,19
Total PAH	1139,39 <sup>d</sup> ± 96,71	1046,37 <sup>c,d</sup> ± 118,76	872,26 <sup>b,c</sup> ± 174,20	1071,18 <sup>c,d</sup> ± 57,70	752,04 <sup>b</sup> ± 85,29	846,44 <sup>b,c</sup> ± 45,48

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

1 O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

2 O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, e IP.

3 O teor em PAH4 foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

Tabela A.9. (Continuação)

	Lote B (Incorporação)					
	Controlo			AFL		
	PF	1M	3M	PF	1M	3M
ACL	313,88 <sup>b,c,d,e</sup> ± 28,77	346,60 <sup>c,d,e</sup> ± 17,18	172,61 <sup>a</sup> ± 28,91	292,29 <sup>b,c,d,e</sup> ± 6,85	293,40 <sup>b,c,d,e</sup> ± 5,56	292,76 <sup>b,c,d,e</sup> ± 13,10
NA	422,18 <sup>c</sup> ± 23,55	262,97 <sup>a,b</sup> ± 187,53	102,49 <sup>a</sup> ± 14,43	520,81 <sup>c,d</sup> ± 2,35	516,70 <sup>c,d</sup> ± 74,61	518,77 <sup>c,d</sup> ± 55,53
AC	40,46 <sup>c</sup> ± 1,48	32,38 <sup>b</sup> ± 1,53	ND	8,66 <sup>a</sup> ± 1,18	10,49 <sup>a</sup> ± 1,31	10,00 <sup>a</sup> ± 0,49
FA	94,29 <sup>f</sup> ± 0,44	77,54 <sup>e</sup> ± 6,86	54,33 <sup>d</sup> ± 5,87	19,02 <sup>a</sup> ± 1,99	20,66 <sup>a</sup> ± 1,00	23,33 <sup>b</sup> ± 0,47
PHE	26,19 <sup>c</sup> ± 1,35	25,03 <sup>c</sup> ± 0,99	14,96 <sup>b</sup> ± 2,54	7,47 <sup>a</sup> ± 0,34	8,37 <sup>a</sup> ± 0,07	7,97 <sup>a</sup> ± 0,15
AN	6,10 <sup>e</sup> ± 0,54	5,21 <sup>d</sup> ± 0,08	3,31 <sup>c</sup> ± 0,53	0,94 <sup>a</sup> ± 0,04	1,10 <sup>a</sup> ± 0,08	1,03 <sup>a</sup> ± 0,01
FA	7,38 <sup>d,e</sup> ± 0,68	7,09 <sup>d,e</sup> ± 0,14	3,74 <sup>a,b</sup> ± 0,81	2,25 <sup>a</sup> ± 0,01	2,08 <sup>a</sup> ± 0,05	1,88 <sup>a</sup> ± 0,41
PY	3,54 <sup>d</sup> ± 0,31	3,58 <sup>d</sup> ± ,06	2,67 <sup>b,c,d</sup> ± 0,75	1,66 <sup>a</sup> ± 0,11	1,40 <sup>a</sup> ± 0,08	1,97 <sup>a,b</sup> ± 0,49
BaA	0,41 <sup>b,c,d</sup> ± 0,03	0,37 <sup>a,b,c,d</sup> ± 0,06	0,29 <sup>a,b,c</sup> ± 0,09	0,21 <sup>a,b,c</sup> ± 0,09	0,13 <sup>a</sup> ± 0,03	0,18 <sup>a,b</sup> ± 0,02
CHR	0,77 <sup>f</sup> ± 0,06	0,78 <sup>f</sup> ± 0,05	0,58 <sup>e</sup> ± 0,17	0,08 <sup>a</sup> ± 0,02	0,08 <sup>a</sup> ± 0,02	0,43 <sup>d,e</sup> ± ,01
BbFA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BkFA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BaP	0,16 <sup>b</sup> ± 0,00	0,15 <sup>b</sup> ± 0,00	0,08 <sup>a</sup> ± 0,09	ND	ND	ND
DBahA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BghiP	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IP	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PAH leves <sup>1</sup>	915,21 <sup>b,c,d</sup> ± 56,63	761,54 <sup>b</sup> ± 182,37	354,96 <sup>a</sup> ± 35,25	853,39 <sup>b,c</sup> ± 7,00	854,41 <sup>b,c</sup> ± 89,03	858,32 <sup>b,c</sup> ± 67,91
PAH pesados <sup>2</sup>	0,16 <sup>b</sup> ± 0,00	0,15 <sup>b</sup> ± 0,00	0,08 <sup>a</sup> ± 0,09	ND	ND	ND
PAH4 <sup>3</sup>	1,35 <sup>f</sup> ± 0,08	1,31 <sup>e,f</sup> ± 0,05	0,94 <sup>d,e</sup> ± 0,35	0,30 <sup>b</sup> ± 0,11	0,20 <sup>a</sup> ± 0,03	0,61 <sup>b,c</sup> ± 0,02
Total PAH	915,37 <sup>b,c,d</sup> ± 56,63	761,70 <sup>b</sup> ± 182,37	355,04 <sup>a</sup> ± 35,16	853,39 <sup>b,c</sup> ± 7,00	854,41 <sup>b,c</sup> ± 89,03	858,32 <sup>b,c</sup> ± 67,91

