



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Avaliação da segurança química e microbiológica de enchidos curados do Alentejo

Sara Margarida Prates da Conceição

Orientador(es) | Marta Sofia Serrano Valente Casimiro Ferreira Laranjo
Miguel Nuno Geraldo Viegas Santos Elias

Évora 2020



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Avaliação da segurança química e microbiológica de enchidos curados do Alentejo

Sara Margarida Prates da Conceição

Orientador(es) | Marta Sofia Serrano Valente Casimiro Ferreira Laranjo
Miguel Nuno Geraldo Viegas Santos Elias

Évora 2020





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | Célia M. Antunes (Universidade de Évora)
- Vogal | Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | Marta Sofia Serrano Valente Casimiro Ferreira Laranjo (Universidade de Évora)

Aos meus pais

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less”*

Marie Curie

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Universidade de Évora, onde realizei o meu percurso académico. Também gostaria de agradecer o apoio que recebi no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Tecnologia e Pós-Colheita (MED-Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Universidade de Évora).

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, Doutora Marta Laranjo e Professor Doutor Miguel Elias, por aceitarem trabalhar comigo novamente, pela sabedoria, disponibilidade e orientação ao longo deste ano.

Aos meus pais, pois sem o seu apoio não estaria a terminar mais uma etapa da minha vida académica onde tive a oportunidade de crescer a nível académico e como pessoa.

Queria agradecer à Dra. Guilhermina Pias e à D. Esperança Coelho pela ajuda e carinho que recebi durante o meu trabalho no Laboratório de Microbiologia.

Durante esta nova etapa tive a oportunidade de trabalhar com pessoas maravilhosas com quem pude contar, pois sempre me apoiaram quando precisei. Assim, um especial obrigado à Maria Inês Rouxinol e à Sara Rodrigues pelo apoio e conhecimentos partilhados. Também quero agradecer à Laura Carreira, Marta Otlíio, Marlene Silva, Ana Severo e ao Rafael Pinto, pela amizade e por todo o apoio incansável ao longo desta etapa académica.

Financiamento

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos projetos UID/AGR/00115/2019 e “Segurança & Qualidade dos Produtos Cárneos Transformados” (PDR2020-1.0.1-FEADER-031373).

Este trabalho foi ainda suportado por Fundos Nacionais através da FCT no âmbito do Projeto UIDB/05183/2020.



Abreviaturas

AB – aminas biogénicas

ADP – adenosina Difosfato

ATP – adenosina Trifosfato

a_w – atividade da água

BAL – Bactérias do Ácido Lático

CP – Chouriço Preto

DAD – *Diode Array Detector* (detetor de matriz de díodo)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

ECN – Estafilococos coagulase-negativos

ELFA – *Enzyme-Linked Fluorescent Assay* (ensaio imunoenzimático por fluorescência)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)

EMP – Embden-Meyerhof-Parnas

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Point* (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)

HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro)

MOA – Monoamina oxidase-A

NAD⁺ – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (dinucleótido de nicotinamida e adenina - forma oxidada)

NADH – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (dinucleótido de nicotinamida e adenina - forma reduzida)

OH-HPA – Metabolitos hidroxilados

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PP – Paio Preto

RFS – Recipiente de fase sólida

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

Unidades

% – Percentagem

μL – Microlitros

μm – Micrómetros

g – Grama

h – Hora

L – Litro

log ufc/g – Logaritmo de unidades formadoras de colónias por grama

M – Molar

mg/Kg – Miligrama por quilograma

mL – Mililitros

mL/min – Mililitros por minutos

mm – Milímetros

N – Normalidade

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

ppm – Partes por milhão

rpm – Rotações por minuto

ufc/g – Unidades formadoras de colónias por grama

Resumo

Avaliação da segurança química e microbiológica de enchidos curados do Alentejo

O consumo de enchidos curados é elevado, não só em Portugal, mas também noutros países da Europa, como a Espanha e a Itália. No entanto, há uma preocupação em relação à sua segurança, uma vez que durante a cura destes enchidos pode ocorrer a formação de nitrosaminas que são compostos químicos considerados cancerígenos. Neste estudo foi feita a avaliação das condições de fabrico de enchidos curados em duas fábricas, de modo a avaliar a sua segurança química e microbiológica. Foram observadas diferenças entre as fábricas, apesar do tipo de enchido curado ser o mesmo. Também foi feita a avaliação da eliminação de nitratos e nitritos da formulação destes enchidos, de modo a perceber quais as consequências dessa eliminação a nível químico e microbiológico. Uma vez que não se observaram diferenças significativas para os diferentes parâmetros analisados entre os paços controlados e aqueles sem nitratos e nitritos, poderá no futuro ser proposto às salsicharias que reduzam ou eliminem estes aditivos da formulação deste tipo de enchidos.

Palavras-chave: enchidos; aminas biogénicas; clostrídios sulfito-redutores; *Salmonella*; *Listeria monocytogenes*

Abstract

Evaluation of chemical and microbiological safety of dry-cured sausages of Alentejo

The consumption of cured sausages is high, not only in Portugal, but also in other European countries, such as Spain and Italy. However, there is a concern regarding its safety, since during the curing of these sausages, the formation of nitrosamines, chemical compounds considered to be carcinogenic, may occur. In this study, the evaluation of the conditions of manufacture of cured sausages in two factories was carried out, in order to assess their chemical and microbiological safety. Differences were observed between manufacturing units, although the type of cured sausage is the same. The evaluation of the elimination of nitrates and nitrites from the formulation of these sausages was also made, in order to understand the consequences of this elimination at the chemical and microbiological level. Since no significant differences were observed for the different parameters analyzed between the control sausages and those without nitrates and nitrites, in the future we could propose to the industry to reduce or eliminate these additives in the formulation of this type of sausages.

Keywords: dry-fermented sausages; biogenic amines; sulfite-reducing clostridia; *Salmonella*; *Listeria monocytogenes*.

Índice geral

Agradecimentos	i
Financiamento	ii
Abreviaturas	iii
Unidades.....	v
Resumo.....	vii
<i>Abstract</i>	ix
Índice geral.....	xi
Índice de figuras	xiii
Índices de quadros	xiv
Estrutura da dissertação.....	xi
1. Introdução.....	3
2. Revisão bibliográfica	7
2.1. Segurança dos Alimentos	7
2.2. Enchidos Tradicionais	9
2.2.1. Proteólise.....	11
2.2.2. Atividade da água.....	12
2.2.3. Nitratos e Nitritos	12
2.2.4. Aminas Biogénicas	14
2.2.5. Nitrosaminas	15
2.2.6. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)	17
2.3. Microbiota de interesse tecnológico.....	18
2.3.1. Bactérias do ácido láctico	18
2.3.2. Estafilococos	21
2.4. Microbiota indicadora de higiene.....	21
2.4.1. Enterobactérias	21

2.5. Microbiota patogénica	22
2.5.1. Clostrídios	22
2.5.2. <i>Listeria</i>	23
2.5.3. <i>Salmonella</i> spp.	25
2.6. Estudos realizados	26
3. Objetivos.....	33
4. Materiais e Métodos.....	37
4.1. Amostras	37
4.2. Análises microbiológicas.....	37
4.2.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	37
4.2.2. Pesquisa e contagem de clostrídios sulfito-redutores, <i>L. monocytogenes</i> , enterobactérias, bactérias do ácido láctico e estafilococos	39
4.3. Análises físico-químicas	41
4.4. Análise do perfil de aminas biogénicas	42
4.5. Análise estatística dos dados.....	45
5. Evolução dos enchidos ao longo do processo de fabrico	49
5.1. Parâmetros físico-químicos.....	49
5.2. Parâmetros microbiológicos.....	56
6. Eliminação de nitratos e nitritos da formulação de enchidos	69
6.1. Parâmetros físico-químicos.....	69
6.2. Parâmetros microbiológicos	77
6.3. Perfil de aminas biogénicas	84
7. Conclusões.....	99
8. Referências bibliográficas	105
9. Websites consultados	118

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura química das aminas biogénicas em estudo (adaptado de (Bover-Cid <i>et al.</i> , 2014)).	14
Figura 2. Mapa metabólico das Bactérias do ácido láctico (adaptado de Adams, M. R. & Moss, M. O, 2009).	19
Figura 3. Equipamentos utilizados para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.: miniVIDAS (A) e Heat & GO (B).	38
Figura 4. Componentes do kit de imunodeteção para <i>Salmonella</i> spp.: barrete de reagentes (A) e recipiente (B).	39
Figura 5. Equipamentos utilizados para as análises físico-químicas: medidor de pH (A) e higrómetro (B).	41
Figura 6. Equipamento utilizado para a separação e identificação das aminas biogénicas em estudo (UHPLC Ultimate 3000).	44

Índices de quadros

Quadro 1. Estudos realizados no âmbito do tema desta dissertação de mestrado.	27
Quadro 2. Meios de cultura utilizados nas análises microbiológicas com as respetivas condições de incubação.....	40
Quadro 3. Análise de variância para a evolução do pH e a_w ao longo do processo nas duas fábricas em estudo.....	50
Quadro 4. Evolução do pH e a_w em diferentes etapas ao longo do processo nas duas fábricas em estudo.....	50
Quadro 5. Análise de variância para as contagens microbianas.....	57
Quadro 6. Contagens microbianas em diferentes etapas ao longo do processo nas duas fábricas em estudo. Valores para mesófilos, BAL, estafilococos e enterobactérias expressos em log ufc/g e para <i>L. monocytogenes</i> e <i>Listeria</i> spp. expressos em ufg/g....	57
Quadro 7. Análise de variância para a evolução do pH e a_w ao longo do processo nas diferentes etapas e na presença/ausência de nitratos/nitritos.....	70
Quadro 8. Evolução do pH e a_w em diferentes etapas ao longo do processo e na presença/ausência de nitratos/nitritos.....	71
Quadro 9. Análise de variância para a evolução das contagens microbianas ao longo do processo nas diferentes etapas e na presença/ausência de nitratos/nitritos.	77
Quadro 10. Contagens microbianas em diferentes etapas ao longo do processo e na presença/ausência de nitratos/nitritos. Valores para mesófilos, estafilococos e enterobactérias expressos em log ufc/g e para <i>L. monocytogenes</i> e <i>Listeria</i> spp. expressos em ufg/g.....	78
Quadro 11. Análise de variância para a evolução das aminas biogénicas ao longo do processo nas diferentes etapas e na presença/ausência de nitratos/nitritos.	85
Quadro 12. Evolução das aminas biogénicas ao longo do processo nas diferentes etapas e na presença/ausência de nitratos/nitritos. Valores expressos em mg/kg de peso fresco.	86
Quadro 13. Perfil de aminas biogénicas obtido por Alves <i>et al.</i> (2017). Valores expressos em mg/kg de peso fresco.	92

Quadro 14. Perfil de aminos biogénicas obtido por Ekici & Omer (2018). Valores expressos em mg/kg de peso fresco..... 93

Estrutura da dissertação

Esta dissertação de mestrado é constituída por sete capítulos, apresentados abaixo:

- ❖ Capítulo I – Introdução: Introdução ao tema a desenvolver ao longo da dissertação.
- ❖ Capítulo II – Revisão bibliográfica: É realizada uma revisão bibliográfica sobre a produção de enchidos curados. Apresentam-se também os microrganismos de interesse tecnológico, bem como alguns indicadores de higiene e segurança dos enchidos curados. Apresentam-se ainda os parâmetros físico-químicos e químicos que podem influenciar as características organolépticas e de segurança dos mesmos.
- ❖ Capítulo III – Objetivos: São abordados os objetivos desta dissertação, bem como o seu plano de trabalhos.
- ❖ Capítulo IV – Materiais e Métodos: Descrição dos métodos utilizados na realização da dissertação de mestrado, nomeadamente análises microbiológicas, físico-químicas e químicas dos enchidos curados.
- ❖ Capítulo V – Evolução dos enchidos ao longo do processo de fabrico: É realizada uma pequena introdução, de modo a explicar o ensaio realizado. São apresentados os resultados obtidos, bem como a sua discussão tendo em conta outros trabalhos.
- ❖ Capítulo VI – Eliminação de nitratos e nitritos da formulação de enchidos: É realizada uma pequena introdução, de modo a explicar o ensaio realizado. São apresentados os resultados obtidos, bem como a sua discussão tendo em conta outros trabalhos.
- ❖ Capítulo VII – Conclusões: São apresentadas as considerações finais relativamente ao trabalho desenvolvido. Apresentam-se também perspetivas para trabalhos futuros.

CAPÍTULO I

Introdução



1. Introdução

Nos últimos anos observou-se um aumento do consumo de produtos cárneos curados, bem como uma maior exigência por parte do consumidor em relação às características organoléticas e à segurança dos produtos curados.

Devido a este aumento a Organização Mundial de Saúde (OMS) realizou um estudo acerca do potencial carcinogénico do consumo de carne vermelha e carne processada. Este trabalho levou à publicação de um relatório (Bouvard *et al.*, 2015) que alerta para os possíveis riscos carcinogénicos que os produtos cárneos curados possuem para a saúde do consumidor, devido à presença de nitrosaminas. Estas são resultantes da reação das aminas biogénicas com o agente nitroso que é proveniente da adição de nitratos na preparação da massa.

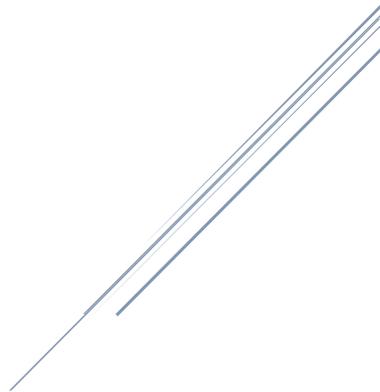
Para além da possibilidade da produção de nitrosaminas ao longo do fabrico de enchidos, quando se trata de produtos fumados existe também a possibilidade da produção de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA). Ambos são considerados compostos potencialmente cancerígenos. Assim, é necessário proceder à redução da utilização de nitratos e nitritos na produção de enchidos curados, para que a produção de nitrosaminas possa ser evitada, e novos métodos de fumagem que não incluam a combustão de madeiras para evitar a formação de HPA.

Contudo, existem outras preocupações associadas ao consumo de enchidos curados, nomeadamente a contaminação dos mesmos a nível microbiológico. Esta contaminação pode resultar do ambiente fabril, ou seja, ocorrer ao longo do processo devido a uma má limpeza e desinfeção dos equipamentos e materiais utilizados, ou uma má higiene dos trabalhadores. Também pode resultar de uma má qualidade da matéria-prima, se esta chegar à fábrica com teores microbianos superiores aos aceitáveis. Nestas condições, pode haver crescimento da microbiota patogénica nos enchidos curados, como por exemplo *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, que ao entrarem no organismo Humano podem causar salmonelose e listeriose, respetivamente, sendo a gravidade

destas dependente da idade do indivíduo afetado ou do estado do seu sistema imunitário. No entanto, não é apenas a presença desta microbiota patogénica que leva a complicações para a saúde do consumidor. A presença de bactérias do ácido láctico e enterobactérias, que são consideradas como microbiota indicadora de higiene, promovem a formação de aminas biogénicas através da descarboxilação de aminoácidos. Estas, ao serem ingeridas em quantidades elevadas podem provocar toxinfecções alimentares, bem como outros sintomas como náuseas, suores, diarreia, palpitações cardíacas, entre outros (Pereira *et al.*, 2018).

Assim, é necessário realizar estudos de modo a entender a formação destes compostos ao longo da produção dos enchidos curados. Para tal, serão realizadas análises nas diversas etapas do processo de fabrico de enchidos em diferentes lotes, primeiramente apenas para conhecer a microbiota presente nos mesmos bem como os parâmetros físico-químicos (pH e a_w), pois, ambos os parâmetros afetam as características organolépticas dos enchidos. Após esta avaliação, a segunda parte deste trabalho será a realização de análises num processo de fabrico de enchidos com nitratos e nitritos e sem a inclusão destes aditivos nos enchidos. Desta forma, é possível avaliar o seu efeito ao longo da produção de enchidos curados e delinear novos métodos mais seguros para a produção de enchidos, diminuindo a presença de microrganismos patogénicos, clostrídios sulfito-redutores e compostos potencialmente cancerígenos.

CAPÍTULO II
Revisão
bibliográfica



2. Revisão bibliográfica

2.1. Segurança dos Alimentos

A Segurança dos Alimentos pode ser definida como “a garantia de que os géneros alimentícios não causarão danos ao consumidor quando preparada e/ou consumida de acordo com o seu uso pretendido” (Motarjemi & Lelieveld, 2014). Desde o final do século XX que existe um aumento de debates acerca da segurança dos alimentos, pois nessa altura houve um aumento drástico de casos de doenças relacionadas com o consumo de produtos alimentares, bem como a descoberta de agentes patogénicos alimentares e de perigos químicos.

De modo a garantir a segurança dos alimentos a indústria alimentar tem como base três linhas de defesa (Motarjemi & Lelieveld, 2014):

- A primeira linha de defesa tem como objetivo a implementação de códigos e boas práticas. Esta implementação é feita uma vez que com base em experiências anteriores concluiu-se que estas medidas são necessárias para a garantia da segurança dos alimentos, e com algumas modificações poderão ser aplicadas a qualquer tipo de produto alimentar.
- A segunda linha de defesa é a aplicação do sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point* - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo). Neste processo são identificados quais os perigos para o produto ou processo em causa e são também determinadas quais as medidas de controlo para os mesmos. São determinados quais os passos essenciais na garantia da segurança, as medidas de controlo, definir pontos onde se vai exercer esse controlo e estabelecer a monitorização dos registos efetuados nesses pontos e estabelecer limites críticos e tolerâncias.
- A terceira linha de defesa é a aplicação de atividades de verificação. Apesar de estarem incluídas no sistema HACCP, é preferível separar as etapas, pois

existem as medidas implementadas para a prevenção e as medidas que verificam as medidas anteriores.

Tal como foi dito anteriormente, existem diversos perigos na Segurança dos Alimentos, que podem dividir-se em perigos químicos, perigos biológicos e perigos físicos.

Em relação aos perigos químicos, estes podem estar presentes devido à produção animal, como por exemplo a presença de resíduos farmacológicos. Contudo, algumas substâncias são estritamente proibidas como é o caso de β -agonistas, tireostáticos, nitrofuranos e cloranfenicol. Da mesma forma que existem substâncias proibidas também existem substâncias que são permitidas, não devendo ultrapassar os valores limites estabelecidos pela legislação. Estas substâncias são, por exemplo, os antibióticos. No entanto existem substâncias em que não é necessário estabelecer um valor limite, pois são consideradas seguras. São exemplos, os componentes inorgânicos, como o cálcio, e os componentes orgânicos como a cafeína. Dois exemplos específicos de perigos químicos são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e aminas biogénicas. HPAs são compostos orgânicos que resultam de uma combustão incompleta de matéria orgânica, tendo como consequência efeitos carcinogénicos e genotóxicos. As aminas biogénicas são compostos químicos que resultam da descarboxilação de aminoácidos das proteínas presentes nos produtos à base de carne por parte de microrganismos, podendo ser prejudiciais para a saúde do consumidor (Potes *et al.*, 2018).

No que toca aos perigos biológicos, poderá ocorrer a presença de parasitas como *Toxoplasma gondii*, e de bactérias patogénicas como *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. A incidência destas na carne (matéria-prima) é de 97% e 8,8%, para a *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, respetivamente. Contudo, no final do processo de fabrico (produto acabado) não é detetada a presença de *L. monocytogenes*. No caso dos enchidos curados é detetada a presença quer da *Salmonella* spp. quer de *L. monocytogenes*. Uma das causas destes valores de incidência são os procedimentos nos

matadouros, e a continuação da contaminação ao longo do processo de preparação e transformação da carne (Potes *et al.*, 2018).

Ao longo do processo de fabrico de enchidos há a perda de peso, resultante da etapa de secagem, que pode influenciar a segurança e qualidade dos mesmos. Caso haja uma rápida secagem do produto, a tripa utilizada sofrerá um endurecimento impedindo a perda de humidade, resultando numa deterioração interna pela ação de bactérias anaeróbias. No entanto, se a secagem do produto for lenta e o produto teve um alto teor de humidade haverá o crescimento de bolores, leveduras e bactérias na superfície do enchido. Como consequência do crescimento destes microrganismos haverá a deterioração do produto, e este terá um sabor desagradável (Lonergan *et al.*, 2019).

Os perigos físicos podem ser de diversos tipos, como inclusão no enchido de ossos, vidros, metal, pedras, etc, mas não se abordarão no âmbito deste trabalho. Este tipo de perigos pode ter origem em diversas situações, como por exemplo contaminação da matéria prima; fraca manutenção dos equipamentos utilizados ou procedimentos inadequados (Hui, 2012).

2.2. Enchidos Tradicionais

Inicialmente a produção de enchidos tinha como objetivo a preservação da carne, pois esta é uma fonte de proteína animal importante em certas populações rurais (Dias *et al.*, 2018). Atualmente na maioria dos países europeus o consumo de enchidos tradicionais aumentou. Contudo dentro do setor de produtos cárneos processados existem duas categorias principais: os produtos com origem numa produção mais tradicional, (bastante frequente no norte de Portugal) e os produtos com origem na produção industrializada.

Em relação à primeira categoria, produtos com origem numa produção tradicional, os animais são criados em quintas e o processo de produção é realizado em pequenas

unidades de produção, sendo que o produto final será vendido diretamente pelo agricultor. Na segunda categoria, produtos com origem na produção industrializada, a matéria-prima pode ser de matadouros locais, nomeadamente em Portugal, Espanha e Itália. O produto final será vendido diretamente pela unidade de produção quer no mercado local quer para restaurantes tradicionais e *gourmet* (Talon *et al.*, 2007).

Os enchidos são produzidos principalmente nos países ocidentais, especialmente nos países mediterrânicos. Nestes existe uma grande diversidade de enchidos tradicionais, no caso de Portugal um dos enchidos mais populares é o “Paio do Alentejo”. Este tem um grande valor comercial, é produzido em pequenas unidades de produção com recurso a tecnologias modernas (Elias *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2017).

O processo de produção de enchidos compreende vários passos: seleção da matéria-prima; miga; preparação da massa; maturação das massas das carnes; enchimento e cura. Como matéria-prima a mais utilizada é a carne de porco seguida pela carne bovina, esta escolha tem como objetivo a produção de produtos cárneos com as características organolépticas desejadas pelo consumidor. Por exemplo, caso seja utilizada uma carne com grande quantidade de gordura poderá ocorrer menor retenção de água, pois, há uma menor quantidade de proteínas (responsáveis pela retenção de água) (Laranjo *et al.*, 2017), logo o produto final não terá a firmeza desejada nem haverá uma boa ligação das massas. Da mesma forma que existem problemas associados à utilização de carnes gordas, também existem problemas associados a carnes magras, como por exemplo a rápida secagem do produto final, quebras de peso, bem como problemas relacionados com a aparência e textura do produto final (Laranjo & Elias, 2015).

Após a seleção da matéria-prima desejada segue-se o passo da miga da mesma, ou seja, há a redução da matéria-prima a pequenos fragmentos (as suas dimensões não são fixas, pois cada tipo de enchido requer tamanho diferente de fragmentos). Este passo deve ser realizado com temperaturas entre -5 °C a 0 °C, de forma a que não haja libertação da gordura intramuscular, quando a matéria-prima é carne gorda, pois caso isso aconteça,

durante a cura o enchido sofrerá uma alteração de cor. De seguida são adicionados os ingredientes necessários para o tipo de enchido que se pretende (água, vinho, condimentos e aditivos), e a mistura obtida denomina-se massa. No caso dos enchidos com um processo tradicional é costume a adição de nitritos e nitratos, que são conservantes. Estes têm a capacidade de estabilizar a cor do enchido. São também adicionados antioxidantes e gelificantes de modo a que haja um aumento da retenção de água (Laranjo & Elias, 2015).

No que toca à maturação das massas de carne, esta resulta da ação do sal, água e microrganismos levando à interação dos ingredientes presentes na massa. Este processo deverá ocorrer num ambiente cuja temperatura varie entre 0 °C e 10 °C e humidade entre 90% e 95%. Caso se trate de um processo tradicional esta etapa tem a duração de 2 a 4 dias, no entanto em processos industrializados o tempo é significativamente reduzido, cerca de 24 horas a 48 horas. Após a maturação das massas, procede-se ao enchimento do produto utilizando um invólucro adequado e o produto resultante é submetido a um processo de cura. Este processo é baseado na exposição do enchido ao fumo (obtido pela combustão de madeiras não resinosas). Após a fumagem, o enchido é colocado numa câmara de refrigeração, humidade entre 75% a 80% e ao abrigo da luz. O objetivo deste processo é a alteração do aroma, sabor e cor nos enchidos, bem como o efeito conservante e antioxidante e alteração da textura do enchido (Laranjo & Elias, 2015).

2.2.1. Proteólise

Ao longo do processo de fabrico de enchidos curados, ocorre a proteólise. A proteólise é um processo feito por enzimas endógenas à carne e por enzimas de origem microbiana formando péptidos e aminoácidos. Este processo influencia o sabor do produto final, pois os péptidos e aminoácidos formados servem como substrato para microrganismos (como por exemplo, estafilococos coagulase-negativos, sendo por vezes utilizados como

culturas de arranque para melhorar as características organolépticas) onde são transformados em compostos de sabor. De modo a estudar a forma como ocorre a proteólise nos enchidos curados, são utilizadas técnicas eletroforéticas onde são determinados o azoto proteico, não-proteico e livre. Em termos de acidez (pH) os enchidos encontram-se divididos em dois grupos principais: os enchidos do Norte da Europa e os enchidos do Sul da Europa. Em ambos os casos, os valores de pH diminuem durante a fermentação (pH <5,0), contudo, nos enchidos do Norte os valores de pH permanecem relativamente iguais ao longo da maturação, enquanto que nos enchidos no Sul, os valores aumentam ao longo da maturação resultando em valores finais de pH entre 5,5 a 6,0 (Berardo *et al.*, 2017).

2.2.2. Atividade da água

No fabrico de enchidos curados existem dois passos principais para a diminuição da atividade da água (a_w): o processo de fermentação e a maturação. Nestes passos ocorre a desidratação do enchido (sendo mais acentuada durante a maturação), onde metade do conteúdo de água é evaporado. Como resultado há a diminuição da a_w , o que leva a uma maior segurança do produto. Esta diminuição é potenciada pela fermentação láctica que diminui também o pH. Porém, o aumento dos valores da a_w promovem o aumento do crescimento de estafilococos coagulase-negativos que por sua vez melhoram o perfil sensorial dos produtos através de reações bioquímicas contendo lípidos e aminoácidos (Tabanelli *et al.*, 2013; Laranjo *et al.*, 2015).

2.2.3. Nitratos e Nitritos

Nitratos são aniões produzidos naturalmente pelo corpo humano através da oxidação do óxido nítrico (NO), contudo são aplicados na produção de alimentos cárneos sendo transformados em nitritos. Porém, a síntese endógena, à fisiologia humana, de nitratos é

considerada um contribuinte relevante para a exposição do ser humano aos nitratos. Também o consumo de vegetais é considerado como o maior responsável pela ingestão de nitratos, uma vez que representam cerca de 80% da mesma. No entanto, apenas <5% da ingestão de nitrito e nitrato é devido ao consumo de enchidos curados (Bryan & van Grinsven, 2013).

Contudo, estes compostos têm algum impacto na saúde, muitas vezes dependente do metabolismo de cada indivíduo, tal como da presença de outros componentes que podem ser ingeridos juntamente com os nitratos. Ao consumir alimentos aos quais foram adicionados nitratos, estes serão absorvidos no intestino delgado onde são misturados com os nitratos endógenos e após essa mistura torna-se possível a sua distribuição pelo corpo humano. Uma vez que os nitratos são considerados aniões relativamente pequenos a sua farmacocinética sugere que estes são reabsorvidos nos túbulos renais e excretados diretamente pela urina ou pela conversão em ureia (Bryan & van Grinsven, 2013).

Em relação aos nitritos, a sua ação antimicrobiana foi descoberta na década de 1920 e também possuem a capacidade de promover a cor e sabor característicos de enchidos curados. Quando aplicados nos enchidos curados com uma concentração de 200 mg/kg e valor de pH igual a 6, os nitritos conseguem inibir estirpes de *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e esporos de *Clostridium botulinum*, o que é muito importante uma vez que os esporos sobrevivem a processamentos térmicos. Contudo esta capacidade inibitória pode ser aumentada através da redução de pH. No entanto, o uso de nitratos e nitritos na produção de alimentos tem sido reduzido, pois descobriu-se que a reação do nitrito com aminas secundárias forma N-nitrosaminas que são consideradas carcinogénicas (Adams & Moss, 2009a).

2.2.4. Aminas Biogénicas

As aminas biogénicas (AB) são grupos de compostos básicos de azoto. As AB têm um papel importante no metabolismo e para a viabilidade celular. A principal fonte de AB é a descarboxilação de aminoácidos feita por diversos microrganismos (Pereira *et al.*, 2018). As aminas podem ser classificadas de acordo com a sua origem como endógenas (por exemplo, espermina e espermidina), ou seja, são formadas naturalmente no organismo humano, ou como exógenas (por exemplo, histamina, serotonina, triptamina, putrescina e cadaverina), resultando da descarboxilação de microrganismos. Consoante a ação que têm no corpo humano, dividem-se em dois grupos: vasoativas e psicoativas. As AB vasoativas são a tiramina, triptamina, β -feniletilamina, isoamilamina, histamina e serotonina; enquanto que as psicoativas são norepinefrina, serotonina e dopamina (Elias *et al.*, 2018). De acordo com a sua estrutura química (**Figura 1**), as aminas biogénicas podem ser classificadas como monoaminas (β -feniletilamina e tiramina), diaminas (histamina, tiramina, cadaverina e putrescina) e poliaminas (espermidina e espermina). (Elias *et al.*, 2018).

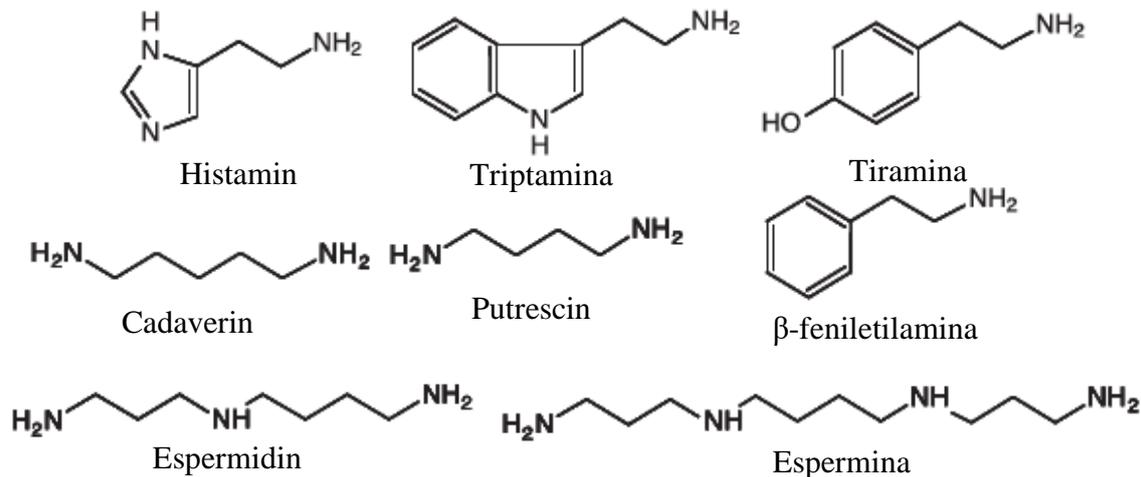


Figura 1. Estrutura química das aminas biogénicas em estudo (adaptado de (Bover-Cid *et al.*, 2014)).

Para que as AB possam ser formadas nos produtos alimentares existem características que necessitam ser satisfeitas, por norma ao longo do processamento de alimentos uma vez que têm alto teor de aminoácidos livres (Pereira *et al.*, 2018). Como no caso dos enchidos curados estes sofrem proteólise (Berardo *et al.*, 2017), que leva à formação aminoácidos livres que por sua vez dão origem às AB. Os enchidos são alimentos fermentados, de acordo com (Pereira *et al.*, 2018) as AB com maior prevalência neste tipo de alimentos são: histamina, triptamina, β -feniletilamina, tiramina, putrescina e cadaverina. Apesar de as AB terem um papel importante na viabilidade celular, os mamíferos têm a capacidade de metabolizar as AB que resultam de uma ingestão normal diária, pois possuem um sistema de desintoxicação eficiente. Contudo quando ocorre uma ingestão elevada de amins podem ocorrer efeitos tóxicos, nomeadamente reações de intolerância, intoxicação ou envenenamento. No entanto, as AB mais preocupantes em relação à saúde humana são: histamina, tiramina e putrescina (Pereira *et al.*, 2018).

A nível fisiológico as AB são consideradas neurotransmissores, desempenhando funções no comportamento emocional e na regulação do relógio biológico. Estas podem ser quebradas pelo corpo humano através da enzima monoamina oxidase-A (MOA), contudo em casos de depressão são receitados inibidores de MOA para impedir a destruição de amins importantes no comportamento emocional (Fiedorowicz & Swartz, 2004; Youdim *et al.*, 2006; Elias *et al.*, 2018).

2.2.5. Nitrosaminas

Durante o fabrico de quase todos os enchidos curados há a adição de nitratos e nitritos com o objetivo de evitar o crescimento de microrganismos patogénicos, como por exemplo *Clostridium botulinum*. No entanto, os nitritos podem ser convertidos no agente nitrosante NO^+ , que reage com amins biogénicas formando N-nitrosaminas (De Mey *et al.*, 2014).

Em 1864 foi observado, pela primeira vez, a interação do ácido nitroso com aminas primárias aromáticas dando origem a N-nitrosaminas. Estas são compostos químicos, onde um grupo nitroso está ligado a uma amina. Estes compostos são hidrofílicos, e encontram-se documentados cerca de 300 congéneres, sendo também monitorizados devido ao seu impacto cancerígeno em 30 espécies animais, onde foram descritos tumores no fígado, pulmões, esófago, mucosa nasal, bexiga, língua, estômago e pâncreas (Gushgari & Halden, 2018).

Existem três processos de formação de N-nitrosaminas através de aminas primárias, secundárias e terciárias. Quando formadas através de aminas primárias as N-nitrosaminas são instáveis, e de curta duração, uma vez que têm uma baixa densidade de eletrões no espaço circundante do átomo de nitrogénio, e conseqüentemente há uma rápida decomposição em gás nitrogénio e carbono.

Em relação à formação através de aminas secundárias, as N-nitrosaminas resultantes são mais estáveis quimicamente, em comparação às N-nitrosaminas formadas a partir das aminas primárias. Neste processo o carbonilo de carbamato é um nucleófilo ligado ao ião nitrito, sendo que a ligação N-nitrosamina é formada em solventes à base de aminas secundárias. De modo a fortalecer a ligação N-N, os eletrões N-amino “*lone pair*” são deslocalizados com o sistema eletrão- π do nitroso. No que respeita à formação de N-nitrosaminas através de aminas terciárias, este é um processo indireto, pois as aminas terciárias não formam diretamente N-nitrosaminas por falta de hidrogénio amina. Assim, as aminas terciárias sofrem degradação a altas temperaturas e reações com os componentes do gás de combustão, resultando em aminas secundárias. Também existem as alcanolaminas terciárias com capacidade de formação de N-nitrosaminas, mas como há um impedimento estérico há menor formação de N-nitrosaminas e menor rendimento de acordo com o consumo de nitrito, o que não acontece com as aminas secundárias (Chen *et al.*, 2018).

2.2.6. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são compostos químicos constituídos por dois anéis aromáticos fundidos, pertencem a uma classe de químicos composta por mais de 100 combinações diferentes (Crawford & Quinn, 2017; Santos *et al.*, 2019). Recentemente os HPA foram incluídos numa lista de potenciais cancerígenos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC – *International Agency for Research on Cancer*) (Santos *et al.*, 2019).

Os HPA são produzidos nos enchidos curados durante a etapa de fumagem, pois são resultantes da combustão incompleta de matéria orgânica. Assim, de modo a evitar a produção de HPA é aconselhado a não exposição dos enchidos curados a temperaturas de combustão superiores a 750 °C (Alves *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019). A sua absorção no organismo é feita maioritariamente através da digestão, contudo também pode ocorrer por inalação e por contacto com a pele (Santos *et al.*, 2019). Os níveis elevados de HPA em alimentos fumados podem ter origem nas más práticas de fumagem, como por exemplo o contacto direto do alimento com o fumo quente e a intensidade da fumagem (Wenzl & Zelinkova, 2018).

De modo a se prever quais as populações em risco pela exposição a HPA são utilizados biomarcadores em triagens rápidas de populações vulneráveis, bem como a aplicação as medidas de prevenção adequadas. Em relação aos biomarcadores de exposição existem os metabolitos hidroxilados, aductos de DNA e aductos proteicos. No que respeita aos metabolitos hidroxilados (OH-HPA), estes são os mais utilizados como biomarcadores e são produzidos através da biotransformação dos HPA. Assim, para a avaliação da concentração dos OH-HPA no organismo são efetuadas análises urinárias. Deste modo é possível perceber quais os locais com maior exposição, bem como as profissões (ex: trabalhadores metalúrgicos). Estima-se que a meia-vida de HPA, em indivíduos com elevadas concentrações na urina, seja entre 12h a 18h. Os aductos de DNA são metabolitos altamente reativos, como tal é importante a sua monitorização para a exposição das populações a HPA carcinogénicos, sendo também utilizados em estudos

epidemiológicos. Por último, os aductos proteicos são formados de modo similar aos aductos de DNA, ou seja, há a reação de um metabolito dio epóxido com uma molécula de proteína. Assim, os aductos de DNA têm sido substituídos pelos aductos proteicos, uma vez que os metabolitos carcinogénicos de HPA ligam-se com uma cinética dose-resposta similar tanto no DNA como nas proteínas, e os aductos proteicos são mais estáveis e não são removidos por processos de reparação (Banks *et al.*, 2019).

2.3. Microbiota de interesse tecnológico

2.3.1. Bactérias do ácido láctico

As Bactérias do ácido láctico (BAL) são bactérias com morfologia de bastonetes (bacilos) ou cocos Gram-positivo, não esporulados, catalase e oxidase negativas e a maioria são consideradas anaeróbias aerotolerantes. Assim, as BAL têm a capacidade de absorver oxigénio através das flavoproteínas oxidases transformando o oxigénio em peróxido de hidrogénio e/ou reoxidam o NADH (que é produzido durante a desidrogenação de açúcares).

Através da fermentação de hidratos de carbono é possível obter energia celular para a produção de ácido láctico, e através do tipo de fermentação as BAL são divididas em dois grupos: as homolácticas e as heterolácticas (**Figura 2**). As primeiras produzem maioritariamente lactato a partir da fermentação de glicose e a produção dá-se pela via glicolítica *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP) começando pela fosforilação e isomerização da molécula de seis carbonos, depois dá-se a clivagem da mesma com recurso à enzima adolase resultando em triose-3-fosfato, de seguida dá-se a sua conversão em piruvato, durante esta conversão é produzido ATP por fosforilação em dois locais resultando num rendimento de duas moléculas de ATP. De modo a regenerar o NAD¹ consumido no processo, o piruvato é reduzido a lactato com recurso a uma molécula de NADH (Adams & Moss, 2009b).

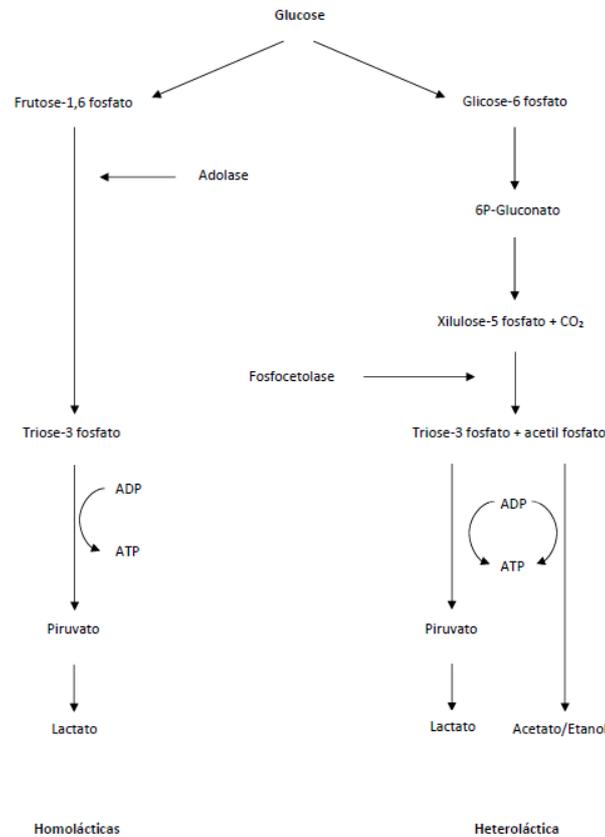


Figura 2. Mapa metabólico das Bactérias do ácido láctico (adaptado de Adams, M. R. & Moss, M. O, 2009).

Em relação às BAL heterolácticas, estas produzem de forma equimolar lactato, acetato/etanol e dióxido de carbono, como não possuem aldose transformam a glicose (hexose) em pentose com recurso a uma sequência de oxidação e descarboxilação. Após esta transformação, a pentose é clivada com o auxílio da enzima fosfocetolase em triose-3-fosfato e acetil fosfato. A triose-3-fosfato será convertida em piruvato através da via glicolítica (processo idêntico às homolácticas), resultando em duas moléculas de ATP. Contudo, quando na presença de oxigénio é possível regenerar o NAD⁺ através de NADH oxigenase e peroxidase, desta forma o acetil fosfato fica disponível para ser convertido em acetato. Como resultado há um maior rendimento de moléculas de ATP

em relação às bactérias homoláticas, bem como uma maior taxa de crescimento (Adams & Moss, 2009b).

Atualmente as BAL são muito usadas em processos alimentares com o objetivo de melhorar a qualidade e segurança dos alimentos, uma vez que têm a capacidade de inibir outros microrganismos. Esta inibição deve-se à diminuição de pH, bem como à produção de ácidos láctico e acético. Também existe a produção de bacteriocinas (proteínas ou péptidos bactericidas que atuam contra espécies próximas ao organismo produtor, neste caso as BAL), como são consideradas “produtos naturais” são utilizadas como conservantes alimentares de forma mais aceitável. A única bacteriocina produzida pelas BAL com aplicabilidade na indústria alimentar designa-se de nisina (Adams & Moss, 2009b) e é produzida por estirpes de *Lactococcus lactis*, está disponível a nível comercial como conservante alimentar desde o início de 1950, exceto nos Estados Unidos que apenas ficou disponível em 1988. Esta é um polipéptido anfifílico constituído por 34 aminoácidos, resistente ao calor, pH ácido e pertence a um grupo de antimicrobianos designado por lantibióticos (Adams & Moss, 2009b).

Em comparação com outras bacteriocinas produzidas por BAL, a nisina possui um espectro de ação relativamente amplo contra bactérias Gram-positivo, uma vez que esta cria poros ao longo da membrana plasmática levando à perda dos componentes citoplasmáticos e conseqüente quebra do potencial de transmembrana. No caso das bactérias Gram-negativo, estes possuem uma membrana externa que impede a chegada da nisina ao local de ação, tornando-se resistentes à mesma. No entanto, a nisina também tem a capacidade de inibir o crescimento de esporos em diversos alimentos, como por exemplo o queijo processado, o que leva a um aumento do prazo de validade do alimento e também permite um processamento térmico mais leve, não havendo a perda de propriedades do alimento que são sensíveis ao calor (Adams & Moss, 2009b).

2.3.2. Estafilococos

Os estafilococos são cocos Gram-positivo, catalase positiva, anaeróbios facultativos, imóveis, comensais das membranas mucosas de humanos e animais de sangue quente, em agar sangue são β -hemolíticos, à exceção de algumas estirpes de *S. aureus* que são α - ou γ -hemolíticos (Smyth & McNamee, 2008; Podkowik *et al.*, 2013).