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

1 O teor em PAH leves foi determinado a partir da soma dos teores individuais de ACL, NA, AC, FL, PHE, AN, FA, PY, BaA e CHR.

2 O teor em PAH pesados foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BbFA, BkFA, BaP, e IP.

3 O teor em PAH4 foi determinado a partir da soma dos teores individuais de BaA, CHR, BbFA e BaP.

**Tabela A. 10.** Margens de exposição (MOE) estimadas para o BaP e indicador PAH4, associadas à ingestão dos enchidos obtidos através das várias tecnologias de processamento testadas.

	BaP (ng/g)	Ingestão diária <sup>1</sup> (ng/kg pc/dia)	MOE <sup>2</sup>	PAH4 (ng/g)	Ingestão diária (ng/kg pc/dia)	MOE
<b>Lote A</b>						
<i>Controlo</i>	0,07	0,03	2400000	3,88	1,62	448352
<i>AFL</i>	0,00	0,00	> 10000	1,84	0,77	1337705
<b>Lote B</b>						
<i>Controlo</i>	0,33	0,14	509091	298,33	124,31	290391
<i>AFL</i>	0,00	0,00	> 10000	105,67	44,03	2720000

<sup>1</sup> Ingestão diária calculada considerando um consumo diário de 25 g por um indivíduo de 60 kg.

## Incidência de amins biogénicas em produtos de salsicharia tradicional portuguesa

**Tabela A.11.** Coeficientes da correlação de Pearson entre as fracções azotadas em análise.

	<i>PI</i>	<i>ANP</i>	<i>AAL</i>	<i>AA/ANP</i>	<i>ABVT</i>
<i>Proteína</i>	-0,25	0,72	0,53	-0,13	0,46
<i>PI</i>		0,34	0,29	-0,03	0,30
<i>ANP</i>			0,81	-0,07	0,73
<i>AAL</i>				0,42	0,69
<i>AA/ANP</i>					0,04

A vermelho são destacados os coeficientes significativos ( $p < 0,001$ ).

ANP: azoto não proteico; PI: índice de proteólise ( $PI = \frac{ANP}{Azoto\ Total} \times 100$ ); AAL: azoto dos aminoácidos livres; AAL/ANP: rácio entre o AAL e ANP ( $AAL/ANP = \frac{AAL}{ANP} \times 100$ ); ABVT: azoto básico volátil total.