Quando os estafilococos não possuem a capacidade de produzir coagulase livre, são considerados coagulase negativos, como por exemplo *S. albus* e *S. epidermidis*. Apesar de não serem considerados, normalmente, patogénicos uma vez que estabelecem relações comensais com humanos e animais, cada vez mais têm sido reconhecidos como causadores de diversas infeções (Rogers *et al.*, 2009; Podkowik *et al.*, 2013). Nos anos de 1960 os estafilococos coagulase negativos (ECN) eram identificados de acordo com a sua morfologia colonial e testes bioquímicos, sendo mais tarde utilizados também testes fisiológicos, de suscetibilidade e caracterização da parede celular. Atualmente a identificação é feita com métodos moleculares, como por exemplo, reação de polimerase em cadeia (PCR), eletroforese em gel de campo pulsado e sequenciação do DNA genómico (Rogers *et al.*, 2009). Como os ECN são considerados flora positiva em alimentos têm sido aplicados na indústria alimentar como culturas de arranque. Esta aplicação deve-se ao facto de os ECN possuírem um impacto positivo na fermentação e nas características sensoriais nos alimentos, como produtos cárneos e queijos (Podkowik *et al.*, 2013).

2.4. Microbiota indicadora de higiene

2.4.1. Enterobactérias

As enterobactérias são bactérias ubiqüitárias, ou seja, os membros da família *Enterobacteriaceae* podem ser encontrados no solo, em vegetais e em animais. As espécies provenientes da microbiota humana muitas vezes são patogénicas, causando

infecções intestinais (diarreia) e infecções extraintestinais, são exemplos destas espécies a *Salmonella enterica* serotipo Typhi, *Shigella* e *Escherichia coli*. No caso de infeção intestinal a transmissão é, normalmente, fecal-oral podendo acontecer através de contato direto com animais, com o ambiente ou de pessoa para pessoa (Jenkins *et al.*, 2017).

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por bactérias Gram-negativo, bacilos não esporulados, oxidase negativa, catalase positiva, móveis com o auxílio de flagelos (à exceção da *Klebsiella granulomatis*), reduzem nitratos a nitritos, fermentadoras de glucose e a temperatura ótima de crescimento é 37 °C, podendo crescer em atmosfera aeróbica e anaeróbica. A identificação laboratorial de enterobactérias pode ser feita através da atividade bioquímica, com recurso a um teste bioquímico comercial, como por exemplo as galerias API 20E da BioMérieux, onde os resultados obtidos são comparados com uma base de dados de referência que contém a percentagem dos resultados positivos para cada par espécie/substrato. Para algumas espécies a identificação é feita por serotipagem, por norma este método é aplicado a espécies com alta patogenicidade e elevado significado clínico, nomeadamente estirpes de *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli*. A serotipagem é baseada na variação serotípica de antígenos superficiais O (somático, corresponde à cadeia lateral do polissacarídeo do lipopolissacarídeo), H (flagelar) e K (capsular). Contudo, existem espécies que não possuem cápsula como é o caso da *E. coli* e *Salmonella* (Jenkins *et al.*, 2017).

2.5. Microbiota patogénica

2.5.1. Clostrídios

O género *Clostridium* spp. é considerado bastante grande, pois nele encontram-se cerca de 100 espécies e foi descrito pela primeira vez em 1880. Contudo, este grupo mostra uma heterogeneidade a nível filogenético, são considerados omnipresentes e podem ser encontrados, normalmente, no solo, sedimentos marinhos, produtos animais e vegetais, trato intestinal humano e feridas de infeções nos tecidos moles de animais e humanos.

Para que um microrganismo possa ser inserido neste género deverá possuir características como: ser anaeróbio ou microaerofílico; capacidade para produzir endósporos; ser Gram-positivo; ter incapacidade para realizar a redução dissimilatória do sulfato e na maioria dos casos ter mobilidade (Blaschek, 2014).

No entanto, os clostrídios podem estar presentes em diversos produtos cárneos, como por exemplo os enchidos curados. De modo a determinar a sua presença são realizadas análises para avaliar a qualidade do produto utilizando dois indicadores microbianos (anaeróbios redutores de sulfito e *Clostridium perfringens*). Através dos anaeróbios redutores de sulfito é possível estimar a quantidade de clostrídios ou bactérias formadoras de esporos (Prevost *et al.*, 2013).

Em relação à produção de esporos, esta apenas acontece em condições anaeróbias, no entanto em algumas espécies a produção ocorre com alguma dificuldade, sendo necessários meios de cultura especiais. Consoante a espécie de clostrídios o local de produção de esporo também muda, podendo ocorrer numa posição central, subterminal e terminal, esta localização possui um valor taxonómico importante. No que toca ao metabolismo, as espécies de clostrídios podem ser classificadas como sacarolíticas ou como proteolíticas, no entanto as estirpes pertencentes ao mesmo grupo não possuem similaridade a nível genético (DNA) (Blaschek, 2014).

2.5.2. *Listeria*

De entre as seis espécies conhecidas do género *Listeria*, a *L. monocytogenes* é a única espécie patogénica importante para a saúde do ser humano, contudo outras três espécies (nomeadamente a *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii*) têm sido associadas a vários casos de doença em seres humanos. Em 1926 a *L. monocytogenes* causou uma infeção em ratos de laboratório que terá sido associada aos monócitos do sangue periférico por ser um patógeno intracelular, tendo sido então descrito primeiramente como

Bacterium monocytogenes bem como um agente patogénico quer para os animais quer para o ser humano.

L. monocytogenes é uma bactéria com as seguintes características: coco-bacilos Gram-positivo contendo flagelos periféricos, anaeróbia facultativa, catalase positiva, oxidase negativa, não esporulada, possui uma mobilidade em modo cambalhota. Ao ser cultivada em agar sangue é caracterizada pela β -hemólise, libertando também listeriolisina que atua com a hemolisina produzida pelos *Staphylococcus aureus* aumentando a sua hemólise em agar sangue. Esta reação é utilizada para diferenciar duas espécies de *Listeria* (*L. monocytogenes* e *L. innocua*). Esta bactéria tem a capacidade de crescer num largo espectro de condições, como por exemplo, consegue crescer com temperatura entre 0°C e 42°C sendo a temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 35 °C, caso esta seja cultivada a uma temperatura inferior a 5°C irá crescer de forma lenta (com um tempo de geração de 13h a 130h). Como cresce dentro de um largo espectro de temperatura é um microrganismo que recebe alguma atenção por parte das entidades responsáveis, pois é contaminadora de vários alimentos como o leite não pasteurizado e produtos cárneos (Adams & Moss, 2009c).

Contudo, uma forma de inibir o seu crescimento nos alimentos é através da alteração do pH dos mesmos, uma vez que a *Listeria* não tem a capacidade de crescer em ambientes com valores de pH abaixo de 5,5. No caso da *L. monocytogenes* esta também é halófila, ou seja, cresce na presença do sal (10% a 16% NaCl) e com valor de pH igual a 6,0 (Adams & Moss, 2009c).

Do ponto de vista clínico *L. monocytogenes*, como dito anteriormente, é um patogénico intracelular (facultativo) que de forma a sobreviver necessita de se multiplicar no interior de células, neste caso de células que pertencem ao sistema monócito-macrófago. Para tal, é necessário que a bactéria invada as células através da endocitose (processo promovido pelos vários fatores de virulência, tais como internalina, proteína de superfície bacteriana e proteína extracelular). A internalização faz com que a bactéria seja envolvida num fagossoma, e para sobreviver terá de sair dele o mais rápido

possível, pois caso a bactéria se funda com um lisossoma não conseguirá sobreviver. A *L. monocytogenes* também produz listeriolisina O (LLO) que decompõe a bicamada lipídica da membrana dos fagossomas, permitindo a sua saída do mesmo. Assim, os sujeitos mais suscetíveis a infeções são mulheres grávidas, idosos, crianças e imunocomprometidos. Estas infeções podem causar septicemia, meningite, meningoencefalite e endocardite (Adams & Moss, 2009c).

2.5.3. *Salmonella* spp.

A maioria das salmonelas são consideradas patogénicas para o ser humano, no entanto entre as mesmas existem diferenças quanto às suas características, bem como à severidade das doenças que causam. Atualmente são consideradas como a principal causa de doenças alimentares. No ano de 1989 a incidência de salmoneloses na Europa era cerca de 50 em cada 100 000 habitantes (Adams & Moss, 2009c). Em 2017 foram registados 92 642 casos de salmonelose em 30 países da Europa, sendo a incidência de 19,6 em cada 100 000 habitantes (ECDC, 2020). O estudo de ECDC-EFSA (2020) mostrou que desde Fevereiro de 2017 até 14 de Janeiro de 2020, foram confirmados 656 casos de salmonelose, sendo a espécie responsável a *Salmonella* Enteritidis, através do consumo de ovos.

A *Salmonella* spp. pertence ao grupo das *Enterobacteriaceae*, são Gram-negativo, bacilos não esporulados, anaeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa e geralmente móveis com o auxílio de flagelos peritricos. A sua temperatura de crescimento ótima é de 37°C, mas pode crescer com temperaturas entre 5°C e 47°C. contudo podem ser facilmente destruídas com os processos de pasteurização, uma vez que são sensíveis ao calor. Apesar de o valor mínimo da a_w para o crescimento de *Salmonella* spp. ser de 0,93, esta tem a capacidade de sobreviver em alimentos secos, e o valor ótimo de pH para crescimento é de 7. No que respeita à sua patogenicidade,

Salmonella spp. provoca diversas patologias clínicas como a enterite e a doença sistémica (Adams & Moss, 2009c).

Um dos métodos de isolamento e identificação de salmonelas é um processo de 5 passos com recurso a técnicas de cultura tradicionais. Este processo começa com um pré-enriquecimento num meio de cultura não seletivo. Este passo permite a recuperação de salmonela, pois há a recuperação das células que foram danificadas. De seguida há um enriquecimento seletivo com o objetivo de aumentar o número de células de salmonela, neste processo é maioritariamente usado o caldo de selenito-cistina, pois a cistina promove o crescimento de salmonela. Após este processo é necessário confirmar os resultados através de testes bioquímicos (Adams & Moss, 2009c).

2.6. Estudos realizados

Ao longo dos anos têm sido feitos estudos em diferentes enchidos curados com diversos objetivos, sendo o principal conhecer a sua microbiota (de interesse tecnológico, indicadora de higiene e patogénica) para que se possa promover a sua segurança bem como a sua qualidade. Assim, apesar de nesta dissertação o enchido estudado ser o paio, no **Quadro 1** é possível observar os diversos enchidos já estudados, como por exemplo o *sucuk* da Turquia ou o *fuet* da Espanha. Deste modo é possível perceber como melhorar a segurança dos enchidos curados, uma vez que existem mais estudos previamente realizados. Apesar de os enchidos no **Quadro 1** não serem paio, este proporciona uma informação relevante, pois é possível observar algumas diferenças bem como semelhanças entre diferentes enchidos quer no mesmo país quer de países diferentes.

Quadro 1. Estudos realizados no âmbito do tema desta dissertação de mestrado.

País	Produto	Análises realizadas	Resultados	Referência
Turquia	Soudjouck	Níveis de nitratos e nitritos, pH e microbiologia	<u>Microbiologia:</u> $\geq 10^7$ ufc/g bactérias aeróbias, $\geq 10^8$ ufc/g <i>Lactobacillus</i> , $\geq 10^6$ ufc/g <i>Micrococcus</i> / estafilococos, $\geq 10^4$ ufc/g enterobactérias, coliformes e enterococos, 10^2 ufc/g estafilococos coagulase-positiva e <i>E. coli</i> em 73%, 40%, 23%, 15%, 11%, 41%, 9% e 5% das amostras, respetivamente. <u>Níveis de nitratos, nitritos e pH,</u> 18%, 11% e 32% das amostras continham valores acima dos permitidos.	Siriken <i>et al.</i> (2006)
China	Salame e Lachang (Linguiça curada a seco chinesa e Salsicha defumada chinesa)	Níveis de nitrato, pH a_w	<u>Níveis de nitratos:</u> 1.82 mgKg ⁻¹ , 4.31 mgKg ⁻¹ e 3.48 mgKg ⁻¹ , para salame, linguiça curada a seco e salsicha defumada, respetivamente. <u>Análise de pH:</u> 5.02, 5.92, 5.73, para salame, linguiça curada a seco e salsicha defumada, respetivamente. <u>Análise da a_w:</u> 0.93, 0.85, 0.83, para salame, linguiça curada a seco e salsicha defumada, respetivamente.	Wang <i>et al.</i> (2018)
(Itália e Estados Unidos)	Enchidos curados	Microbiologia, pH e a_w	<u>Microbiologia:</u> 6.68 log ufc/g de bactérias mesófilas totais, 5.08 log ufc/g de enterobactérias e 3.38 ufc/g de <i>Staphylococcus aureus</i> presumido. Foram detetadas <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria</i> spp. em 6 e 8 amostras em 15, respetivamente. <u>Análise de pH e a_w:</u> 6.58 e 0.968, respetivamente.	Cenci-Goga <i>et al.</i> (2012)
Turquia	Sucuk	Microbiologia, pH e a_w	<u>Microbiologia:</u> 6.81 log ufc/g de bactérias mesófilas totais, 6.20 log ufc/g de BAL, 4.81 log ufc/g de enterobactérias e 4.83 log ufc/g de <i>Micrococcaceae</i> . <u>Análise de pH e a_w:</u> 5.73 e 0.98, respetivamente.	Soncu <i>et al.</i> (2018)
Espanha	Enchidos curados	Microbiologia, nitrato e nitrito, pH e a_w	<u>Análise de pH:</u> 5.09, 5.03 e 4.96, ao primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento, respetivamente. <u>Análise da a_w:</u> 0.887, 0.883 e 0.876, ao primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento, respetivamente. <u>Redução de nitrato:</u> aos 15% de redução registou-se um valor de pH de 5.04 e de a_w de 0.881. Aos 25% de redução registou-se um valor de pH de 5.00 e de a_w de 0.881. <u>Microbiologia:</u> bactérias mesófilas totais 7.6 log ufc/g, 7.5 log ufc/g e 6.5 log ufc/g; BAL 6.6 log ufc/g, 6.5 log ufc/g e 5.6 log ufc/g e cocos Gram-positivo 3.7 log ufc/g, 2.0 log ufc/g e 5.6 log ufc/g ao primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento, respetivamente. <u>Redução de nitrato:</u> aos 15% de redução registou-se um valor de bactérias mesófilas totais de 7.3 log ufc/g, BAL de 6.3 log ufc/g e cocos Gram-positivo de 2.9 log ufc/g. Aos 25% de redução registou-se um valor de bactérias mesófilas totais de 7.2 log ufc/g, BAL de 6.3 log ufc/g e cocos Gram-positivo de 2.9 log ufc/g	Perea-Sanz <i>et al.</i> (2019)
França	Enchidos fermentados	pH, a_w , nitrato e nitrito	<u>Análise de pH:</u> massa pré-enchimento entre 5.85 e 5.94; fermentação decréscimo para 5.05 e na	Christieans <i>et al.</i> (2018)

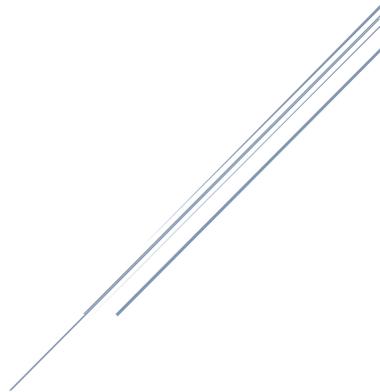
			<p>secagem aumento para valores entre 5.30 a 5.40. <u>Análise da a_w</u>: massa pré-enchimento igual a 0.97, fase da secagem varia 0.89 a 0.90. <u>Análises de nitrato e nitrito</u>: nitrato é convertido gradualmente em nitrito ao longo do processo. Não teve efeito inibitório em <i>Salmonella Typhimurium</i> e em <i>Listeria monocytogenes</i>.</p>	
Espanha	Enchidos fermentados	Redução de nitrato, microbiologia, pH e a_w	<p>Início do processo <u>Análise de pH</u>: 5.85, 5.83 e 5.88, no controlo, redução de 15 % de nitratos e redução de 25 % de nitratos, respetivamente. <u>Análise da a_w</u>: 0.981, 0.974, 0.975, no controlo, redução de 15 % de nitratos e redução de 25 % de nitratos, respetivamente. <u>Microbiologia</u>: bactérias mesófilas totais 6.84 log ufc/g, 6.88 log ufc/g e 6.87 log ufc/g; BAL 5.85 log ufc/g, 5.83 log ufc/g e 5.75 log ufc/g; enterobactérias 4.84 log ufc/g, 4.83 log ufc/g e 4.81 log ufc/g; cocos Gram-positivo 5.47 log ufc/g, 5.41 log ufc/g e 5.28 log ufc/g, no controlo, redução de 15 % de nitratos e redução de 25 % de nitratos, respetivamente. Final do processo <u>Análise de pH</u>: 4.99, 4.95 e 4.93, no controlo, redução de 15 % de nitratos e redução de 25 % de nitratos, respetivamente. <u>Análise da a_w</u>: 0.890, 0.894, 0.895, no controlo, redução de 15 % de nitratos e redução de 25 % de nitratos, respetivamente. <u>Microbiologia</u>: bactérias mesófilas totais 8.89 log ufc/g, 8.83 log ufc/g e 8.96 log ufc/g; BAL 6.98 log ufc/g, 6.94 log ufc/g e 6.96 log ufc/g; enterobactérias 2.39 log ufc/g, 3.24 log ufc/g e 3.33 log ufc/g; cocos Gram-positivo 4.49 log ufc/g, 4.33 log ufc/g e 4.39 log ufc/g, no controlo, redução de 15 % de nitratos e redução de 25 % de nitratos, respetivamente.</p>	Perea-Sanz <i>et al.</i> (2018)
Espanha	Enchidos fermentados	Microbiologia, pH, a_w ,	<p><u>Análise de pH</u>: Diminuição dos valores na fermentação de 6.0 para 4.8, e aumento na maturação atingindo valores entre 5.0 e 5.2. <u>Análise da a_w</u>: início do processo igual a 0.96 e no final 0.89. <u>Microbiologia</u>: As BAL aumentaram cerca de 2.5 log ufc/g durante a fermentação, sendo também a microbiota predominante até ao final da maturação. Foi observado um efeito inibitório dos nitratos/nitritos em relação ao crescimento de enterobactérias.</p>	Hospital <i>et al.</i> (2015)
Espanha	Enchidos fermentados	Microbiologia, pH e a_w . efeito de nitratos	<p><u>Análise de pH</u>: entre 5.7 e 6.3. <u>Análise da a_w</u>: entre 0.96 e 0.98. <u>Microbiologia</u>: na fermentação houve aumento na contagem de BAL, de 8 log ufc/g para 9 log ufc/g. Observou-se um efeito inibitório dos nitratos no crescimento de <i>Salmonella Typhimurium</i> no início da maturação.</p>	Hospital <i>et al.</i> (2014)
Espanha	Enchidos fermentados (<i>salchichón e fuet</i>)	Microbiologia, pH e a_w . efeito de nitratos	<p><u>Análise de pH</u>: diminuiu de 5.6 para 5.0 no salsichão e para 5.2 no fuet. <u>Análise da a_w</u>: diminuiu de 0.96 para valores entre 0.88 a 0.90 no final da maturação. <u>Microbiologia</u>: Houve uma contagem de BAL</p>	Hospital <i>et al.</i> (2016)

			entre 8 log ufc/g a 9 log ufc/g após a fermentação. Contudo não foi detetado alteração no crescimento de <i>Clostridium botulinum</i> .	
Espanha	Enchido fermentado (<i>salchichón</i>)	Microbiologia, pH e a_w . efeito de nitratos	<u>Microbiologia</u> : a contagem de <i>Listeria innocua</i> no produto final foi de 1.5 log ufc/g inferior no lote com concentração máxima de nitratos/nitritos ao comparar com os lotes de controlo e redução de nitratos/nitritos em 15 % e 25 %. A contagem de enterobactérias foi entre 1 log ufc/g a 2 log ufc/g nos lotes controlo e redução de nitratos/nitritos em 15 % e 25 %, enquanto que no lote com a concentração máxima de nitratos/nitritos não houve crescimento. <u>Análise de pH</u> : valor final de 4.8. <u>Análise da a_w</u> : decréscimo de 0.95 para 0.86-0.87 no produto final.	Hospital <i>et al.</i> (2012)
Itália	Enchido fermentado (<i>salami</i>)	Microbiologia e pH	<u>Análise de pH</u> : 6.02, 5.75, 5.85, 6.20 e 6.75, aos 0, 3, 7, 30 e 45 dias de fermentação. <u>Microbiologia</u> : BAL - 4.29 log ufc/g, 8.07 log ufc/g, 8.04 log ufc/g, 8.28 log ufc/g e 7.84 log ufc/g; estafilococos - 3.79 log ufc/g, 4.42 log ufc/g, 5.01 log ufc/g, 5.43 log ufc/g e 7.01 log ufc/g; enterobactérias - 2.19 log ufc/g, 2.06 log ufc/g, 1.59 log ufc/g, 1.98 log ufc/g e 1.74 log ufc/g; bactérias totais - 5.21 log ufc/g, 6.93 log ufc/g, 7.67 log ufc/g, 6.91 log ufc/g e 7.90 log ufc/g, aos 0, 3, 7, 30 e 45 dias de fermentação.	Greppi <i>et al.</i> (2015)
Portugal	Enchidos curados (Chouriço Preto – CP e Paio Preto – PP)	Microbiologia, pH, a_w e aminas biogénicas	<u>Análise de pH</u> : 4.96 para massa de carne, 5.17 e 5.4 para produto acabado (PP e CP) <u>Análise da a_w</u> : 0.96 para massa de carne, e nos produtos acabados com redução de sal e no controlo foram observadas diferenças significativas. <u>Microbiologia</u> : CP obteve-se as seguintes contagens: mesófilos – 7,16 log ufc/g, 6,39 log ufc/g e 7,59 log ufc/g; BAL – 6,78 log ufc/g, 7,13 log ufc/g e 8,24 log ufc/g; enterobactérias – 4,80 log ufc/g, 4,41 log ufc/g e 2,71 log ufc/g e estafilococos – 3,50 log ufc/g, 4,57 log ufc/g e 4,49 log ufc/g; no PP obteve-se as seguintes contagens: mesófilos – 7,16 log ufc/g, 6,35 log ufc/g e 6,42 log ufc/g; BAL – 6,78 log ufc/g, 8,12 log ufc/g e 6,75 log ufc/g; enterobactérias – 4,80 log ufc/g e 3,09 log ufc/g e estafilococos – 3,50 log ufc/g, 4,18 log ufc/g e 4,04 log ufc/g. <u>Aminas biogénicas</u> : o conteúdo total é de 88,86 mg/kg a 332,13 mg/kg. A putrescina corresponde a 40% do teor total, a triptamina corresponde a 20% e a tiramina corresponde a 15%.	Laranjo <i>et al.</i> (2017)
Portugal	Enchidos curados (Catalão e Salsichão)	Microbiologia, pH, a_w e aminas biogénicas	<u>Análise de pH</u> : diferenças significativas entre os produtos com redução de sal e o controlo <u>Análise da a_w</u> : diferenças significativas entre os produtos com redução de sal e o controlo, aos 35% de perda de peso no Catalão e aos 20% e 35% no Salsichão. <u>Microbiologia</u> : Catalão obteve-se as seguintes contagens: mesófilos – 6,70 log ufc/g, 4,42 log ufc/g e 4,92 log ufc/g; BAL – 4,91 log ufc/g, 6,25 log ufc/g e 5,23 log ufc/g; enterobactérias –	Laranjo <i>et al.</i> (2016)

			<p>6,40 log ufc/g, 5,00 log ufc/g e 0,43 log ufc/g e estafilococos coagulase negativos – 3,65 log ufc/g, 5,65 log ufc/g e 4,21 log ufc/g; no Salsichão obteve-se as seguintes contagens: mesófilos – 6,70 log ufc/g, 6,50 log ufc/g e 6,21 log ufc/g; BAL – 4,91 log ufc/g, 8,26 log ufc/g e 7,44 log ufc/g; enterobactérias – 6,40 log ufc/g, 3,96 log ufc/g e 3,96 log ufc/g e estafilococos coagulase negativos – 3,65 log ufc/g, 6,14 log ufc/g e 2,96 log ufc/g.</p> <p><u>Aminas biogénicas</u>: o seu conteúdo total no controlo é de 378,01 mg/kg e 390,14 mg/kg para o Catalão e Salsichão, respetivamente.</p>	
--	--	--	--	--

CAPÍTULO III

Objetivos



3. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é construir conhecimento que permita melhorar a segurança de enchidos curados. Para tal foram delineados os seguintes objetivos:

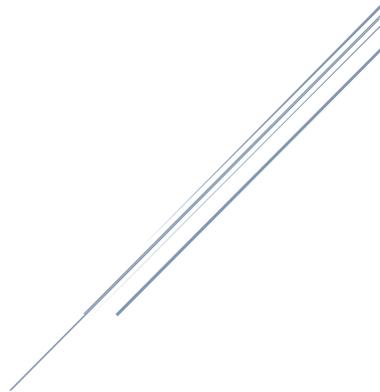
- ❖ Avaliar a evolução dos enchidos curados ao longo do fabrico para validar a sua segurança, nomeadamente a potencial multiplicação de *C. botulinum* entre outros microrganismos patogénicos.
- ❖ Avaliar as consequências da eliminação de nitratos e nitritos em relação à segurança sanitária dos enchidos curados.