**Tabela A.12.** Estatística descritiva para o total de aminas biogénicas (mg/kg).

	Alentejo						Trás-os-Montes					
	<i>Ch. carne</i>	<i>Morceia</i>	<i>Cacholeira</i>	<i>Ch. mouro</i>	<i>Painho</i>	<i>Paio de migos</i>	<i>Ch. carne</i>	<i>Morceia</i>	<i>Moura</i>	<i>Alheira</i>	<i>Ch. doce</i>	<i>Salpicão</i>
<i>Média</i>	1444,32 <sup>d</sup>	831,44 <sup>b,c</sup>	2422,67 <sup>e</sup>	679,88 <sup>b,c</sup>	2709,96 <sup>e</sup>	1346,93 <sup>c,d</sup>	472,31 <sup>b</sup>	29,14 <sup>a</sup>	421,22 <sup>b</sup>	137,91 <sup>a</sup>	26,64 <sup>a</sup>	605,03 <sup>b</sup>
<i>Mediana</i>	1116,05	485,08	2699,67	680,42	2250,89	958,72	430,21	29,20	415,72	73,46	26,64	415,75
<i>Mínimo</i>	738,33	31,35	1292,28	636,77	1268,77	552,56	189,68	28,39	237,18	21,31	26,35	321,50
<i>Máximo</i>	3137,25	2987,18	3279,73	721,90	5571,83	2546,74	964,25	29,89	626,92	384,18	26,93	1580,02
<i>Q<sub>1</sub></i>	958,92	131,41	1376,76	644,54	1834,22	620,75	353,37	28,39	279,78	38,71	26,35	362,62
<i>Q<sub>3</sub></i>	1413,18	897,40	3187,90	715,22	3034,07	2444,08	492,47	29,89	557,31	236,64	26,93	526,21

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Tabela A.13.** Efeito do produtor nos teores médios (mg/kg) de AB determinados no chouriço de carne, em função da região geográfica dos produtores.

	Produtores do Alentejo				
	Produtor 1	Produtor 2	Produtor 3	Produtor 4	Produtor 5
<i>Triptamina</i>	96,06 <sup>d</sup> (92,48 - 99,64) <sup>1</sup> **	49,67 <sup>c</sup> (48,69 - 50,65)	12,06 <sup>a</sup> (11,80 - 12,32)	35,67 <sup>b</sup> (32,70 - 38,65)	ND
<i>β-Feniletilamina</i>	ND	16,43 <sup>c</sup> (15,95 - 16,91) **	ND	2,62 <sup>a</sup> (2,19 - 3,05)	5,43 <sup>b</sup> (5,415,45)
<i>Putrescina</i>	1204,93 <sup>c</sup> (1038,01 - 1371,84) *	543,42 <sup>b,c</sup> (522,60 - 564,24)	207,41 <sup>b</sup> (192,17 - 222,64)	549,62 <sup>b,c</sup> (502,95 - 596,29)	142,00 <sup>a</sup> (136,34 - 147,65)
<i>Cadaverina</i>	1188,65 <sup>c</sup> (1183,82 - 1193,48) **	90,41 <sup>b</sup> (87,36 - 93,47)	133,96 <sup>c</sup> (124,07 - 143,86)	75,47 <sup>a</sup> (70,95 - 79,99)	288,18 <sup>d</sup> (279,07 - 297,30)
<i>Histamina</i>	28,59 <sup>a</sup> (28,13 - 29,05) **	309,36 <sup>c</sup> (299,53 - 319,19)	367,91 <sup>d</sup> (337,38 - 398,44)	107,78 <sup>b</sup> (98,70 - 116,85)	ND
<i>Tiramina</i>	387,92 <sup>d</sup> (381,17 - 394,68) *	313,05 <sup>c</sup> (311,77 - 314,33)	271,18 <sup>b</sup> (255,31 - 287,04)	207,13 <sup>a</sup> (196,04 - 218,22)	250,59 <sup>b</sup> (242,78 - 258,41)
<i>Espermidina</i>	14,33 <sup>c</sup> (13,92 - 14,75) *	6,33 <sup>a</sup> (6,02 - 6,64)	7,26 <sup>a,b</sup> (7,00 - 7,52)	8,39 <sup>b</sup> (7,70 - 9,07)	13,54 <sup>c</sup> (13,53 - 13,55)
<i>Espermina</i>	61,79 <sup>b</sup> (58,73 - 64,84) *	48,54 <sup>a</sup> (47,39 - 49,69)	61,53 <sup>a,b</sup> (58,44 - 64,63)	50,81 <sup>a,b</sup> (47,69 - 53,93)	61,71 <sup>b</sup> (58,90 - 64,52)
<i>Total AB</i>	2982,26 <sup>c</sup> (2827,28 - 3137,25) *	1377,22 <sup>b</sup> (1341,27 - 1413,18)	1061,31 <sup>a,b</sup> (986,69 - 1135,92)	1037,48 <sup>a,b</sup> (958,92 - 1116,05)	763,34 <sup>a</sup> (738,33 - 788,34)
<i>Vasoactivas<sup>2</sup></i>	512,57 <sup>c</sup> (508,94 - 516,20) *	688,52 <sup>c</sup> (677,90 - 699,13)	651,14 <sup>c</sup> (605,01 - 697,28)	353,20 <sup>b</sup> (329,62 - 376,77)	257,91 <sup>a</sup> (250,50 - 265,32)

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

<sup>1</sup> Entre parêntesis são apresentados os teores mínimos e máximos detectados.

<sup>2</sup> O teor em aminas vasoactivas foi determinado a partir da soma dos teores de triptamina, β-feniletilamina, histamina e tiramina.

**Tabela A.13. (Continuação)**

	Produtores de Trás-os-Montes				
	<i>Produtor 6</i>	<i>Produtor 7</i>	<i>Produtor 8</i>	<i>Produtor 9</i>	<i>Produtor 10</i>
<i>Triptamina</i>	9,63 <sup>b</sup> (8,55 - 10,70) <sup>1</sup> *	4,37 <sup>a</sup> (4,28 - 4,46)	8,61 <sup>b</sup> (8,46 - 8,75)	ND	ND
<i>β-Feniletilamina</i>	ND	ND	ND	ND	13,13 (12,60 - 13,66) **
<i>Putrescina</i>	182,03 <sup>c</sup> (168,67 - 195,39) *	94,87 <sup>c</sup> (91,74 - 97,99)	181,72 <sup>c</sup> (180,32 - 183,12)	47,94 <sup>b</sup> (46,12 - 49,77)	8,60 <sup>a</sup> (7,90 - 9,30)
<i>Cadaverina</i>	489,68 <sup>e</sup> (449,40 - 529,97) **	203,97 <sup>d</sup> (196,49 - 211,44)	14,85 <sup>b</sup> (14,66 - 15,04)	92,29 <sup>c</sup> (89,50 - 95,08)	2,34 <sup>a</sup> (1,75 - 2,92)
<i>Histamina</i>	32,39 <sup>b</sup> (29,03 - 35,75) **	21,99 <sup>a</sup> (21,30 - 22,67)	ND	ND	ND
<i>Tiramina</i>	149,26 <sup>a,b,c</sup> (140,95 - 157,57) *	101,74 <sup>a</sup> (98,64 - 104,83)	150,57 <sup>b,c</sup> (148,39 - 152,74)	161,32 <sup>c</sup> (155,35 - 167,29)	103,33 <sup>a,b</sup> (98,05 - 108,61)
<i>Espermidina</i>	7,61 <sup>a</sup> (6,76 - 8,47) *	7,28 <sup>a</sup> (6,95 - 7,60)	7,02 <sup>a</sup> (6,99 - 7,05)	10,07 <sup>b</sup> (9,70 - 10,43)	8,00 <sup>a</sup> (7,82 - 8,19)
<i>Espermina</i>	25,25 <sup>a</sup> (24,10 - 26,39) **	42,92 <sup>b</sup> (40,19 - 46,66)	65,08 <sup>e</sup> (64,56 - 65,60)	54,03 <sup>c</sup> (52,46 - 55,59)	58,00 <sup>d</sup> (57,00 - 59,00)
<i>Total AB</i>	895,85 <sup>e</sup> (827,46 - 964,25) **	476,12 <sup>d</sup> (459,78 - 492,47)	430,21 <sup>c</sup> (429,43 - 430,99)	365,96 <sup>b</sup> (353,37 - 378,55)	193,42 <sup>a</sup> (189,68 - 197,17)
<i>Vasoactivas<sup>2</sup></i>	191,28 <sup>c</sup> (178,52 - 204,03) *	128,09 <sup>b</sup> (124,41 - 131,78)	161,55 <sup>b,c</sup> (160,26 - 162,84)	161,63 <sup>b,c</sup> (155,58 - 167,68)	116,48 <sup>a</sup> (110,64 - 122,34)

Na mesma linha, valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND – não detectado.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

<sup>1</sup> Entre parêntesis são apresentados os teores mínimos e máximos detectados.

<sup>2</sup> O teor em aminas vasoactivas foi determinado a partir da soma dos teores de triptamina, β-feniletilamina, histamina e tiramina.