O material biológico utilizado neste trabalho é o paio, onde na sua massa são utilizados ingredientes semelhantes aos de outros produtos cárneos. Deste modo, é possível fazer uma comparação de resultados entre os vários produtos curados.

Assim, realizar-se-ão análises químicas (a_w , pH e perfil de aminas biogénicas) e microbiológicas (deteção e enumeração de clostrídios sulfito-redutores, pesquisa de *Salmonella* spp., pesquisa e contagem de *L. monocytogenes*, enterobactérias, estafilococos e BAL):

- ❖ Para a avaliação da evolução dos enchidos ao longo do fabrico, as análises serão realizadas através do seguimento de três lotes de fabrico em duas fábricas diferentes, cujas amostras compreendem as diversas etapas de fabrico (carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado).
- ❖ Em relação à avaliação das consequências da eliminação de nitratos e nitritos serão realizadas análises ao longo de três lotes de fabrico numa fábrica, cujas amostras recolhidas serão com e sem nitratos/nitritos. Estas também compreendem as diversas etapas de fabrico (carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado).

CAPÍTULO IV
Materiais e
Métodos



4. Materiais e Métodos

4.1. Amostras

Neste estudo o material biológico, como dito anteriormente, é o paio. Para a realização deste estudo a colheita das amostras foi feita em duplicado e ao longo do processo de fabrico, ou seja, carne fresca, massa pré enchimento (carne fresca com os condimentos utilizados no fabrico do paio para cada fábrica), meia cura e produto acabado. Numa primeira fase do estudo foram feitas avaliações da evolução dos enchidos ao longo do fabrico em duas fábricas distintas, designadas fábrica A e fábrica B. De notar, que como se trata de duas fábricas distintas o processo e o tempo de cada etapa também diferem. Na segunda fase do estudo foram realizadas avaliações às consequências da eliminação de nitratos e nitritos na formulação dos enchidos. Este trabalho apenas foi realizado na fábrica A, sendo que a colheita de amostras se realizou em duplicado e ao longo do processo de fabrico para as amostras com nitratos/nitritos, bem como para as amostras sem nitratos/nitritos, ou seja, quatro amostras por etapa. Para ambas as fases o estudo decorreu ao longo de três lotes independentes.

4.2. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram feitas no dia da colheita das amostras. O procedimento realizado foi adaptado de Laranjo et al. (2015) e das normas ISO para a microbiota analisada.

4.2.1. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foram pesadas 25 g de amostra (sem tripa) numa balança (Mettler Toledo PB1502, Columbus, Ohio, EUA), transferidas para um saco de homogeneização onde são

adicionados 225 mL de água peptonada tamponadas (Scharlau Microbiology, Barcelona, Espanha) pré-aquecida a 37°C. Foi adicionado o suplemento (para o crescimento de *Salmonella* spp.) em forma de comprimido à mistura que foi homogeneizada num homogeneizador de laboratório (Masticator) (IUL Instruments, Barcelona, Espanha). A mistura foi incubada a 41,5°C durante 18h-24h de forma a evitar falsos negativos. Após esta incubação a pesquisa de *Salmonella* spp. foi feita com recurso a um kit de imunodeteção de salmonelas (miniVIDAS; BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Assim, foram colocados 500 µL da mistura incubada numa barrete (Figura 4B), e a mesma foi colocada no *Heat & GO* (Figura 3B) durante 5 min a 131°C. De seguida, a barrete arrefeceu até à temperatura ambiente para se proceder à análise no miniVIDAS (Figura 3A). Os resultados positivos foram confirmados de acordo com a norma ISO 6579 (2002).

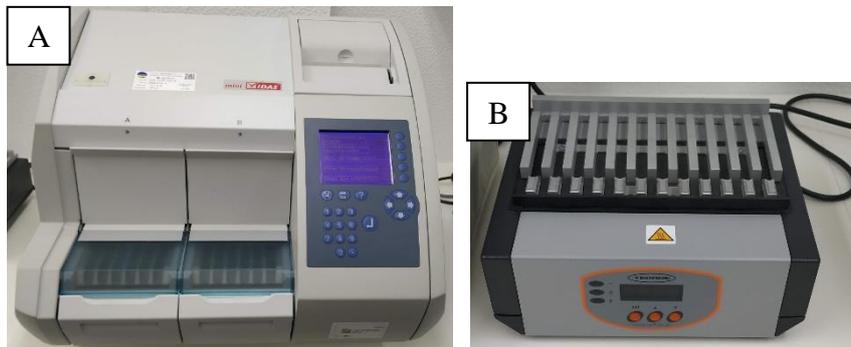


Figura 3. Equipamentos utilizados para a pesquisa de *Salmonella* spp.: miniVIDAS (A) e Heat & GO (B).

O kit de imunodeteção de salmonelas utilizado neste estudo foi o kit VIDAS® UP *Salmonella* (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) que junta a automatização com o método ELISA. Apesar de o ELFA ser muito idêntico ao ELISA, o primeiro utiliza substratos fluorogénicos como o fosfato de 4-metilumbelliferil que se converte num produto fluorescente (fosfato de 4-metilumbelliferona). Este produto tem a capacidade de detetar níveis muito baixos de fosfatase alcalina (Dwivedi *et al.*, 2014).



Figura 4. Componentes do kit de imunodeteção para *Salmonella* spp.: barrete de reagentes (A) e recipiente (B).

O kit em questão tem um recipiente (em formato de cone) de fase sólida (RFS) (**Figura 4B**) e uma barrete de reagentes para cada amostra (**Figura 4A**). O RFS tem como função a pipetagem automática (transporte da amostra ao longo dos reagentes) e, como o nome indica, também tem como função ser um recipiente de fase sólida. Caso haja antígeno de *Salmonella* nas amostras, eles vão-se ligar às paredes interiores do RFS, pois, estas estão revestidas com anticorpos anti-*Salmonella*. A amostra que não ficar ligada é então removida por lavagem. A amostra que ficou ligada à RFS é transferida para dentro e fora de um poço com anticorpos marcados com fosfatase alcalina, que se ligam à *Salmonella* ligada à RFS. Por último, a enzima conjugada converte o fosfato de 4-metilumbelliferil em fosfato de 4-metilumbelliferona, cuja fluorescência será medida a 450nm (Sewell *et al.*, 2003).

4.2.2. Pesquisa e contagem de clostrídios sulfito-redutores, *L. monocytogenes*, enterobactérias, bactérias do ácido láctico e estafilococos

A pesquisa e contagem de clostrídios sulfitos-redutores foi feita de acordo com a norma NP 2262 (1986), a contagem de *L. monocytogenes* de acordo com a norma ISO 11290-2 (2015), a contagem de enterobactérias de acordo com a norma ISO 21528 (2017) e a contagem de bactérias do ácido láctico de acordo com a norma ISO 15214 (1998).

Foram pesadas 10 g de amostra (sem tripa) numa balança (Mettler Toledo PB1502, Columbus, Ohio, EUA), transferidas para um saco de homogeneização onde são adicionados 90 mL de água peptonada tamponada (Scharlau Microbiology, Barcelona, Espanha) e a mistura foi homogeneizada num homogeneizador de laboratório (Masticator) (IUL Instruments, Barcelona, Espanha). De seguida foram realizadas diluições decimais seriadas e inoculado 1 mL de cada diluição por incorporação nos meios adequados (**Quadro 2**). Para a pesquisa e contagem de *L. monocytogenes* foram inoculados 100 µL das diluições apropriadas no meio ALOA.

Quadro 2. Meios de cultura utilizados nas análises microbiológicas com as respetivas condições de incubação.

Microrganismos	Meio de Cultura	Temperatura de incubação	Tempo de incubação	Metabolismo respiratório
Mesófilos Totais	Extrato de Glicose Triptona (<i>Tryptone Glucose Extract</i> – TGE) (Scharlau Microbiology, Barcelona, Espanha)	30 °C	48 h	Aeróbio
Clostrídios sulfito-redutores	SPS (Merck Mikrobiologie, Darmstadt, Alemanha)	37 °C	48 h	Anaeróbio
Enterobactérias	Glicose lactose bile vermelho violeta (<i>Violet red bile lactose glucose</i> – VRBG) (Scharlau Microbiology, Barcelona, Espanha)	30 °C	48 h	Aeróbio
BAL	De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Scharlau Microbiology, Barcelona, Espanha)	30 °C	48 h	Anaeróbio
Estafilococos	Agar Sal Manitol (<i>Mannitol Salt Agar</i> – MSA) (Scharlau Microbiology, Barcelona, Espanha)	37 °C	48 h	Aeróbio
<i>Listeria monocytogenes</i>	ALOA (Biomériux, Craponne, França)	37 °C	24 h-48 h	Aeróbio

Relativamente aos meios de cultura utilizados para a pesquisa e contagem dos microrganismos apresentados no **Quadro 2**, o TGE é um meio de cultura geral utilizado para a contagem de microrganismos aeróbios em produtos alimentares ^[1]. O SPS é um meio de cultura utilizado para deteção, isolamento e enumeração de *Clostridium*

perfringens e *Clostridium botulinum* em produtos alimentares ^[1]. Os meios VRBG, MRS e MSA são meios de cultura seletivos (sendo que o VRBG e MSA são também meios de cultura diferenciais), permitindo apenas o crescimento de enterobactérias, bactérias do ácido lático e estafilococos, respetivamente ^[1, 2]. Por último, o ALOA é um meio de cultura seletivo e diferencial que permite o crescimento e deteção de *Listeria monocytogenes* ^[3]. Após o tempo de incubação adequado a cada análise, são contadas as unidades formadoras de colónias.

4.3. Análises físico-químicas

O procedimento realizado foi adaptado de Laranjo *et al.* (2017). A tripa do produto cárneo foi retirada, o produto foi picado e o pH medido com um medidor de pH (VWR pHenomenal, pH 1100L; Radnor, Pensilvânia, EUA) (**Figura 5A**) de acordo com a norma (ISO 2917, 1999) e a atividade da água (a_w) foi medida com um higrómetro (HygroLab) (Rotronic, Bassersdorf, Suíça) (**Figura 5B**).

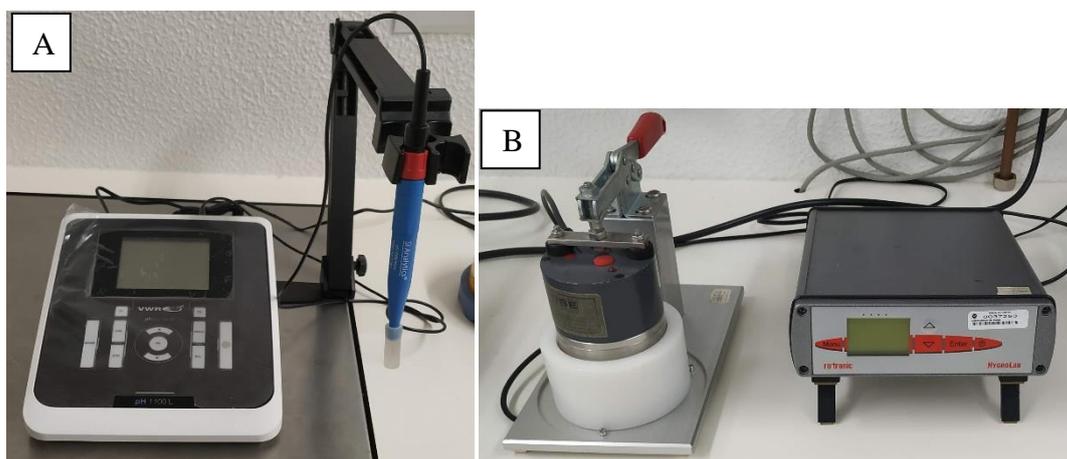


Figura 5. Equipamentos utilizados para as análises físico-químicas: medidor de pH (A) e higrómetro (B).

4.4. Análise do perfil de aminas biogénicas

O perfil de aminas biogénicas foi analisado com recurso ao método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Este é um método que consiste na separação de constituintes das amostras através da sua afinidade através da migração dos analitos. A migração é efetuada numa coluna onde os analitos passam a diferentes velocidades, eluindo em diferentes tempos. O método é constituído por duas fases: fase estacionária e fase móvel. Os analitos que têm uma maior interação com a fase estacionária vão ser eluídos mais tarde (Gika *et al.*, 2015).

Neste estudo as análises foram feitas em fase reversa. Sendo que a fase estacionária tem uma menor polaridade que a fase móvel. Deste modo, os analitos interagem maioritariamente com a fase móvel, resultando numa eluição mais rápida. Este tipo de cromatografia é indicado para amostras aquosas e compostos de massa molecular e polaridade médios, como por exemplo aminas, ácidos orgânicos, aminoácidos e nucleótidos. Contudo, quando a análise a moléculas polares, estas podem ser derivatizadas de forma a modificá-las e melhorar a sua retenção e detetabilidade (Gika *et al.*, 2015). Assim, procedeu-se à derivatização das aminas biogénicas. Neste trabalho a derivatização é feita com cloreto de dansilo, com dois objetivos: separação das aminas na amostra e torná-las fluorescentes (Pereira *et al.*, 2018).

O procedimento realizado foi adaptado de Laranjo *et al.* (2017) e de Roseiro *et al.* (2006). Foram quantificadas oito aminas diferentes: triptamina, β -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina. Foram calculados o teor total em aminas e o teor em aminas vasoativas. Para cada amostra foi feita uma extração, e dessa extração foram feitas duas derivatizações. De cada derivatização foram feitas duas injeções no HPLC-DAD.

Começou-se pela extração onde foram pesadas 8 g de amostra picada e homogeneizada para um copo de centrífuga Nalgene e adicionou-se 40 mL de solução de ácido perclórico 0,4M (VWR Chemicals, Radnor, Pensilvânia, EUA). A mistura foi

homogeneizada com o auxílio de um homogeneizador (T25 digital Ultra Turrax com a respetiva sonda) (IKA, Staufen, Alemanha) a 6000 rpm durante 1 minuto e centrifugou-se a 3836 g durante 10 minutos a 4 °C numa centrífuga (Thermo Scientific Sorvall; Waltham, Massachusetts, EUA), modelo Lynx 4000 com um rotor Fiberlite F14-6x250y da mesma. Filtrou-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 100 mL com um papel de filtro Whatman nº2. Repetiu-se a extração com 40 mL de solução de ácido perclórico 0,4M. Centrifugou-se, novamente, a 3836 g durante 10 minutos a 4 °C. Juntaram-se os sobrenadantes obtidos e adicionou-se 0,5 mL de padrão interno (1,7-diaminoheptano, 1mg/mL água MiliQ; Merck, Darmstadt, Alemanha) e fez-se o volume, a 100 mL, com ácido perclórico 0,4M.

De seguida, prosseguiu-se à derivatização onde foi alcalinizado 1 mL de extrato da amostra através da adição de 200 µL de solução de hidróxido de sódio 2N (VWR Chemicals, Radnor, Pensilvânia, EUA) e tamponou-se pela adição de 300 µL de bicarbonato de sódio saturado (Honeywell Fluka, Bucharest, Romania). Adicionou-se 2 mL de solução de cloreto de dansilo (cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo) (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemanha), esta foi preparada no próprio dia da análise em acetona (5 mg / 1 mL de acetona) (VWR Chemicals, Radnor, Pensilvânia, EUA) e colocou-se a mistura em estufa a 40 °C durante 45 minutos. Removeu-se o cloreto de dansilo, adicionando 100 µL de amónia a 25% (PanReac Química, Barcelona, Espanha). Após 30 minutos, ajustou-se a 5 mL com acetonitrilo (VWR Chemicals, Radnor, Pensilvânia, EUA), ou seja, adicionou-se 1400 µL. Centrifugou-se a 957 g durante 5 min numa centrífuga Hettich, Universal 32R, filtrou-se o sobrenadante com recurso de uma seringa descartável e filtro de seringa com 13 mm e 0,45 µm para vials roscados (VWR Chemicals, Radnor, Pensilvânia, EUA) e injetou-se 20 µL em HPLC-DAD (Thermo Scientific Dionex, Ultimate 3000; Waltham, Massachusetts, EUA) (**Figura 6**).



Figura 6. Equipamento utilizado para a separação e identificação das aminas biogénicas em estudo (UHPLC Ultimate 3000).

A separação das aminas biogénicas foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), com bomba quaternária (HPLC Ultimate 3000 pump), detetor de matriz de díodo (DAD) (Ultimate 3000 RS Diode Array detetor) e extrator automático (Ultimate 3000 Autosampler). Foi utilizada uma coluna de fase reversa (RP-18, 5 μm de 4.0 x 125 mm e 100Å°) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e um comprimento de onda de 254 nm. O processo de separação das aminas biogénicas foi feito através de um programa de eluição com a mistura de dois solventes, o solvente A que é o acetato de amónio 0,1M e o solvente B que é o acetonitrilo. O gradiente foi iniciado com uma proporção de 50% de ambos os solventes e após 23 minutos terminou com 90% de acetonitrilo, onde foi utilizado um fluxo de 1 mL/min a 25 °C.

Os reagentes utilizados nas fases móveis do HPLC-DAD tinham o grau de pureza indicado para HPLC e água ultrapura do tipo I (Millipore, Direc-Q[®] 5UV, Guyancourt, France). Foi utilizado um HPLC-DAD com amostrador automático para a determinação e quantificação das aminas biogénicas.

A quantificação das aminas foi realizada pelo método do padrão externo, através da interpolação das áreas obtidas para cada amina na curva de calibração correspondente.

4.5. Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) utilizando o software SPSS™ v.20 (IBM, Armonk, Nova York, EUA) e as diferenças entre grupos foram identificadas com base no teste de Diferença Significativa Honesta de Tukey ($p < 0,05$). A eliminação de valores *outliers* foi efetuada com o teste de Grubbs ^[4] ($\alpha = 0,05$). O teste de Grubbs também é conhecido como teste residual normalizado, tem como função a deteção de valores discrepantes num conjunto de dados cuja origem é considerada como uma população de distribuição normal (Grubbs, 1950).

CAPÍTULO V

Evolução dos
enchidos ao longo
do processo de
fabrico



5. Evolução dos enchidos ao longo do processo de fabrico

De acordo com o que se encontra no Capítulo III, o principal objetivo deste estudo é melhorar a segurança dos enchidos, neste caso o paio. Contudo também é necessário que a qualidade não seja comprometida. Assim é necessário conhecer a evolução dos enchidos ao longo do fabrico, nomeadamente a microbiota e as características físico-químicas (a_w e pH). Com base nestes resultados será possível proceder à avaliação da eliminação de nitratos e nitritos, e se a mesma afetará ou não as características dos enchidos curados em comparação com um procedimento onde é feita a adição de nitratos.

Neste capítulo será realizada a avaliação microbiológica e físico-química de paio. O ensaio foi realizado em duas fábricas (fábrica A e B), localizadas no sul do país, na região do Alentejo. Esta avaliação tem como objetivo conhecer a microbiota e as características físico-químicas de cada paio, nos diferentes lotes, e também a diferença entre as duas empresas em estudo. Para além do registo dos resultados obtidos, neste capítulo também será feito o tratamento de resultados, bem como a sua discussão tendo em conta trabalhos de outros autores no mesmo âmbito desta dissertação.

5.1. Parâmetros físico-químicos

A evolução dos parâmetros físico-químicos ao longo do processo de fabrico de enchidos é um fator importante para a determinação da segurança dos mesmos. Pois com a diminuição dos valores do pH e da a_w há uma maior segurança devido à inibição de bactérias patogénicas (Ferreira *et al.*, 2006).