**Tabela A.14.** Coeficientes da correlação de Pearson entre as fracções azotadas e as amins biogénicas em análise.

	<i>Proteína</i>	<i>PI</i>	<i>ANP</i>	<i>AAL</i>	<i>ABVT</i>	<i>Triptamina</i>	$\beta$ - <i>Feniletilamina</i>	<i>Putrescina</i>	<i>Cadaverina</i>	<i>Histamina</i>	<i>Tiramina</i>	<i>Espermidina</i>	<i>Espermina</i>	<i>Total AB</i>
<i>pH</i>	0,16	0,09	0,17	0,02	0,39	-0,17	0,09	-0,09	-0,05	-0,21	-0,06	0,10	0,07	-0,09
<i>Proteína</i>		-0,25	0,72	0,53	0,46	0,19	0,23	0,27	0,22	0,32	0,54	-0,05	0,37	0,35
<i>PI</i>			0,34	0,29	0,30	0,21	0,11	0,24	0,13	-0,03	0,23	0,25	0,27	0,21
<i>ANP</i>				0,81	0,73	0,48	0,49	0,62	0,40	0,37	0,82	0,26	0,61	0,65
<i>AAL</i>					0,69	0,59	0,58	0,74	0,41	0,42	0,86	0,28	0,49	0,72
<i>ABVT</i>						0,28	0,55	0,62	0,46	0,28	0,65	0,17	0,32	0,63
<i>Triptamina</i>							0,39	0,72	0,25	0,18	0,72	0,61	0,70	0,62
<i>Feniletilamina</i>								0,53	0,17	0,05	0,68	0,25	0,21	0,45
<i>Putrescina</i>									0,65	0,32	0,85	0,46	0,58	0,93
<i>Cadaverina</i>										0,26	0,56	0,03	0,13	0,85
<i>Histamina</i>											0,34	-0,23	0,08	0,43
<i>Tiramina</i>												0,37	0,59	0,86
<i>Espermidina</i>													0,77	0,29
<i>Espermina</i>														0,46

A vermelho são destacados os coeficientes significativos ( $p < 0,001$ ).

ANP: azoto não proteico; PI: índice de proteólise ( $PI = \frac{ANP}{Azoto\ Total} \times 100$ ); AAL: azoto dos aminoácidos livres; AAL/ANP: rácio entre o AAL e ANP ( $AAL/ANP = \frac{AAL}{ANP} \times 100$ );

ABVT: azoto básico volátil total.

## Efeito da utilização de aroma de fumo líquido no perfil de aminoácidos, amins biogénicas e compostos bioactivos em chouriço de carne

**Tabela A.15.** Efeito dos factores principais: lote, do tipo de processamento e do tempo de armazenamento e respectivas interações sobre o teor dos aminoácidos estudados.

	Factores			Interações			
	Lote	Processamento	Tempo	L x P	L x T	P x T	L x P x T
<i>Ác. aspártico</i>	***	*	***	ns	***	***	ns
<i>Ác. glutâmico</i>	***	ns	***	***	***	ns	**
<i>Serina</i>	***	ns	***	ns	***	**	ns
<i>Glutamina</i>	***	ns	***	ns	*	ns	ns
<i>Histidina</i>	*	***	***	**	*	**	*
<i>Treonina</i>	***	*	***	**	***	ns	ns
<i>Glicina</i>	ns	***	***	ns	ns	**	ns
<i>Taurina</i>	***	**	***	***	ns	***	ns
<i>Alanina</i>	***	***	ns	***	ns	ns	ns
<i>Arginina</i>	***	***	***	***	ns	***	**
<i>Tirosina</i>	***	ns	***	***	***	***	*
<i>Metionina</i>	***	***	***	***	ns	***	***
<i>Valina</i>	***	***	***	***	ns	***	**
<i>Triptofano</i>	**	**	***	ns	ns	*	**
<i>Fenilalanina</i>	***	***	***	***	ns	***	***
<i>Isoleucina</i>	***	***	***	***	ns	***	**
<i>Leucina</i>	***	***	***	***	ns	***	***
<i>Ornitina</i>	***	ns	***	***	***	ns	**
<i>Lisina</i>	ns	***	***	ns	*	**	*
<i>Total AA</i>	ns	**	***	ns	ns	**	*

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ns - não significativo.

L x P: Lote x Processamento, L x T: Lote x Tempo, P x T: Processamento x Tempo, L x P x T: Lote x Processamento x Tempo.