Após a análise estatística dos resultados obtidos, observou-se a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$) (**Quadro 3**) para as diferentes etapas (pH e a_w); entre as duas fábricas (pH) e para a interação entre os fatores etapa e fábrica (pH).

Quadro 3. Análise de variância para a evolução do pH e a_w ao longo do processo nas duas fábricas em estudo.

	Fatores		
	Etapa	Fábrica	Interação Etapa*Fábrica
pH	F = 6,949 valor de p = 0,000	F = 9,330 valor de p = 0,003	F = 2,956 valor de p = 0,037
a_w	F = 190,648 valor de p = 0,000	F = 3,292 valor de p = 0,073	F = 0,930 valor de p = 0,430

Quadro 4. Evolução do pH e a_w em diferentes etapas ao longo do processo nas duas fábricas em estudo.

Etapa	Fábrica A				Fábrica B			
	0	1	2	3	0	1	2	3
pH	6,18 ^{bA} ± 0,38	5,47 ^{abA} ± 0,22	5,97 ^{bA} ± 1,43	5,07 ^{aA} ± 0,09	6,23 ^{bB} ± 0,42	5,83 ^{abB} ± 0,98	5,73 ^{abB} ± 0,06	5,65 ^{abB} ± 0,31
a_w	0,958 ^d ± 0,007	0,941 ^c ± 0,008	0,915 ^b ± 0,005	0,833 ^a ± 0,021	0,961 ^c ± 0,006	0,943 ^{bc} ± 0,007	0,919 ^b ± 0,099	0,850 ^a ± 0,045

Os resultados são apresentados como médias ± desvio-padrão. Etapas: 0 – carne; 1 – massa pré-enchimento; 2 – meia cura e 3 – produto acabado. Na mesma linha, diferentes letras representam diferentes grupos de médias aritméticas ($P < 0,05$). Letras maiúsculas representam diferenças entre a mesma etapa de fábricas diferentes. Letras minúsculas representam diferenças na mesma etapa nas duas fábricas.

De modo geral, ambos os parâmetros físico-químicos se encontram de acordo com o esperado, ou seja, há a diminuição de ambos ao longo do processo de fabrico.

Na fábrica B foram registados os valores de pH mais elevados (**Quadro 4**). Para a carne foi obtido um valor de pH igual a 6,18 e 6,23, para a fábrica A e B, respetivamente. Para a massa pré-enchimento os valores de pH diminuíram para ambas as fábricas, sendo a diferença de 0,7 e 0,4 para a fábrica A e B, respetivamente. Contudo para a meia cura apenas houve declínio dos valores de pH para a fábrica B. O aumento do pH na fábrica A pode dever-se a um menor crescimento de bactérias responsáveis pela acidificação do produto. Contudo para o produto acabado houve um declínio para ambas as fábricas, onde o processo de fabrico terminou com valores de 5,07 e 5,65 para a fábrica A e B, respetivamente. Esta diminuição do pH ao longo do processo de fabrico de enchidos curados possui vantagens a nível da segurança microbiológica, pois promove a inibição de algumas bactérias. No entanto, também tem outras vantagens como uma secagem mais rápida e melhor textura (Wang *et al.*, 2018), atingindo mais facilmente as características organolépticas desejadas. Relativamente à a_w , foi registada uma diminuição ao longo do processo de fabrico (**Quadro 4**). A matéria-prima teve valores de a_w semelhantes para ambas as fábricas (0,958 e 0,961 para a fábrica A e B, respetivamente). Após a adição dos condimentos na matéria-prima (massa pré-enchimento) houve uma ligeira redução da a_w . Esta diminuição da a_w foi observada até ao final do processo atingindo valores finais de 0,833 e 0,850 para a fábrica A e B, respetivamente. A a_w é vista como um fator para a estabilidade microbiana de enchidos curados, podendo também ser um obstáculo para a mesma (Park & Lee, 2012). De acordo com Park & Lee (2012) os enchidos curados podem ser classificados como “semi-secos” e “secos”, consoante os valores finais da a_w . Ambos os enchidos em estudo possuem valores da a_w inferior a 0,90, sendo considerados como “secos”. Sırıken *et al.* (2006) classifica os produtos à base de carne em três categorias diferentes “facilmente perecíveis; perecíveis e estáveis em prateleira”. Quando os produtos possuem um pH superior a 5,2 e a_w superior a 0,95 são considerados como “facilmente perecíveis”; quando possuem pH superior a 5,2 – 5,0 ou a_w entre 0,95 – 0,91 são

considerados “perceíveis”; quando possuem pH inferior a 5,2 e a_w inferior a 0,95 ou apenas pH inferior a 5,0 ou a_w inferior a 0,91 são considerados como “estáveis em prateleiras”. Deste modo, é possível afirmar que os enchidos em estudos são classificados como “estáveis em prateleiras”. Uma vez que ambos os valores da a_w são baixos há a inibição de microrganismos patogénicos, no entanto se a a_w atingir valores demasiado baixos as características sensoriais serão afetadas negativamente (Sun *et al.*, 2018).

Assim, pode-se afirmar que tanto para a fábrica A como para a fábrica B os valores finais dos parâmetros físico-químicos em estudo (pH e a_w) demonstram uma segurança e estabilidade microbiana. Contudo, também o crescimento microbiano influencia a evolução do pH e da a_w ao longo do processo de fabrico e de cura dos enchidos.

Os valores obtidos neste estudo estão de acordo com os resultados obtidos por Wang *et al.* (2018), cujos valores obtidos para o pH foram 5,02, 5,92 e 5,73 e os valores para a a_w foram 0,93, 0,85 e 0,83 para salame, linguiça curada a seco e salsicha defumada, respetivamente. No estudo de Perea-Sanz *et al.* (2019) foram obtidos no primeiro mês de armazenamento para o pH um valor de 5,09 e da a_w um valor de 0,887. Enquanto que Christieans *et al.* (2018) e Hospital *et al.* (2015) obtiveram uma diminuição dos valores de pH e a_w ao longo do processo de fabrico (produto acabado inclusive). No entanto, este comportamento não foi registado nos parâmetros físico-químicos do presente estudo uma vez que, os tipos de enchidos em estudo são diferentes. Deste modo também a formulação dos enchidos será diferente, como por exemplo o teor de sal, os ingredientes/condimentos utilizados, bem como a utilização ou não de culturas de arranque.

Comparando os resultados do presente estudo com os resultados de Wang *et al.* (2018), realizado em salame, linguiça curada a seco e salsicha defumada, encontra-se uma semelhança dos valores de pH do presente estudo com os resultados referentes ao salame (5,02). Para os valores da a_w há uma semelhança com os resultados referentes à salsicha defumada (0,83). De notar que os resultados do presente estudo a comparar

com os de Wang *et al.* (2018) são do produto acabado. Ferreira *et al.* (2006) obteve um valor final de pH igual a 5,11 para a alheira; Chen *et al.* (2019) obteve resultados de ambos os parâmetros físico-químicos para a massa pré-enchimento e para o produto final, cujos valores para o pH são 6,14 e 5,81 e para a a_w são 0,97 e 0,78, respetivamente. García Fontán *et al.* (2007b) realizou um estudo em *androlla* tendo obtido valores de pH igual a 5,39 e da a_w igual a 0,902, sendo estes valores respetivos ao produto acabado. Outros estudos realizados no produto acabado foram feitos, nomeadamente por García Fontán *et al.* (2007a), Ambrosiadis *et al.* (2004), Ferreira *et al.* (2007b), Spaziani *et al.* (2009), Coloretti *et al.* (2014), Riel *et al.* (2017) e Cenci-Goga *et al.* (2012). Para o estudo de García Fontán *et al.* (2007a) em *botillo*, foram obtidos para o pH valores de 5,54 e para a a_w valores de 0,956. Para o estudo de Ambrosiadis *et al.* (2004) em enchidos tradicionais gregos, foram obtidos para o pH valores de 5,48 e para a a_w valores de 0,959. Para o estudo de Ferreira *et al.* (2007b) em salpicão e chouriça, foram apenas obtidos valores para o pH iguais a 5,3 e 5,4, respetivamente. Para o estudo de Spaziani *et al.* (2009) em enchidos com baixo teor ácido, foram obtidos apenas valores para a a_w entre 0,87 e 0,88. Para o estudo de Coloretti *et al.* (2014) em enchidos fermentados, foram apenas obtidos valores para o pH de 5,7. Para o estudo de Riel *et al.* (2017) em enchidos semelhantes à mortadela, foram obtidos para o pH valores de 6,29 e para a a_w valores de 0,98. Para o estudo de Cenci-Goga *et al.* (2012) em enchidos curados (não especificado) foram obtidos valores para o pH de 6,81 e para a a_w valores de 0,834.

No entanto, também foram feitos estudos diversas etapas do processo de fabrico de enchidos, como os estudos de Ferreira *et al.* (2009), Casquete *et al.* (2012), Gonzales-Barron *et al.* (2015), e Laranjo *et al.* (2017). Para o estudo de Ferreira *et al.* (2009) em salpicão e chouriça, foram feitas análises (apenas para o pH) a três lotes diferentes para ambos os enchidos. As análises foram feitas na matéria-prima, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado. Para o salpicão foram obtidos valores de 5,6, 5,4 e 5,6 na matéria-prima; 5,7, 5,5 e 5,5 na massa pré-enchimento; 5,3, 5,2 e 5,4 na meia cura e 5,3, 5,3 e 5,4 no produto acabado. Para a chouriça foram obtidos valores de 5,6, 5,5 e 5,7 na

matéria-prima; 5,7, 5,6 e 5,6 na massa pré-enchimento; 5,4, 5,3 e 5,4 na meia cura e 5,4, 5,3 e 5,4 no produto acabado.

Para o estudo de Casquete *et al.* (2012) em *chorizo* e *salchichón*, foram feitas análises para ambos os parâmetros físico-químicos ao longo do processo de fabrico em duas fábricas. Em relação aos valores para o pH foram obtidos os seguintes resultados para o *chorizo*: 6,38 e 5,93; 6,22 e 5,84; 5,27; 5,95; 5,77 e 5,83, para a matéria-prima, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado na primeira e segunda fábrica, respetivamente. Para o *salchichón* foram obtidos os seguintes resultados: 6,38 e 6,17; 6,36 e 6,12; 5,34 e 5,39; 5,27 e 5,55, para a matéria-prima, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado na primeira e segunda fábrica, respetivamente. Em relação aos valores para a a_w foram obtidos os seguintes resultados para o *chorizo*: 0,99 e 0,96; 0,99 e 0,96; 0,95 e 0,99; 0,83 e 0,80, para a matéria-prima, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado na primeira e segunda fábrica, respetivamente. Para o *salchichón* foram obtidos os seguintes resultados: 0,98 e 0,96; 0,98 e 0,96; 0,95 e 0,91; 0,80 e 0,83, para a matéria-prima, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado na primeira e segunda fábrica, respetivamente.

Para o estudo de Gonzales-Barron *et al.* (2015) em linguiça, foram feitas análises para ambos os parâmetros físico-químicos. Para o pH foram obtidos os seguintes valores: 6,103, 5,972, 5,565 e 5,439 para a matéria-prima, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente. Para a a_w foram obtidos os seguintes valores: 0,978, 0,961, 0,936 e 0,923 para a matéria-prima, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente.

No estudo de Laranjo *et al.* (2017) em enchidos curados (chouriço preto e paio preto), ambos os parâmetros físico-químicos foram analisados. Em relação ao pH, na massa pré-enchimento foi obtido um valor de 4,96 para ambos os produtos, tendo os valores deste parâmetro aumentado ao longo do processo, sendo que no produto acabado foi de 5,17 e 5,4 para o chouriço preto e o paio preto, respetivamente. Relativamente à a_w , na

massa pré-enchimento foi obtido um valor de 0,96. Ao longo do processo a a_w diminuiu, tendo o produto acabado valores inferiores a 0,85 para ambos os enchidos.

Após uma comparação dos resultados acima citados com os resultados obtidos neste estudo, é possível observar que existem algumas semelhanças entre resultados. Uma dessas semelhanças é perante o estudo de Hospital *et al.* (2015) onde a semelhança de resultados é relativa aos valores do pH, uma vez que tanto no presente estudo como no estudo de Hospital *et al.* (2015) houve um decréscimo do pH ao longo da fermentação, voltando a aumentar na maturação. Este aumento é o resultado de uma acumulação de compostos resultantes da quebra de proteínas presentes na matéria-prima.

Contudo, os resultados obtidos no presente estudo também estão em discordância com alguns dos resultados que foram apresentados de outros autores, nomeadamente os resultados de Laranjo *et al.* (2015), onde a fábrica com o maior valor final do pH deveria ter o menor valor final da a_w . Visto que a fábrica B tem o maior valor final para o pH, bem como o maior valor final para a a_w (**Quadro 4**), este fenómeno poderá ser explicado por um menor crescimento de bactérias responsáveis pelo decréscimo dos valores do pH. Um exemplo desse tipo de bactérias são as BAL, pois ao longo do processo produzem ácido láctico que leva à diminuição do pH (Laranjo *et al.*, 2016).

Portanto, de um modo geral pode-se afirmar que tanto para as semelhanças como para as diferenças entre resultados o tipo de produto é um fator importante. Uma vez que existem enchidos curados e enchidos fermentados, e como tal, os seus processos de fabrico diferem entre si. Contudo, apesar de os processos serem diferentes é possível obter semelhanças entre resultados, como visto anteriormente com o estudo de Hospital *et al.*, (2015), cujo estudo foi realizado em enchidos fermentados e o presente estudo foi realizado em enchidos curados.

Assim, com os resultados obtidos neste estudo, para além de se ter uma melhor ideia da evolução dos parâmetros físico-químicos ao longo do processo de fabrico, também é possível conhecer as diferenças entre fábricas para o mesmo produto. Pois, caso os resultados do produto acabado não assegurassem uma estabilidade e segurança a nível

alimentar seria mais fácil perceber onde se poderia alterar o processo de fabrico, de modo a melhorar a qualidade do produto.

5.2. Parâmetros microbiológicos

As características organolépticas dos enchidos são obtidas através de alterações químicas, bioquímicas, físicas e microbiológicas. Estas alterações ocorrem ao longo do amadurecimento. No entanto, é essencial uma escolha de condições favoráveis para promover o crescimento da microflora desejável e segura, bem como o controlo rigoroso do crescimento de bactérias deteriorantes. Deste modo, há uma estabilidade microbiana e uma extensão do prazo de validade dos enchidos (Park & Lee, 2012).

Ao fazer a avaliação microbiológica é possível conhecer, de forma parcial, as condições em que é realizada a produção de enchidos nas fábricas em estudo. Após a análise a ambas as fábricas é possível afirmar que bactérias patogénicas como clostrídios sulfito-redutores não foram detetados nas amostras analisadas. Contudo, para a fábrica A foi detetada *Salmonella* spp. numa amostra (massa pré-enchimento) num total de 24 amostras. A análise estatística realizada aos resultados obtidos (**Quadro 5**) apresentou a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$). Estas diferenças significativas foram observadas para o fator etapa, para o fator fábrica e para a interação entre os fatores etapa e fábrica. Contudo existem algumas exceções, nomeadamente a contagem de *Listeria* spp.; de estafilococos; de mesófilos totais, estafilococos e *L. monocytogenes*, para o fator etapa, fábrica e a interação dos fatores etapa e fábrica, respetivamente.

Quadro 5. Análise de variância para as contagens microbianas.

	Fatores		
	Etapa	Fábrica	Interação Etapa*Fábrica
Mesófilos totais	F = 15,433 valor de p = 0,000	F = 137,207 valor de p = 0,000	F = 3,292 valor de p = 0,030
BAL	F = 10,364 valor de p = 0,000	F = 19,784 valor de p = 0,000	F = 0,690 valor de p = 0,563
Estafilococos	F = 36,130 valor de p = 0,000	F = 1,075 valor de p = 0,306	F = 66,430 valor de p = 0,000
Enterobactérias	F = 57,245 valor de p = 0,000	F = 70,508 valor de p = 0,000	F = 0,397 valor de p = 0,756
<i>L. monocytogenes</i>	F = 7,573 valor de p = 0,000	F = 11,746 valor de p = 0,001	F = 7,573 valor de p = 0,000
<i>Listeria spp.</i>	F = 2,164 valor de p = 0,107	F = 12,961 valor de p = 0,001	F = 1,672 valor de p = 0,188

Quadro 6. Contagens microbianas em diferentes etapas ao longo do processo nas duas fábricas em estudo. Valores para mesófilos, BAL, estafilococos e enterobactérias expressos em log ufc/g e para *L. monocytogenes* e *Listeria spp.* expressos em ufg/g.

Etapa	Fábrica A				Fábrica B			
	0	1	2	3	0	1	2	3
Mesófilos	7,2 ^{aA} ± 0,8	7,4 ^{aA} ± 0,6	8,8 ^{bA} ± 0,6	9,1 ^{bA} ± 0,5	5,5 ^{aB} ± 0,6	6,0 ^{abB} ± 0,4	5,9 ^{abB} ± 0,3	6,8 ^{bB} ± 1,0
BAL	5,0 ^A ± 1,0	5,2 ^A ± 0,5	6,4 ^A ± 2,6	6,8 ^A ± 1,0	2,9 ^{aB} ± 0,4	3,2 ^{aB} ± 0,5	4,9 ^{bB} ± 0,7	6,0 ^{bB} ± 1,7
Estafilococos	4,6 ^a ± 0,3	5,1 ^b ± 0,2	5,4 ^b ± 0,4	4,2 ^a ± 0,3	3,4 ^a ± 0,2	3,8 ^a ± 0,1	4,8 ^b ± 0,8	7,0 ^c ± 0,4
Enterobactérias	6,9 ^{bA} ± 1,1	7,1 ^{bA} ± 0,9	6,6 ^{bA} ± 0,7	4,1 ^{aA} ± 0,4	5,1 ^{bB} ± 0,8	5,8 ^{bB} ± 0,6	4,9 ^{bB} ± 0,6	2,2 ^{aB} ± 0,0
<i>L. monocytogenes</i>	3 ^{aA} ± 6	1 ^{aA} ± 1	42 ^{bA} ± 34	4 ^{aA} ± 7	<LD ^B	<LD ^B	<LD ^B	<LD ^B
<i>Listeria spp.</i>	2 ^A ± 0	4 ^A ± 4	3 ^A ± 2	3 ^A ± 4	<LD ^B	1 ^B ± 1	<LD ^B	<LD ^B

Os resultados são apresentados como médias ± desvio-padrão. Etapas: 0 – carne; 1 – massa pré-enchimento; 2 – meia cura e 3 – produto acabado. Na mesma linha, diferentes letras representam diferentes grupos de médias aritméticas ($P < 0,05$). Letras maiúsculas representam diferenças entre a mesma etapa de fábricas diferentes. Letras minúsculas representam diferenças entre as etapas de cada fábrica. LD: limite de deteção do método.

Através do **Quadro 6** pode-se inferir que de um modo geral há uma maior contagem microbiana na fábrica A. Tendo em conta que as análises de enchidos foram feitas em duas fábricas locais é normal que haja diferenças entre os enchidos, incluindo a sua qualidade e segurança microbiológica (Gonzales-Barron *et al.*, 2015). Estas diferenças podem dever-se à matéria-prima utilizada, e se esta se encontrava contaminada ou não ao chegar à fábrica. Assim, é necessária uma seleção rigorosa da matéria-prima a utilizar no fabrico de enchidos curados (Casquete *et al.*, 2012), pois em ambas as fábricas há a presença de *Listeria* spp. na matéria-prima.

Com base nos resultados apresentados no **Quadro 6** é possível observar que as contagens de mesófilos totais aumentam ao longo do processo de fabrico dos enchidos para ambas as fábricas. No entanto, na fábrica B há uma diminuição de 0,1 log ufc/g para a etapa da meia cura. Este aumento das contagens microbianas está de acordo com a evolução das restantes bactérias em estudo, à exceção da *L. monocytogenes* e da *Listeria* spp. que diminuem após a massa pré-enchimento (**Quadro 6**).

Relativamente ao crescimento das BAL há um aumento ao longo do processo de fabrico. Para a carne na fábrica A obtiveram-se contagens de 5 log ufc/g enquanto que na fábrica B obtiveram-se 2,9 log ufc/g. Após a adição dos condimentos (massa pré-enchimento) há um aumento de 0,2 log ufc/g e de 0,3 log ufc/g; para a meia cura houve aumento de 1,4 log ufc/g e 1 log ufc/g para a fábrica A e B, respetivamente. Para o produto acabado obtiveram-se contagens finais de 6,8 log ufc/g na fábrica A e 6,0 log ufc/g na fábrica B.

Como dito anteriormente, de um modo geral há um maior crescimento microbiológico na fábrica A, o que não seria de se esperar para as BAL. Uma vez, que os valores da a_w são superiores para a fábrica B deveria haver um maior crescimento das BAL, pois os valores da a_w são diretamente proporcionais ao crescimento das BAL (Laranjo *et al.*, 2015). As BAL representam um papel importante no desenvolvimento das características organolépticas; garantem a segurança dos enchidos curados através da produção de compostos antimicrobianos (ácido láctico e bacteriocinas) e inibem o

crescimento de microrganismos indesejáveis através da diminuição do pH (Ferreira *et al.*, 2006; García Fontán *et al.*, 2007a). Como já foi referido, as BAL têm influência nas características organoléticas dos enchidos curados. Esta influência é devida à formação de ácido láctico que leva à diminuição dos valores do pH e consequentemente leva à coagulação das proteínas solúveis dando origem à textura desejada (Ferreira *et al.*, 2007b). A redução do pH através do crescimento das BAL para além de ter um efeito inibitório em algumas bactérias como demonstrado no **Quadro 6** também promove a estabilidade microbiana (Pavli *et al.*, 2019). Por outras palavras, a capacidade inibitória das BAL leva a uma alteração da microbiota endógena da matriz alimentar que origina uma extensão do prazo de validade dos enchidos curados (Prado *et al.*, 2019).

No que toca ao crescimento dos estafilococos, na carne houve uma contagem de 4,6 log ufc/g e de 3,4 log ufc/g, tendo aumento 0,5 log ufc/g e 0,4 log ufc/g na massa pré-enchimento, para a fábrica A e B, respetivamente. Para a meia cura obtiveram-se contagens de 5,4 log ufc/g e 4,8 log ufc/g, tendo o processo terminado com 4,2 log ufc/g e 7,0 log ufc/g, para a fábrica A e B, respetivamente. Contudo, é possível afirmar que com o aumento do crescimento das BAL ao longo do processo o crescimento de estafilococos da fábrica A é inibido (**Quadro 6**), estando de acordo com o estudo de Perea-Sanz *et al.* (2018). No entanto, o mesmo deveria acontecer para a fábrica B uma vez que os estafilococos não possuem uma grande capacidade de competição com as BAL (Pavli *et al.*, 2019). Além disso, os estafilococos desempenham um papel importante nas características organoléticas e higiénicas dos enchidos curados, nomeadamente a estabilização da cor, acidificação, proteólise e lipólise (Gallego *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019).

Em relação ao crescimento de enterobactérias é possível observar que houve um aumento da carne (6,9 log ufc/g e 5,1 log ufc/g) para a massa pré-enchimento (7,1 log ufc/g e 5,8 log ufc/g) para as fábricas A e B, respetivamente. Durante o resto do processo observou-se uma inibição do crescimento de enterobactérias, tendo sido obtidas contagens de 6,6 log ufc/g e 4,9 log ufc/g para a meia cura e contagens de 4,1 log ufc/g e 2,2 log ufc/g para o produto acabado para a fábrica A e B, respetivamente.

Deste modo, é possível inferir que ao longo do processo de fabrico dos enchidos houve uma maior contagem de enterobactérias na fábrica A. Também é possível observar que com o aumento do crescimento das BAL há uma diminuição das enterobactérias. Esta diminuição pode ser devida à redução do pH (**Quadro 4**) derivada do crescimento das BAL, pois estas ao longo do processo acidificam o produto (Lorenzo *et al.*, 2014; Domínguez *et al.*, 2016a). As enterobactérias são consideradas bactérias indicadoras de higiene e com base nos resultados obtidos é possível inferir que a matéria-prima bem como o produto acabado da fábrica B são mais seguros a nível microbiológico.

A presença destas bactérias nos enchidos curados (matéria-prima incluída) deve-se ao facto de as enterobactérias se encontrarem no trato intestinal (García Fontán *et al.*, 2007a). No entanto, também pode ocorrer contaminação ao longo do processo de fabrico através dos utensílios utilizados, bem como o meio ambiente e a manipulação feita pelos produtores (García Fontán *et al.*, 2007a; Fernández-López *et al.*, 2008). Contudo, a presença de enterobactérias nos enchidos curados deve ser controlada de forma rigorosa, pois este grupo bacteriano inclui bactérias patogénicas e deteriorantes (Wang *et al.*, 2018). O consumo de enchidos curados com elevado crescimento de enterobactérias é considerado perigoso, uma vez que o consumidor poderá sofrer de infeções e intoxicações alimentares (González & Díez, 2002).

Através do **Quadro 6** é possível observar que apenas a fábrica A teve crescimento de *L. monocytogenes*. Sendo que inicialmente (na carne e massa pré-enchimento) obtiveram-se contagens de 3 ufc/g e 1 ufc/g, no entanto para a meia cura houve um elevado crescimento resultando em contagens de 42 ufc/g. Contudo para o produto acabado obtiveram-se contagens de 4 ufc/g. O aumento no crescimento de *L. monocytogenes* na meia cura deve-se às características físico-químicas desta etapa. Por outras palavras, reúnem-se as características ideais para o crescimento de *L. monocytogenes*. De acordo com Jay *et al.* (2005), o pH ideal será de 4,6 e a a_w menor que 0,93, no entanto o pH obtido (**Quadro 4**) é superior a 4,6, mas proporcionou-se um ambiente indicado para o crescimento desta bactéria. Através do **Quadro 6** é possível observar que houve crescimento de *Listeria* spp. para ambas as fábricas, sendo as contagens mais elevadas

obtidas para a fábrica A. Também para a fábrica A o crescimento de *Listeria* spp. é diferente do crescimento na fábrica B. Pois apesar de haver um aumento das contagens para a massa pré-enchimento tanto na fábrica A como na fábrica B este crescimento apenas foi inibido até ao final do processo na fábrica B. Estas diferenças podem estar relacionadas com o modo de cura que é realizado em cada fábrica, pois, como dito anteriormente o processo de fabrico difere entre as duas fábricas em estudo. O crescimento de *Listeria* spp. é considerado um bom indicador de higiene, uma vez que são bactérias ubíquitas e podem resultar na contaminação dos enchidos com espécies patogénicas como a *L. monocytogenes* (Ferreira *et al.*, 2006). A *L. monocytogenes* é uma bactéria considerada como uma das mais patogénicas de origem alimentar que é encontrada nos enchidos. É frequentemente detetada em matérias-primas e durante o processo de fabrico. A sua evolução do seu crescimento ao longo do processo é determinada pela existência ou não de contaminações cruzadas, medidas de higiene e dos parâmetros do processo de fabrico (Ferreira *et al.*, 2007b). A *L. monocytogenes* como dito anteriormente, é uma bactéria patogénica que é responsável pela listeriose. Esta doença pode afetar principalmente idosos, crianças e indivíduos imunocomprometidos, e também está relacionada com abortos tardios em mulheres grávidas (Ferreira *et al.*, 2007a). O crescimento de *L. monocytogenes* apenas na fábrica A e o maior crescimento de *Listeria* spp. pode dever-se a uma possível contaminação da matéria-prima (carne) no ambiente do matadouro ou no transporte do mesmo para a fábrica A. Outra justificação para o crescimento de *L. monocytogenes* será o fraco cuidado das regras de higiene, limpeza e desinfeção dos equipamentos e materiais utilizados na fábrica A. O facto de não haver crescimento na fábrica B, poderá dever-se a um maior cuidado ao longo do fabrico ou uma melhor qualidade de matéria-prima.

Ao comparar os resultados obtidos neste estudo com ensaios de outros autores pode-se concluir que em relação aos resultados de Cenci-Goga *et al.* (2012) a contagem de mesófilos (5,08 log ufc/g) é semelhante aos resultados da etapa 3 para a fábrica B. Contudo, os autores obtiveram uma maior quantidade de amostras com *Salmonella* spp. (6 amostras num total de 15) face aos resultados do presente estudo. Os resultados de

Cenci-Goga *et al.* (2012) são relativos ao produto acabado havendo semelhança, como dito anteriormente, para a contagem de mesófilos da fábrica B, no entanto, a contagem de enterobactérias para a mesma fábrica possui valores mais baixos (cerca de 3 log ufg/g).

Face ao estudo de Soncu *et al.* (2018), realizado em *sucuk* (mesófilos totais: 6,81 log ufc/g; BAL: 6,20 log ufc/g; enterobactérias: 4,81 log ufc/g), é possível afirmar que os resultados da fábrica B são mais idênticos, exceto para a contagem de enterobactérias onde há uma diferença de 2,6 log ufc/g, sendo a contagem inferior pertencente à fábrica B.

Em relação aos resultados obtidos por Laranjo *et al.* (2017), cujo estudo foi realizado em Chouriço Preto (CP) e Paio Preto (PP), pode-se afirmar que para ambos há uma proximidade da contagem de mesófilos (CP: 7,16 log ufc/g, 6,39 log ufc/g e 7,59 ufc/g; PP: 7,16 log ufc/g, 6,35 log ufc/g e 6,42 log ufc/g) face à obtida pela fábrica B. Enquanto que para estafilococos (CP: 3,50 log ufc/g, 4,57 log ufc/g e 4,49 ufc/g; PP: 3,50 log ufc/g, 4,18 log ufc/g e 4,04 log ufc/g) e enterobactérias (CP: 4,80 log ufc/g, 4,41 log ufc/g e 2,71 ufc/g; PP: 4,80 log ufc/g e 3,09 log ufc/g) há uma proximidade relativamente às contagens obtidas na fábrica A. No que toca ao estudo realizado por Laranjo *et al.* (2016), os produtos analisados foram catalão e salsichão. Para o primeiro existe uma semelhança na contagem de estafilococos à obtida na fábrica A. Para a contagem de enterobactérias existe uma parecença com a contagem obtida na fábrica B na meia cura, enquanto que no produto acabado a contagem do presente estudo é superior. Para o Salsichão, observou-se uma proximidade na contagem de enterobactérias com a fábrica A para o produto acabado, enquanto que para a meia cura a contagem obtida no presente estudo é superior. Na contagem de estafilococos há semelhança com a contagem obtida na fábrica A, contudo observou-se uma maior diminuição ao longo da cura no estudo de (Laranjo *et al.*, 2016).

Alfaia *et al.* (2015) realizou um estudo em chouriço, onde obteve contagens para enterobactérias de 4,49 log ufc/g e para BAL de 7,54 log ufc/g. Ambos os resultados

foram para o produto acabado, estando de acordo com os valores obtidos para a fábrica A. No entanto, esta apresenta valores ligeiramente mais baixos, cerca de 1 log ufc/g.

Dias *et al.* (2018) também realizou um estudo em paio, onde obteve contagens para mesófilos, BAL, estafilococos, enterobactérias e *L. monocytogenes*, cujos valores são 7,38 log ufc/g, 8,06 log ufc/g, 8,68 log ufc/g, 2,75 log ufc/g e 5,83 ufc/g, respetivamente. Estes resultados, tal como no estudo de Alfaia *et al.* (2015), foram obtidos para o produto acabado. Comparando os resultados de Dias *et al.* (2018) com os do presente estudo, é possível afirmar que as contagens dos mesófilos são cerca de 2 log ufc/g mais baixas que as obtidas na fábrica A e 0,58 log ufc/g mais baixas que as obtidas na fábrica B. A contagens das BAL obtidas por Dias *et al.* (2018) são superiores às obtidas neste estudo, sendo que há uma maior proximidade com os resultados da fábrica B (cerca de 2 log ufc/g). Em relação às contagens de estafilococos os autores obtiveram contagens de 8,68 log ufc/g, que em comparação aos resultados do presente estudo é possível afirmar que para ambas as fábricas em estudo foram obtidas contagens inferiores às de Dias *et al.* (2018), contudo a fábrica B possui as contagens mais próximas com 1,68 log ufc/g de diferença. No entanto, as fábricas do presente estudo possuem contagens de enterobactérias mais elevadas que as do estudo de Dias *et al.* (2018). Para as contagens de *L. monocytogenes*, onde há uma diferença de cerca de 2 ufc/g, sendo que o estudo de Dias *et al.* (2018) obteve os valores mais elevados.

Casquete *et al.* (2012) realizou um estudo em *chorizo* e *salchichón*. Este estudo foi realizado ao longo do processo de fabrico dos enchidos supracitados. Para o *chorizo* foram obtidas contagens de mesófilos de 8,22 log ufc/g, 8,14 log ufc/g, 7,65 log ufc/g e 8,04 log ufc/g para carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente. As contagens para as BAL foram de 6,47 log ufc/g, 6,71 log ufc/g, 7,57 log ufc/g e 7,89 log ufc/g para carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente. Para os estafilococos foram obtidas contagens de 6,08 log ufc/g, 5,99 log ufc/g, 5,65 log ufc/g e 5,62 log ufc/g para carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente. Em relação às contagens de enterobactérias foram obtidas contagens de 4,95 log ufc/g, 4,89 log ufc/g, 1,78 log ufc/g

e 1,93 log ufc/g para carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente. Para o *salchichón* foram obtidas contagens de mesófilos de 7,05 log ufc/g, 7,31 log ufc/g, 8,74 log ufc/g e 7,99 log ufc/g para carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente. As contagens para as BAL foram de 6,04 log ufc/g, 6,44 log ufc/g, 8,05 log ufc/g e 7,57 log ufc/g para carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente. Para os estafilococos foram obtidas contagens de 5,93 log ufc/g, 6,03 log ufc/g, 6,22 log ufc/g e 4,88 log ufc/g para carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente. Em relação às contagens de enterobactérias foram obtidas contagens de 6,18 log ufc/g, 5,95 log ufc/g, 3,44 log ufc/g e 0,64 log ufc/g para carne, massa pré-enchimento, meia cura e produto acabado, respetivamente. Comparando os resultados obtidos do *chorizo* por Casquete *et al.* (2012) com os resultados obtidos neste estudo é possível afirmar que, de um modo geral, há uma proximidade com os resultados obtidos na fábrica A (contagens de mesófilos, BAL e estafilococos). Contudo, para as contagens de enterobactérias, há uma proximidade com os resultados obtidos na fábrica B. O mesmo se pode afirmar ao comparar os resultados de Casquete *et al.* (2012) com os resultados obtidos no presente estudo, apesar de em algumas etapas haver uma diferença inferior a 1 log ufc/g. Esta diferença é observada nas contagens de mesófilos totais para a carne, massa pré-enchimento e meia cura; nas contagens das BAL para a massa pré-enchimento; nas contagens de estafilocos para o produto acabado e nas contagens de enterobactérias para a massa pré-enchimento.

Omer *et al.* (2015) realizou um trabalho em *salami* e *morr*, onde foram realizadas análises apenas no produto acabado. Deste modo, na análise de *salami* foram obtidas contagens para mesófilos de 8,67 log ufc/g, para as BAL de 7,99 log ufc/g e para as enterobactérias de 1,48 log ufc/g. Para a análise de *morr* foram obtidas contagens para mesófilos de 8,52 log ufc/g, para as BAL de 8,09 log ufc/g e para as enterobactérias de 1,60 log ufc/g. Ao comparar estes resultados com os do presente estudo pode-se afirmar que as contagens de mesófilos e das BAL para ambos os enchidos têm uma menor

diferença com os resultados da fábrica A. Contudo, as contagens de enterobactérias para ambos os enchidos são semelhantes aos resultados obtidos na fábrica B.

Lorenzo *et al.* (2014) realizou um estudo em enchidos curados de poltro, e as suas análises foram feitas no produto acabado. Assim, foram obtidas contagens para mesófilos, BAL, estafilococos e enterobactérias. Para os mesófilos foram obtidas contagens de 8,61 log ufc/g, para as BAL 8,55 log ufc/g, para os estafilococos 6,01 log ufc/g e para as enterobactérias 2,41 log ufc/g. Comparando estes resultados com os obtidos no presente estudo é possível afirmar que, para as contagens de mesófilos e das BAL há uma proximidade aos resultados obtidos na fábrica A, com diferenças de 0,49 log ufc/g e de 1,75 log ufc/g, respetivamente. Sendo que para a contagem de mesófilos, a maior contagem foi obtida no presente estudo. Para as contagens de estafilococos e enterobactérias há uma proximidade aos resultados obtidos na fábrica B, com diferenças de 0,99 log ufc/g e de 0,21 log ufc/g, respetivamente. Sendo que as contagens superiores são relativas ao presente estudo para os estafilococos e ao estudo de Lorenzo *et al.* (2014) para as enterobactérias.

Prado *et al.* (2019) realizou um estudo em *Austrian chorizo*, cujos resultados são referentes ao produto acabado. Deste modo foram obtidas contagens para mesófilos, BAL e enterobactérias. Para os mesófilos foram obtidas contagens de 8,55 log ufc/g, para as BAL 8,39 log ufc/g e para as enterobactérias 1,62 log ufc/g. Ao comparar estes resultados com os obtidos no presente estudo é possível afirmar que há uma semelhança nas contagens de mesófilos e das BAL com a fábrica A, enquanto que para a contagem das enterobactérias há uma semelhança com a fábrica B.

Após comparar os resultados do presente estudo com resultados de outros autores, foi possível observar diferenças entre os resultados bem como semelhanças. As diferenças entre resultados podem ser devidas a diversos fatores. Para começar, o tipo de enchido em estudo é um dos principais fatores para a existência de discrepâncias entre os resultados, quer ao comparar os resultados dos outros autores com o do presente estudo. Também ao comparar os resultados dos estudos supracitados entre si, é possível

observar que existem algumas diferenças. A razão para que o tipo de enchido ser um fator importante para as discrepâncias de resultados, é o seu processo de fabrico, ou seja, há diferenças nos ingredientes usados para o fabrico dos diversos enchidos, bem como as quantidades de cada ingrediente. Também os tempos entre cada etapa de fabrico é um fator determinante, pois para cada tipo de enchido existem, por exemplo, diversos tempos de cura que vão influenciar os resultados para o produto acabado.

Contudo, também existem discrepâncias quando o tipo de enchido é igual, ou seja, a fábrica também é considerada um fator para a discrepância de resultados. Isto acontece, pois, apesar de o tipo de enchido ser o mesmo, estes são provenientes de diferentes fábricas resultando em diferenças entre si. Pois, também o processo de fabrico entre cada fábrica difere, como mencionado no Capítulo IV. Outro fator para a existência de discrepâncias entre os resultados poderá ser o tipo de carne utilizada para o fabrico de enchidos, pois poderá influenciar a a_w através da estrutura das proteínas e a sua capacidade de ligação à água. Como há influência na a_w , há consequentemente uma influência no crescimento microbiológico ao longo do processo, por exemplo, um valor de a_w elevado há um maior crescimento de bactérias como as BAL (Laranjo *et al.*, 2015). No entanto, também o estado da matéria-prima ao chegar à fábrica influencia os resultados do produto acabado, independentemente do tipo de enchido em estudo. Caso esta esteja contaminada haverá um crescimento microbiano mais elevado, podendo afetar a segurança e a qualidade do produto acabado. Contudo, também é possível que haja contaminação cruzada, de uma fraca higiene ao longo do processo de fabrico, que resultam de métodos de limpeza e desinfeção ineficazes. Deste modo, uma forma de evitar possíveis contaminações na fábrica será a variação dos detergentes e desinfetantes utilizados na limpeza e desinfeção dos materiais e equipamentos utilizados pela mesma.

CAPÍTULO VI
Eliminação de
nitratos e nitritos
da formulação de
enchidos



6. Eliminação de nitratos e nitritos da formulação de enchidos

Neste capítulo será realizada a avaliação microbiológica, físico-química e do perfil de aminas de enchidos curados, neste caso, paio. O ensaio foi realizado apenas na fábrica A. As análises foram realizadas ao longo do processo de fabrico do paio e em três lotes independentes. Esta avaliação tem como objetivo conhecer o efeito da eliminação de nitratos e nitritos da formulação de enchidos em relação à microbiota e às características físico-químicas de paio, nos diferentes lotes. Assim, serão efetuadas análises em paios controlo (com adição de 0,06% de sal nitrificante, contendo 5 ppm de nitratos e 5 ppm de nitritos) e em paios sem nitratos e nitritos, de modo a ser possível entender quais as consequências da eliminação de nitratos e nitritos nos enchidos. Isto porque a sua adição leva, indiretamente, à formação de nitrosaminas que são consideradas compostos químicos potencialmente cancerígenos. Para além do registo dos resultados obtidos, neste capítulo também será feito o tratamento de resultados, bem como a sua discussão tendo em conta outros trabalhos.

6.1. Parâmetros físico-químicos

As características organolépticas dos enchidos são o resultado de alterações químicas, bioquímicas, físicas e microbiológicas. Dentro destas alterações, duas desempenham um papel importante nas características organolépticas do produto final, nomeadamente a degradação de lípidos e proteínas (Domínguez *et al.*, 2016b). Os parâmetros físico-químicos em estudo (pH e a_w) são fatores importantes para uma estabilidade e segurança microbiana (Park & Lee, 2012).

Através da análise estatística (**Quadro 7**) é possível verificar que existem diferenças significativas ($P < 0,05$) para ambas as variáveis em estudo. No entanto para o fator

presença/ausência de nitratos/nitritos apenas existem diferenças significativas para a variável a_w . Relativamente ao pH, existem diferenças significativas para o fator etapa e para a interação dos fatores etapa e presença/ausência de nitratos/nitritos.

Quadro 7. Análise de variância para a evolução do pH e a_w ao longo do processo nas diferentes etapas e na presença/ausência de nitratos/nitritos.

	Fatores		
	Etapa	Presença/ausência de nitratos/nitritos	Interação Etapa* Presença/ausência de nitratos/nitritos
pH	F = 263,762 valor de p = 0,000	F = 0,000 valor de p = 0,993	F = 0,648 valor de p = 0,586
a_w	F = 590,770 valor de p = 0,000	F = 12,336 valor de p = 0,001	F = 12,510 valor de p = 0,000

Quadro 8. Evolução do pH e a_w em diferentes etapas ao longo do processo e na presença/ausência de nitratos/nitritos.

Etapa	0		1		2		3	
	Nitratos/ nitritos		Controlo	Sem nitratos/nitritos	Controlo	Sem nitratos/nitritos	Controlo	Sem nitratos/nitritos
pH	$5,98^B \pm 0,255$		$5,92^B \pm 0,033$	$5,92^B \pm 0,100$	$4,97^A \pm 0,078$	$5,04^A \pm 0,034$	$5,14^A \pm 0,088$	$5,07^A \pm 0,089$
a_w	$0,958^D \pm 0,008$		$0,940^{Ca} \pm 0,010$	$0,943^{Cb} \pm 0,005$	$0,920^{Ba} \pm 0,008$	$0,916^{Bb} \pm 0,008$	$0,825^{Aa} \pm 0,021$	$0,856^{Ab} \pm 0,019$

Os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão. Etapas: 0 – carne; 1 – massa antes do enchimento; 2 – meia cura e 3 – produto acabado. Para a carne não há tratamento. Na mesma linha, diferentes letras representam diferentes grupos de médias aritméticas ($P < 0,05$). Letras maiúsculas representam diferenças das etapas. Letras minúsculas: a, b – representam diferenças da presença/ausência de nitratos/nitritos.

Ao analisar as **Quadro 8** é possível afirmar que os valores obtidos ao longo do processo se encontram de acordo com o esperado, ou seja, há uma diminuição dos valores do pH e da a_w ao longo do processo. Comparando os resultados obtidos para o controlo (com nitratos/nitritos) e quando o produto não tem nitratos/nitritos, pode-se inferir que não há uma diferença de valores muito elevada.

Relativamente aos resultados para o pH, são observados, de um modo geral, valores mais elevados para as amostras controlo. Para a carne foram obtidos valores de 5,98. Para a massa pré-enchimento foram obtidos valores de 5,92 para ambos os tipos de paios (controlo e sem nitratos/nitritos). Deste modo, é possível observar que houve um aumento de 0,02 para o pH nos paios sem nitratos/nitritos. Em relação à meia cura, houve um declínio do pH, onde foram obtidos valores de 4,97 e 5,04; para o produto final foram obtidos valores de 5,14 e 5,07 para os paios controlo e para os paios sem nitratos/nitritos, respetivamente.