**Tabela A.16.** Efeito dos factores principais: lote, do tipo de processamento e do tempo de armazenamento e respectivas interacções sobre o teor das aminas biogénicas estudadas.

	Factores			Interacções			
	Lote	Processamento	Tempo	L x P	L x T	P x T	L x P x T
<i>β-Feniletilamina</i>	ns	ns	**	*	ns	*	*
<i>Putrescina</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>Cadaverina</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>Tiramina</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>Espermidina</i>	***	*	***	ns	***	ns	*
<i>Espermina</i>	***	**	***	***	**	*	ns
<i>Total AB</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>Vasoactivas</i>	***	***	***	***	***	***	***

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ns - não significativo.

L x P: Lote x Processamento, L x T: Lote x Tempo, P x T: Processamento x Tempo,

L x P x T: Lote x Processamento x Tempo.

**Tabela A.17.** Efeito dos factores principais: lote, do tipo de processamento e do tempo e respectivas interacções sobre o teor dos compostos bioactivos estudados.

	Factores			Interacções			
	Lote	Processamento	Tempo	L x P	L x T	P x T	L x P x T
<i>Carnosina</i>	***	ns	**	ns	ns	ns	*
<i>Anserina</i>	***	ns	***	ns	**	ns	ns
<i>Creatina</i>	**	ns	***	ns	ns	ns	ns
<i>Total</i>	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ns - não significativo.

L x P: Lote x Processamento, L x T: Lote x Tempo, P x T: Processamento x Tempo, L x P x T: Lote x Processamento x Tempo.

**Tabela A.18.** Coeficientes da correlação de Pearson entre as fracções azotadas consideradas.

	<i>Proteína</i>	<i>ANP</i>	<i>AAL</i>	<i>ABVT</i>	<i>PI</i>	<i>AAL/ANP</i>
<i>pH</i>	-0,92	-0,44	-0,88	-0,80	0,89	-0,83
<i>Proteína</i>		0,49	0,86	0,77	-0,95	0,74
<i>ANP</i>			0,73	0,75	-0,19	0,64
<i>AAL</i>				0,89	-0,71	0,93
<i>ABVT</i>					-0,60	0,89
<i>PI</i>						-0,61

A vermelho são destacados os coeficientes significativos ( $p < 0,01$ ).

ANP: azoto não proteico; PI: índice de proteólise ( $PI = \frac{ANP}{Azoto\ Total} \times 100$ ); AAL: azoto dos aminoácidos livres; AAL/ANP: rácio entre o AAL e ANP ( $AAL/ANP = \frac{AAL}{ANP} \times 100$ ); ABVT: azoto básico volátil total.

**Tabela A.19.** Coeficientes da correlação de Pearson entre as aminas biogénicas e os seus aminoácidos precursores.

	<i>Fenilalanina</i>	<i>Tirosina</i>	<i>Arginina</i>	<i>Ornitina</i>	<i>Lisina</i>	$\beta$ - <i>Feniletilamina</i>	<i>Putrescina</i>	<i>Cadaverina</i>	<i>Tiramina</i>	<i>Espermidina</i>	<i>Espermina</i>
<i>Glutamina</i>	-0,65	0,51	-0,80	-0,20	-0,59	0,24	-0,85	-0,74	-0,87	-0,79	0,34
<i>Fenilalanina</i>		0,16	0,94	0,74	0,97	-0,35	0,67	0,70	0,84	0,72	-0,63
<i>Tirosina</i>			-0,11	0,65	0,27	-0,08	-0,50	-0,45	-0,36	-0,26	-0,41
<i>Arginina</i>				0,58	0,88	-0,28	0,80	0,82	0,92	0,79	-0,55
<i>Ornitina</i>					0,80	-0,38	0,06	0,20	0,38	0,26	-0,75
<i>Lisina</i>						-0,35	0,59	0,54	0,75	0,68	-0,69
$\beta$ - <i>Feniletilamina</i>							-0,23	-0,24	-0,31	-0,29	0,50
<i>Putrescina</i>								0,84	0,86	0,90	-0,28
<i>Cadaverina</i>									0,88	0,71	-0,27
<i>Tiramina</i>										0,81	-0,37
<i>Espermidina</i>											-0,40

A vermelho são destacados os coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ).