A diminuição do pH ao longo do processo pode estar relacionada com o aumento do crescimento das BAL (**Quadro 10**), uma vez que estas produzem ácido láctico resultando na diminuição do pH (Fernández-López *et al.*, 2008; Walz *et al.*, 2019). Esta diminuição resultante da presença de ácido láctico é derivada da hidrólise de hidratos de carbono. A diminuição do pH é fundamental, pois para além de contribuir para a inibição de microrganismos indesejáveis, também contribui para o desenvolvimento rápido da cor vermelha dos enchidos curados, bem como o desenvolvimento do sabor e a capacidade de ligação da água às proteínas (Lorenzo *et al.*, 2014), resultando nas características organolépticas desejadas. No entanto, é possível observar um ligeiro aumento do pH no produto acabado. Este aumento pode ser resultado da atividade proteolítica dos microrganismos presentes no produto acabado. A atividade proteolítica é induzida por enzimas endógenas e proteases bacterianas que resultam na degradação proteolítica, dando origem a péptidos, aminoácidos e aminas que exercem um efeito tampão nos ácidos orgânicos produzidos pelas BAL (Lorenzo *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2019). De acordo com Gallego *et al.* (2018) as BAL e os estafilococos são os

microrganismos mais ativos na proteólise, bem como na lipólise, acidificação e desnitrificação.

Em relação aos resultados para a a_w , é possível inferir que há uma diminuição dos valores ao longo do processo para os paços controlo e os paços sem nitratos/nitritos. No início do processo (carne) foram obtidos valores de 0,958. Após a adição dos condimentos (massa pré-enchimento) foram obtidos valores de 0,940 e 0,943; para a meia cura foram obtidos valores de 0,920 e 0,916 e para o produto acabado foram obtidos valores de 0,825 e 0,857 para os paços controlo e os paços sem nitratos/nitritos, respetivamente. De um modo geral, é possível afirmar que para os paços controlo foram obtidos valores para a a_w mais elevados, com exceção do produto acabado.

A a_w é considerada um fator importante para a estabilidade e segurança microbiológica dos enchidos, uma vez que baixos valores da a_w têm a capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogénicas (como o *S. aureus*). No entanto, para que haja a inibição do crescimento bacteriano é necessário que os valores da a_w sejam inferiores a 0,83 (Park & Lee, 2012; Sun *et al.*, 2018). Infelizmente há a possibilidade de as bactérias patogénicas não terem o seu crescimento inibido com os baixos valores da a_w , pois quando a matéria-prima (carne) se encontra contaminada algumas bactérias patogénicas conseguem-se desenvolver de modo a crescer no ambiente antimicrobiano imposto pela a_w (Ferreira *et al.*, 2007a). Contudo, caso a a_w tenha valores muito baixos irá afetar algumas características organolépticas do produto, nomeadamente o sabor, que será forte e pouco agradável. As alterações na a_w ao longo do processo devem-se às alterações no pH, ou seja, uma diminuição dos valores de pH resulta na desnaturação das proteínas musculares e reduz a capacidade da proteína para a retenção de água (Sun *et al.*, 2018).

Para além da a_w existem mais fatores (intrínsecos e extrínsecos) que promovem a estabilidade e segurança microbiológica dos enchidos. Os fatores intrínsecos responsáveis pela estabilidade e segurança microbiológica são a composição química do produto, a a_w , o pH e o potencial redox. Em relação aos fatores extrínsecos, estes são a

temperatura, humidade e duração do processo tecnológico. Assim, é possível obter uma estabilidade do produto quando há uma diminuição do pH e da a_w ao longo do processo de fabrico. Deste modo, os produtos são considerados seguros (Pavli *et al.*, 2019). Através da combinação de fatores é possível preservar o produto durante mais tempo, ou seja, o tempo de vida útil do produto é prolongado (Riel *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Estes fatores são valores baixos de pH e a_w , a adição de nitrato/nitrito e a temperatura de refrigeração (Wang *et al.*, 2018). De acordo com Park & Lee (2012) é possível classificar os enchidos de acordo com o seu valor final da a_w , sendo que quando a a_w se encontra entre 0,90 e 0,95 o enchido é considerado “semi-seco” e quando a a_w é inferior a 0,90 o enchido é considerado “seco”. Deste modo, é possível afirmar que os enchidos em estudo são considerados “secos”. Também é possível afirmar que de acordo com os valores finais de ambos os parâmetros físico-químicos (**Quadro 8**) que os enchidos em estudo possuem uma estabilidade e segurança microbiológica para ambos os tipos de paio (com e sem nitratos/nitritos) (Ben Slima *et al.*, 2017).

No entanto, existem outros trabalhos onde foi estudada a redução de nitratos/nitritos na produção de enchidos (curados e fermentados), nomeadamente Perea-Sanz *et al.* (2019), Perea-Sanz *et al.* (2018), Hospital *et al.* (2012), Hospital *et al.* (2014), Hospital *et al.* (2015), Hospital *et al.* (2016) e Christieans *et al.* (2018).

Em relação ao estudo de Perea-Sanz *et al.* (2019), realizado em enchidos fermentados (não especificado), este demonstra uma diminuição dos valores de pH e a_w à medida que a quantidade de adição de nitratos diminui. No entanto, no estudo de Perea-Sanz *et al.* (2018), também realizado em enchidos fermentados (não especificado) apenas os valores da a_w diminuem com a diminuição da adição de nitratos.

No estudo de Hospital *et al.* (2012) que foi realizado em *salchichón*, foram efetuadas análises para ambos os parâmetros físico-químicos (pH e a_w). O estudo foi efetuado em quatro lotes diferentes: sem nitratos/nitritos, com baixa, média e alta concentração de nitratos/nitritos. Em relação ao pH não foram observadas diferenças nos valores do

produto acabado, enquanto que para a a_w foram registadas diferenças entre grupos de dois lotes. Tendo sido observados valores da a_w mais baixos para os lotes de baixa e alta concentração de nitratos/nitritos. Ou seja, nas amostras sem nitratos/nitritos foi registada uma atividade da água mais elevada.

Em relação ao Hospital *et al.* (2014), este estudo foi realizado em *salchichón* e as análises efetuadas foram para ambos os parâmetros físico-químicos. Este estudo foi realizado em quatro lotes diferentes: sem nitratos/nitritos e com baixa, média e alta concentração de nitratos/nitritos. Para o pH não foram registadas diferenças entre os lotes, enquanto que para a_w apenas foram registadas diferenças para o lote sem nitratos/nitritos, cujos valores são os mais baixos.

No estudo de Hospital *et al.* (2016) realizado em *salchichón* e *fuet*, as análises físico-químicas foram feitas para o pH e para a a_w em quatro lotes diferentes: sem nitratos/nitritos e com baixa, média e alta concentração de nitratos/nitritos. Tanto para o *salchichón* como para o *fuet* não foram observadas diferenças para ambos os parâmetros físico-químicos entre os quatro lotes em estudo.

Relativamente ao estudo de Christieans *et al.* (2018) efetuado em enchidos fermentados franceses (não especificado), ambos os parâmetros físico-químicos foram analisados em diferentes concentrações de nitratos/nitritos. Os autores observaram que a evolução de ambos os parâmetros físico-químicos ao longo do processo não depende da concentrações de nitratos/nitritos.

Neste capítulo foi avaliada o efeito da redução de nitratos/nitritos em enchidos curados, nomeadamente o paio. Os nitratos/nitritos têm como função principal a conservação do produto, bem como o desenvolvimento do sabor e cor característicos dos enchidos, e também possuem efeito antioxidante (Perea-Sanz *et al.*, 2019). Contudo, a utilização de nitratos/nitritos no fabrico de enchidos leva à formação de nitrosaminas. Esta formação pode ocorrer após a ingestão do produto, durante a digestão, ou mesmo no processo de fabrico. Portanto, há a necessidade de reduzir ou eliminar a adição de nitratos/nitritos nos enchidos, ou substituí-los por aditivos naturais (Riel *et al.*, 2017).

Ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com os resultados de outros autores, anteriormente citados, é possível observar que existem semelhanças e discrepâncias. Tanto as diferenças como as semelhanças devem-se a diversos fatores, como por exemplo o tipo de enchido em estudo. Isto é, cada enchido tem o seu processo de fabrico próprio, deste modo diferentes tipos de enchidos têm um processo de fabrico diferente. Estas diferenças vão influenciar todas as características dos enchidos, quer a nível físico-químico, microbiológico ou a nível sensorial (a sua cor, sabor e textura). As diferenças nos processos de fabrico são principalmente a duração de cada etapa, como comprovado no ensaio do capítulo anterior. Para além da duração das etapas, a forma como cada etapa é realizada também se torna um fator para possíveis semelhanças ou discrepâncias entre resultados de diferentes estudos. Outro fator será o tipo de ingredientes utilizados no fabrico dos enchidos, bem como os conservantes.

Como dito anteriormente, o objetivo deste capítulo é avaliar as consequências da eliminação de nitratos/nitritos na formulação dos enchidos, como o paio. Neste estudo, foram analisadas amostras com a formulação normal do paio e amostras sem qualquer adição de nitratos/nitritos. Ao analisar os resultados obtidos (**Quadro 8**) é possível afirmar que apesar de existirem diferenças significativas para a presença/ausência de nitratos/nitritos na a_w , essas diferenças não são muito elevadas. Em relação ao pH, como já foi referido, não há diferenças significativas para a presença/ausência de nitratos/nitritos. No entanto, é ainda necessário conhecer os efeitos que a eliminação de nitratos/nitritos tem nos parâmetros microbiológicos, bem como no perfil de aminas biogénicas. Contudo, já através dos resultados dos parâmetros físico-químicos pode afirmar-se que parece ser seguro eliminar os nitratos/nitritos da formulação do enchido curado em estudo, uma vez que as amostras sem nitratos/nitritos do produto acabado podem ser consideradas seguras tendo em conta os seus valores de pH e a_w .

6.2. Parâmetros microbiológicos

As características do produto acabado são estabelecidas pela qualidade da matéria-prima utilizada, bem como os ingredientes e as condições do processo de fabrico. Através, do conhecimento da biodiversidade microbiana é possível realizar um melhor controlo da qualidade, com o objetivo de tornar o produto mais seguro, com qualidade elevada e características organolépticas únicas (Prado *et al.*, 2019).

Ao realizar as análises microbiológicas aos paios controlo e paios sem nitratos/nitritos é possível conhecer quais os efeitos da eliminação dos nitratos/nitritos na biodiversidade microbiana do paio ao longo do processo de fabrico. Após as análises microbiológicas é possível afirmar que não houve crescimento de bactérias patogénicas como *Salmonella* spp. e clostrídios sulfito-redutores. A análise estatística feita aos resultados obtidos (**Quadro 9**) não demonstrou a existência de diferenças significativas para o fator presença/ausência de nitratos/nitritos, enquanto que para o fator etapa houve diferenças significativas, com exceção da contagem de *Listeria* spp..

Quadro 9. Análise de variância para a evolução das contagens microbianas ao longo do processo nas diferentes etapas e na presença/ausência de nitratos/nitritos.

	Fatores		
	Etapa	Presença/ausência de nitratos/nitritos	Interação Etapa* Presença/ausência de nitratos/nitritos
Mesófilos	F = 41,939 valor de p = 0,000	F = 0,144 valor de p = 0,706	F = 0,051 valor de p = 0,984
BAL	F = 93,467 valor de p = 0,000	F = 0,024 valor de p = 0,877	F = 0,043 valor de p = 0,988
Estafilococos	F = 4,113 valor de p = 0,011	F = 0,464 valor de p = 0,499	F = 0,085 valor de p = 0,968
Enterobactérias	F = 108,542 valor de p = 0,000	F = 1,394 valor de p = 0,243	F = 1,008 valor de p = 0,968
<i>L. monocytogenes</i>	F = 20,340 valor de p = 0,000	F = 0,024 valor de p = 0,877	F = 0,090 valor de p = 0,965
<i>Listeria</i> spp.	F = 0,707 valor de p = 0,552	F = 1,402 valor de p = 0,242	F = 0,612 valor de p = 0,610

Quadro 10. Contagens microbianas em diferentes etapas ao longo do processo e na presença/ausência de nitratos/nitritos. Valores para mesófilos, estafilococos e enterobactérias expressos em log ufc/g e para *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. expressos em ufg/g.

Etapa	0		1		2		3	
	Controlo		Sem nitratos/nitritos		Controlo		Sem nitratos/nitritos	
Mesófilos	7,5 ^A ± 0,9	7,0 ^A ± 0,4	7,7 ^A ± 0,2	10,1 ^B ± 1,1	10,1 ^B ± 1,1	10,2 ^B ± 1,0	10,4 ^B ± 1,2	
BAL	5,2 ^A ± 0,8	5,6 ^A ± 0,1	5,4 ^A ± 0,1	9,4 ^B ± 1,8	9,4 ^B ± 1,8	10,4 ^B ± 1,0	10,4 ^B ± 1,2	
Estafilococos	5,0 ^{AB} ± 0,7	5,1 ^{AB} ± 0,3	5,0 ^{AB} ± 0,4	5,3 ^B ± 0,3	5,2 ^B ± 0,3	4,5 ^A ± 0,6	4,5 ^A ± 0,5	
Enterobactérias	7,1 ^B ± 0,5	7,3 ^B ± 0,3	7,6 ^B ± 0,3	7,8 ^B ± 1,0	7,6 ^B ± 0,3	2,7 ^A ± 0,9	3,5 ^A ± 1,5	
<i>L. monocytogenes</i>	3 ^A ± 5	3 ^A ± 2	3 ^A ± 4	59 ^B ± 52	53 ^B ± 28	20 ^A ± 16	22 ^A ± 19	
<i>Listeria</i> spp.	15 ± 22	14 ± 16	10 ± 9	20 ± 13	5 ± 4	8 ± 8	6 ± 6	

Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão. Etapas: 0 – carne; 1 – massa antes do enchimento; 2 – meia cura e 3 – produto acabado. Para a carne não há tratamento. Na mesma linha, diferentes letras representam diferentes grupos de médias aritméticas ($P < 0,05$). Letras maiúsculas representam diferenças das etapas.

Através do **Quadro 10** é possível observar que, em relação à contagem de mesófilos totais, estas aumentam ao longo do processo de fabrico para os paios controlo e para os paios sem nitratos/nitritos. Na carne foram obtidas contagens de 7,5 log ufc/g. Na massa pré-enchimento, as contagens sofreram um pequeno aumento para 7,0 e 7,7 log ufc/g para os paios controlo e para os paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. Na meia cura houve um aumento de contagens maior em comparação à massa pré-enchimento, tendo sido registados valores de 10,1 log ufc/g; no final do processo de fabrico (produto acabado) foram registados valores de 10,2 log ufc/g e 10,4 log ufc/g para os paios controlo e para os paios sem nitratos/nitritos, respetivamente.

Relativamente às contagens de BAL, na carne foram registados valores de 5,2 log ufc/g. Para a massa pré-enchimento houve um ligeiro aumento 5,6 log ufc/g e 5,4 log ufc/g, para os paios controlo e para os paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. Na meia cura foram registados aumentos, obtendo-se valores de 9,4 log ufc/g para ambos os tipos de paio. Este aumento continuou até ao fim do processo de fabrico, que terminou com contagens de BAL iguais para ambos os tipos de paios (10,4 log ufc/g). Como dito anteriormente, há um aumento das contagens de mesófilos totais, este aumento deve-se ao crescimento das BAL, ou seja, o aumento de mesófilos totais não é resultado de uma possível contaminação, como também foi apresentado em Prado *et al.* (2019). As BAL são bactérias com um papel importante no processo de fabrico de enchidos, uma vez que levam à formação de sabor, melhoram a textura, a cor, as propriedades sensoriais e têm a capacidade de inibir o crescimento de bactérias indesejáveis na biodiversidade microbiana dos enchidos (Demirok Soncu *et al.*, 2018; Sucu & Turp, 2018; Hu *et al.*, 2019). Como as BAL têm a capacidade de inibir o crescimento de bactérias indesejáveis, como por exemplo, bactérias patogénicas, pode-se afirmar que têm efeitos na estabilidade microbiana do produto, que por sua vez afeta de forma positiva a conservação do produto acabado (Domínguez *et al.*, 2016a). Para além dos benefícios que foram ditos anteriormente, as BAL ao produzir ácido láctico e acético através da fermentação de hidratos de carbono conseguem diminuir o pH ao longo do processo de fabrico originando nas características organoléticas ideais para o produto, ao mesmo

tempo promovem uma segurança higiénica no produto acabado (Park & Lee, 2012; Hu *et al.*, 2019; Pavli *et al.*, 2019). Como observado no **Quadro 8**, há um aumento do pH no produto acabado, este aumento deve-se ao facto de as BAL não terem uma taxa elevada de crescimento no final do processo de fabrico, uma vez que o seu crescimento é inibido pelos baixos valores da a_w (Lorenzo *et al.*, 2014).

Em relação às contagens de estafilococos, na carne foram obtidas contagens de 5,0 log ufc/g. Na massa pré-enchimento houve um ligeiro aumento nas contagens para ambos os tipos de paio. Deste modo para ambos os tipos de amostras foram registados valores semelhantes: 5,1 log ufc/g para os paios controlo e 5,0 log ufc/g para os paios sem nitratos/nitritos. Para a meia cura houve um ligeiro aumento para ambos os tipos de paio, onde foram registados valores semelhantes: 5,3 log ufc/g para os paios controlo e 5,2 log ufc/g para os paios sem nitratos/nitritos. No produto acabado houve uma diminuição das contagens, tendo o processo de fabrico terminado com um valor de 4,5 log ufc/g para ambos os tipos de paio. Os cocos catalase-positivos são principais agentes de redução de nitrato ao longo do processo de cura dos enchidos, fazendo com que haja um aumento da concentração de nitritos (Gonzales-Barron *et al.*, 2015). Após a meia cura há uma diminuição das contagens de estafilococos, estes resultados também foram obtidos por outros autores, nomeadamente Lorenzo *et al.* (2014) e Pavli *et al.* (2019), reforçando a hipótese de que os estafilococos são fracos competidores em relação às BAL e à diminuição do pH. Apesar de as contagens de estafilococos serem bastante inferiores às contagens das BAL, os estafilococos têm um papel importante não só no desenvolvimento das características organolépticas, como o sabor, mas também têm influência nas propriedades higiénicas do produto acabado (Montanari *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019).

Relativamente às contagens de enterobactérias, na carne foram registados valores de 7,1 log ufc/g, que aumentaram na massa pré-enchimento para 7,3 log ufc/g e 7,6 log ufc/g, para os paios controlo e paios nitratos/nitritos, respetivamente. Para a meia cura, foi registado um aumento nas contagens, onde foram obtidos valores de 7,8 log ufc/g e 7,6 log ufc/g para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. No

produto acabado houve uma grande diminuição nas contagens, sendo os valores finais de 2,7 log ufc/g e 3,5 ufc/g, para os paios controlo e os paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. As enterobactérias são bactérias indicadores de higiene, ou seja, indicadoras de potenciais contaminações, uma vez que dentro deste grupo bacteriano estão incluídas bactérias patogénicas como a *E. coli* e a *Salmonella* spp. (Park & Lee, 2012; Chen *et al.*, 2016). Deste modo, uma baixa contagem de enterobactérias indica que o produto acabado é considerado um alimento seguro (Domínguez *et al.*, 2016b). No entanto é possível inibir o crescimento de enterobactérias, esta inibição pode ser feita através da concentração de sal nos enchidos, rápida diminuição do pH ao longo do processo e pela produção de bacteriocinas e propriedades antagónicas das BAL e dos estafilococos (Domínguez *et al.*, 2016a; Montanari *et al.*, 2018).

Através do **Quadro 10** é possível observar que de um modo geral as contagens de *L. monocytogenes* entre os paios controlo e os paios sem nitratos/nitritos são semelhantes. Na carne foram registados valores de 3 ufc/g. Para a massa pré-enchimento houve um ligeiro aumento das contagens em ambos os tipos de paio (3 ufc/g). Na meia cura houve um elevado aumento nas contagens para os dois tipos de paio, sendo registados valores de 59 ufc/g e 53 ufc/g, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. Para o produto acabado foram registados valores de 20 ufc/g e 22 ufc/g para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. Ou seja, houve uma diminuição do crescimento de *L. monocytogenes* durante a última parte da cura dos enchidos.

Em relação às contagens de *Listeria* spp. são, de um modo geral, superiores nas amostras controlo. Na carne foram registados valores de 15 ufc/g. Para a massa pré-enchimento houve uma diminuição nas contagens para 14 ufc/g e 10 ufc/g, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. Na meia cura foi registado um aumento nas contagens dos paios controlo (20 ufc/g) e uma diminuição nos paios sem nitratos/nitritos (5 ufc/g). Para o produto acabado foram registados valores de 8 ufc/g e 6 ufc/g para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente.

Tanto a presença de *Listeria* spp. como de *L. monocytogenes* são indicadores de contaminação cruzada ou fraca higiene ao longo do processo de fabrico (Ferreira *et al.*, 2007b; Casquete *et al.*, 2012), sendo necessário melhorar a higiene pessoal dos empregados da fábrica em estudo, como melhorar as técnicas de limpeza e desinfeção do material e equipamento fabril. A *L. monocytogenes* é uma bactéria patogénica de origem alimentar, sendo uma das bactérias patogénicas mais importantes encontrada em enchidos. Ela pode ser encontrada na matéria-prima utilizada no fabrico de enchidos, através de contaminação cruzada ao longo do processo de fabrico ou então através de fracas medidas de higiene pessoal (Ferreira *et al.*, 2007b). A *L. monocytogenes* é uma bactéria patogénica importante, pois é responsável por uma infeção grave denominada listeriose (Ferreira *et al.*, 2007a).

No estudo realizado por Perea-Sanz *et al.* (2018) e Perea-Sanz *et al.* (2019), ambos realizados em enchidos fermentados (não especificado) observou-se que com a diminuição de nitratos nos enchidos curados as contagens de mesófilos totais, BAL e cocos Gram-positivo também diminuem. Perea-Sanz *et al.* (2019) também não obtiveram diferenças nas contagens microbianas entre 15% e 25% de redução de nitratos. Contudo, Hospital *et al.* (2012), realizado em *salchichón* obteve contagens de enterobactérias entre 1 log ufc/g e 2 log ufc/g nas amostras de controlo e com uma redução de nitratos em 15% e 25%, enquanto que nas amostras com a concentração máxima de nitratos não houve crescimento.

Em relação ao estudo de Hospital *et al.* (2014), realizado em *salchichón*, os autores observaram que não existiam diferenças no crescimento das BAL em concentrações altas, médias e baixas de nitratos/nitritos e sem nitratos/nitritos. O mesmo foi observado para as contagens de cocos Gram-positivo catalase-positiva.

No estudo de Hospital *et al.* (2015), realizado em *chorizo*, os autores observaram diferenças no crescimento de estafilococos, provavelmente devido às suas capacidades de reduzir nitratos em nitritos, bem como o seu potencial redox. Ao longo das contagens de estafilococos diminuíram nos lotes com concentrações elevadas e médias de

nitratos/nitritos, enquanto que nos lotes com baixas concentrações e sem nitratos/nitritos houve aumento do crescimento. Em relação às contagens das BAL no produto acabado foram observadas contagens menores para o lote com concentração média de nitratos/nitritos, sendo que se obteve contagens mais altas para o lote com maior e baixa concentrações de nitratos/nitritos e no lote sem nitratos/nitritos.

Em relação ao estudo de Hospital *et al.* (2016), realizado em *salchichón* e *fuet*, os autores observaram que não existiam diferenças nas contagens das BAL para os quatro lotes em estudo: sem nitratos/nitritos e com baixa, média e alta concentração de nitratos/nitritos.

No estudo de Christieans *et al.* (2018), realizado em enchidos fermentados franceses, os autores não observaram diferenças nas contagens de cocos Gram-positivo catalase-positiva e das BAL nas diferentes concentrações de nitratos/nitritos. Em relação à contagem de *L. monocytogenes*, foi observado um maior crescimento nas amostras com menor concentração de nitratos/nitritos.

A adição de nitritos na produção de enchidos curados tem diversos objetivos, como por exemplo, a formação de sabor e cor característicos e estabilidade oxidativa dos lípidos que influenciam o aroma (Hospital *et al.*, 2015). No entanto, estes compostos quando são sujeitos a tratamentos térmicos intensivos, como a cura dos enchidos curados, levam à formação de nitrosaminas (Perea-Sanz *et al.*, 2018). Estas representam um perigo para a saúde do consumidor, uma vez que são compostos químicos cancerígenos. Deste modo, têm sido realizados estudos com o objetivo de reduzir a adição de nitritos aos enchidos curados, bem como o desenvolvimento de alternativas aos mesmos (por exemplo, extratos vegetais e antimicrobianos naturais) (Hospital *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo era a avaliação dos efeitos da eliminação dos nitratos/nitritos, onde foram feitas análises a paiois com e sem nitratos/nitritos. Após as análises foi observado que a nível microbiológico não existem diferenças significativas. Apesar de não existirem muitos autores a realizar o mesmo estudo é possível afirmar que resultados estão de acordo com estudos de outros autores, nomeadamente Hospital *et al.*

(2014) e Christieans *et al.* (2018). Esta semelhança entre estudos pode dever-se ao tipo de fabrico, apesar de se tratar de tipos de enchidos diferentes. Apesar de serem enchidos provenientes de outros países, e de o tipo de enchido ser diferente, o método de fabrico pode ser similar ao processo de fabrico do paio, uma vez que também ao nível dos parâmetros físico-químicos houve semelhanças nos resultados. Contudo, com a eliminação dos nitratos/nitritos seria de esperar uma maior carga microbiana, uma vez que os nitratos/nitritos são compostos com propriedades antimicrobianas (Adams & Moss, 2009a), o que não foi observado.

Portanto, como não foram detetadas diferenças significativas entre os paios controlo e os paios sem nitratos/nitritos, é possível afirmar que apesar de os nitratos/nitritos terem um papel importante na conservação dos alimentos, no paio estudado poder-se-á proceder à sua eliminação. Contudo, o presente estudo apenas foi realizado até ao produto acabado, de modo a que se possa proceder à eliminação de nitratos/nitritos é necessário testar a diferença entre paios controlo e paios sem nitratos/nitritos ao longo do prazo de validade do produto (neste caso 180 dias). Para além de serem necessárias análises ao produto durante o seu prazo de validade também são necessárias outras análises, nomeadamente análises sensoriais e análises de textura. Estas análises são importantes, pois é necessário garantir a qualidade do produto que poderá ser comercializado, ou seja, apesar de ser considerado um alimento microbiologicamente seguro, há que assegurar as suas características organoléticas (como sabor, cor e cheiro característico) tal como são percebidas pelo consumidor, se se mantêm inalteradas.

6.3. Perfil de aminas biogénicas

As aminas biogénicas são substâncias com um baixo peso molecular, sendo formadas pela descarboxilação de aminoácidos específicos que estão presentes nos alimentos. A sua presença é resultado da ação de enzimas bacterianas, ou seja, a formação de aminas biogénicas depende tanto do tipo de alimento como da sua carga microbiana. Deste

modo, é possível afirmar que as aminas biogénicas podem ser utilizadas como um indicador de desenvolvimento microbiano (Lázaro *et al.*, 2015).

Após a análise estatística (**Quadro 11**) aos resultados obtidos foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para o fator etapa em todas as variáveis em estudo. Para o fator presença/ausência de nitratos/nitritos foram observadas diferenças significativas para a putrescina e a espermidina. Em relação à interação dos fatores etapa e presença/ausência de nitratos/nitritos foram observadas diferenças significativas para as aminas putrescina, histamina, tiramina, espermidina e espermina.

Quadro 11. Análise de variância para a evolução das aminas biogénicas ao longo do processo nas diferentes etapas e na presença/ausência de nitratos/nitritos.

	Etapa	Presença/ausência de nitratos/nitritos	Etapa* Presença/ausência de nitratos/nitritos
Triptamina	F = 11,789 valor de p = 0,000	F = 0,381 valor de p = 0,538	F = 1,457 valor de p = 0,227
B-feniletilamina	F = 38,569 valor de p = 0,000	F = 0,629 valor de p = 0,429	F = 1,944 valor de p = 0,123
Putrescina	F = 10,990 valor de p = 0,000	F = 7,341 valor de p = 0,007	F = 6,555 valor de p = 0,000
Cadaverina	F = 10,787 valor de p = 0,000	F = 0,240 valor de p = 0,624	F = 2,618 valor de p = 0,052
Histamina	F = 28,155 valor de p = 0,000	F = 3,466 valor de p = 0,064	F = 7,862 valor de p = 0,000
Tiramina	F = 397,241 valor de p = 0,000	F = 2,605 valor de p = 0,108	F = 7,572 valor de p = 0,000
Espermidina	F = 60,910 valor de p = 0,000	F = 4,274 valor de p = 0,040	F = 4,456 valor de p = 0,005
Espermina	F = 317,290 valor de p = 0,000	F = 2,654 valor de p = 0,105	F = 9,996 valor de p = 0,000
Teor em aminas vasoativas	F = 53,056 valor de p = 0,000	F = 2,731 valor de p = 0,100	F = 1,639 valor de p = 0,181
Teor total de aminas	F = 68,360 valor de p = 0,000	F = 3,207 valor de p = 0,075	F = 1,237 valor de p = 0,297

Quadro 12. Evolução das aminas biogénicas ao longo do processo nas diferentes etapas e na presença/ausência de nitratos/nitritos. Valores expressos em mg/kg de peso fresco.

Etapa	0		1		2		3	
		Controlo	Sem nitratos/nitritos	Controlo	Sem nitratos/nitritos	Controlo	Sem nitratos/nitritos	
Nitratos/nitritos								
Triptamina	90,60 ^{BC} ± 63,47	35,78 ^A ± 18,35	53,64 ^A ± 45,92	70,95 ^{AB} ± 32,09	59,91 ^{AB} ± 38,61	108,50 ^C ± 61,13	84,62 ^C ± 34,88	
β-feniletilamina	46,42 ^B ± 13,26	21,82 ^A ± 14,48	19,10 ^A ± 12,10	56,58 ^B ± 23,00	45,39 ^B ± 28,10	21,93 ^A ± 18,86	28,10 ^A ± 23,30	
Putrescina	33,71 ^A ± 25,47	22,44 ^{Aa} ± 19,10	19,41 ^{Ab} ± 7,60	78,38 ^{Ba} ± 74,33	33,71 ^{Bb} ± 20,66	29,14 ^{Aa} ± 24,40	31,23 ^{Ab} ± 13,43	
Cadaverina	52,56 ^A ± 29,03	38,92 ^A ± 22,72	36,58 ^A ± 41,06	61,03 ^B ± 24,29	89,30 ^B ± 44,53	82,77 ^B ± 66,39	67,31 ^B ± 55,77	
Histamina	2,76 ^A ± 6,31	0,60 ^A ± 0,94	0,20 ^A ± 0,10	3,39 ^A ± 5,22	13,02 ^A ± 28,10	52,01 ^B ± 56,93	20,37 ^B ± 29,47	
Tiramina	18,10 ^A ± 5,57	30,19 ^B ± 8,49	25,67 ^B ± 6,01	72,54 ^C ± 14,30	53,56 ^C ± 11,01	101,65 ^D ± 35,33	111,75 ^D ± 23,86	
Espermidina	10,67 ^B ± 2,24	8,57 ^{Aa} ± 0,66	8,40 ^{Ab} ± 0,75	12,37 ^{Ba} ± 3,12	12,31 ^{Bb} ± 4,56	17,02 ^{Ca} ± 6,74	22,12 ^{Cb} ± 9,75	
Espermina	18,18 ^A ± 7,64	26,73 ^B ± 7,99	22,50 ^B ± 6,36	56,17 ^C ± 10,38	42,08 ^C ± 9,38	67,37 ^D ± 20,72	76,37 ^D ± 12,74	
Aminas vasoativas	157,89 ^B ± 70,78	88,39 ^A ± 31,64	98,43 ^A ± 48,18	203,44 ^B ± 19,49	171,88 ^B ± 65,01	284,08 ^C ± 129,50	244,85 ^C ± 39,76	
Aminas totais	273,02 ^B ± 97,40	185,05 ^A ± 63,23	185,33 ^A ± 60,80	411,39 ^C ± 73,91	349,27 ^C ± 73,07	480,38 ^D ± 216,14	441,87 ^D ± 67,91	

Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão. Etapas: 0 – carne; 1 – massa antes do enchimento; 2 – meia cura e 3 – produto acabado. Para a carne não há tratamento. Na mesma linha, diferentes letras representam diferentes grupos de médias aritméticas ($P < 0,05$). Letras maiúsculas representam diferenças das etapas. Letras minúsculas: a, b – representam diferenças da presença/ausência de nitritos.

Em relação à evolução da triptamina ao longo do processo, é possível verificar que para a carne foi obtido um valor de 90,60 mg/kg, que diminuiu na massa pré-enchimento para valores de 35,78 mg/kg e 53,64 mg/kg para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. Estes valores aumentaram para a meia cura onde foram obtidos valores de 70,95 mg/kg e 59,91 mg/kg, que aumentaram no produto acabado, sendo obtidos valores de 108,50 mg/kg e 84,62 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos.

Relativamente à evolução da β -feniletilamina, é possível verificar que na carne foi obtido um valor de 46,42 mg/kg, que diminuíram na massa pré-enchimento com valores de 21,82 mg/kg e 19,10 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos. Para a meia cura o teor de β -feniletilamina voltou a aumentar, atingindo valores de 56,58 mg/kg e 45,39 mg/kg, estes valores diminuíram no produto acabado obtendo-se valores de 21,93 mg/kg e 28,10 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente.

No que toca ao teor da putrescina, é possível observar que para a carne foi obtido um valor de 33,71 mg/kg que diminuíram na massa pré-enchimento para valores de 22,44 mg/kg e 19,10 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. Para a meia cura houve um aumento para ambos os tipos de paio, sendo que o maior aumento foi registado nos paios controlo (78,38 mg/kg), enquanto que nos paios sem nitratos/nitritos foi registado um valor de 33,71 mg/kg. No produto acabado houve uma diminuição dos valores para 29,14 mg/kg e 31,23 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente.

Em relação ao teor da cadaverina, é possível observar que para a carne for obtido um valor de 52,56 mg/kg que diminuíram na massa pré-enchimento para valores de 38,92 mg/kg e 36,58 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. Para a meia cura houve um aumento dos valores do teor de cadaverina para 61,03 mg/kg e 89,30 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. No produto acabado houve um aumento para os paios controlo,

obtendo-se um valor de 82,77 mg/kg, enquanto que para os paios sem nitratos/nitritos houve uma diminuição sendo registado um valor de 67,31 mg/kg.

Relativamente ao teor de histamina, na carne foi obtido um valor de 2,76 mg/kg, tendo diminuído para a massa pré-enchimento tendo sido obtidos valores de 0,60 mg/kg e 0,20 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos. Na meia cura houve um aumento para ambos os tipos de paio, tendo sido obtidos valores de 3,39 mg/kg e 13,02 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos. O aumento do teor de histamina continuou até ao produto acabado, obtendo-se valores de 52,01 mg/kg e 20,37 mg/kg, para os paios controlo e as paios sem nitratos/nitritos.

Em relação ao teor de tiramina, na carne foi obtido um valor de 18,10 mg/kg, tendo havido um aumento na massa pré-enchimento para valores de 20,19 mg/kg e 25,67 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos. O aumento dos valores do teor de tiramina foi registado até ao produto acabado. Sendo que para a meia cura foram obtidos valores de 72,54 mg/kg e 53,56 mg/kg e para o produto acabado foram obtidos valores de 101,65 mg/kg e 111,75 mg/kg, para os paios controlo e as paios sem nitratos/nitritos.

Relativamente ao teor de espermidina foi obtido um valor de 10,67 mg/kg para a carne. Este valor aumentou durante todo o processo de fabrico, sendo que para a massa pré-enchimento foram obtidos valores de 8,57 mg/kg e 8,40 mg/kg; para a meia cura foram obtidos valores de 12,37 mg/kg e 12,31 mg/kg e para o produto foram obtidos valores de 17,02 mg/kg e 22,12 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente.

No que toca ao teor de espermina foi obtido um valor de 18,18 mg/kg para a carne. Ao longo do processo de fabrico o teor de espermina aumentou, sendo que para a massa pré-enchimento foram obtidos valores de 26,73 mg/kg e 22,50 mg/kg; para a meia cura foram obtidos valores de 56,17 mg/kg e 42,08 mg/kg e para o produto acabado foram obtidos valores de 67,37 mg/kg e 76,37 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos.

Em relação ao teor de aminas vasoativas (triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina), bem como o teor de aminas totais, pode-se afirmar que ambos aumentaram ao longo do processo, tendo em conta os resultados da carne e do produto acabado. Sendo que, relativamente ao teor de aminas vasoativas, para o produto final foram obtidos valores de 284,08 mg/kg e 244,85 mg/kg para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente. Para o teor de aminas totais, no produto acabado foram obtidos valores de 480,38 mg/kg e 441,87 mg/kg, para os paios controlo e paios sem nitratos/nitritos, respetivamente.

As aminas biogénicas têm sido investigadas como um possível precursor mutagénico, isto é, algumas aminas biogénicas podem reagir com o nitrato sendo nitrosadas, resultando em nitrosaminas que representam um perigo para a saúde do consumidor, uma vez que são cancerígenas. O termo amina biogénica define os produtos resultantes da descarboxilação de aminoácidos, são exemplos a histamina, tiramina, feniletilamina, serotonina, triptamina, bem como poliaminas alifáticas. A origem das aminas biogénicas deve-se principalmente à descarboxilação microbiana de aminoácidos em alimentos, ou por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas através das transaminases dos aminoácidos (Ekici & Omer, 2018).

Em relação à triptamina e β -feniletilamina, estas são consideradas pequenas aminas que ocorrem nos enchidos. Ambas são formadas através da agregação de altas concentrações de tiramina com algumas BAL, bem como estafilococos coagulase-negativos (Ekici & Omer, 2018). A cadaverina é formada a partir da lisina pela ação de microrganismos contaminantes com capacidade para descarboxilação. Deste modo, a cadaverina é usada como um indicador de higiene alimentar e a putrescina é produzida através da ornitina. Estes aminoácidos são ambos produzidos pelas enterobactérias, consideradas microbiota indicadora de higiene. Assim, tanto a putrescina como a cadaverina são aminas biogénicas indicadoras de higiene alimentar (Park & Lee, 2012; Ekici & Omer, 2018), sendo desejável que os seus valores não excedam 150 mg/kg (Elias *et al.*, 2018).

Para além da putrescina e da cadaverina, a tiramina também é considerada uma amina indicadora de higiene, pois estas aminas biogénicas estão relacionadas com a atividade de microbiota indesejada, resultado de más práticas de higiene e fabricação. No âmbito da segurança dos alimentos, a histamina e tiramina são as aminas biogénicas mais importantes, devido aos seus efeitos toxicológicos. A formação de tiramina é devida, principalmente, à atividade das BAL, particularmente os enterococos (Alves *et al.*, 2017). No entanto, também existem outros fatores para a formação de aminas biogénicas ao longo do processo de fabrico, nomeadamente fatores intrínsecos e extrínsecos, como por exemplo o teor de sal e os parâmetros de secagem (De Mey *et al.*, 2014).

Para além dos fatores acima citados, a formação de aminas biogénicas também depende da disponibilidade de aminoácidos específicos (como por exemplo, histidina, tirosina, ornitina, lisina, triptofano e fenilalanina, para a formação de histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina e β -feniletilamina, respetivamente); presença de bactérias com genes que codificam descarboxilases e condições ideais para o crescimento bacteriano e atividade enzimática (Lorenzo *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). No entanto, também há a formação de poliaminas como a espermidina e a espermina, cuja origem é a amina biogénica putrescina (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019).

O consumo de alimentos contendo elevadas concentrações de aminas biogénicas leva a más consequências para a saúde do consumidor. Nomeadamente o consumo de alimentos com elevadas concentrações de histamina e tiramina, podem gerar crises de hipertensão e enxaquecas, que ocorrem com mais frequência em indivíduos sensíveis. De salientar que, a presença da putrescina e da cadaverina resulta numa intensificação dos efeitos secundários do consumo de alimentos com histamina e tiramina, pois a putrescina e a cadaverina competem com a histamina e a tiramina pelos mesmos mecanismos de desintoxicação (De Mey *et al.*, 2014).

Como dito anteriormente, as BAL, estafilococos e enterobactérias são as principais bactérias responsáveis pela formação de aminas. Assim, ao observar o **Quadro 10**

pode-se afirmar que no produto acabado há uma contagem relativamente elevada de BAL, enquanto que a contagem de enterobactérias é muito menor. O mesmo acontece com as contagens de estafilococos que são cerca de metade das contagens das BAL. Contudo, no início do processo houve um elevado crescimento de enterobactérias e de estafilococos, o que levou à formação das aminas biogénicas. Apesar das contagens destas bactérias terem diminuído ao longo do processo isso não significa que o teor de aminas diminua, isto porque as aminas são termicamente estáveis e uma vez formadas são muito difíceis de destruir (Sun *et al.*, 2018). No entanto, também há um aumento das contagens das BAL ao longo do processo, e assim este crescimento bacteriano torna-se mais um fator importante no aumento do teor de aminas biogénicas ao longo do processo de fabrico.

Ao observar o **Quadro 12** pode-se inferir que de um modo geral há uma pequena diminuição dos teores de aminas biogénicas para as amostras sem nitratos/nitritos. De acordo com Stadnik (2018) as aminas biogénicas são produzidas essencialmente por bactérias Gram-positivo, sendo que a atividade da descarboxilase é encontrada maioritariamente em estirpes de *Bacillus* e *Staphylococcus*. Apesar de produtos cárneos com perfis microbiológicos idênticos poderem ser comparáveis, isso não significa que tenham um perfil de aminas biogénicas idêntico, ou seja, a produção de aminas depende de diversos fatores, como o teor de sal, os parâmetros de secagem do produto e disponibilidade de aminoácidos específicos. Kurt & Zorba (2010) obtiveram uma diminuição do teor de aminas biogénicas com o aumento da concentração de nisina. A nisina é um antibacteriano produzido pelas BAL (Adams & Moss, 2009b). De acordo com os resultados para os parâmetros microbiológicos (**Quadro 10**) é possível observar que houve um maior desenvolvimento no crescimento das BAL ao longo do processo para as amostras sem nitratos/nitritos. Apesar de as BAL serem responsáveis pela formação de algumas aminas biogénicas e pela diminuição do pH ao longo do processo, tornando o produto mais ácido o que é ideal para a formação de aminas, também produzem nisina. Neste estudo as BAL foram estudadas de uma forma geral, ou seja, não foram estudadas estirpes de forma específica. Ou seja, ao longo do processo a

produção de nisina por algumas estirpes de BAL podem ter levado à inibição das estirpes que têm a capacidade de descarboxilação que leva à formação de aminas, uma vez que no estudo de Kurt & Zorba (2010) a nisina conseguiu inibir algumas estirpes de BAL.

Diversos autores realizaram ensaios em enchidos de modo a conhecer o seu perfil de aminas biogénicas. Alves *et al.* (2017) realizou um estudo em diversos enchidos, nomeadamente em três linguiças, chouriço de carne e dois paios. Os resultados obtidos encontram-se no **Quadro 13**.

Quadro 13. Perfil de aminas biogénicas obtido por Alves *et al.* (2017). Valores expressos em mg/kg de peso fresco.

Enchidos	Linguiça A	Linguiça B	Linguiça C	Chouriço de carne	Paio A	Paio B
Triptamina	6,4	3,1	13,4	1,3	6,5	42,7
β-feniletilamina	29,4	3,3	4,8	1,1	9,2	11,1
Putrescina	26,6	144,0	101,0	34,9	181,0	334,0
Cadaverina	59,1	132,0	75,9	117,0	73,7	69,6
Histamina	<0,2	47,1	<0,2	<0,2	108,0	133,0
Tiramina	75,6	149,0	73,37	143,0	124,0	206,0
Espermidina	7,8	4,2	5,6	7,5	4,1	5,5
Espermina	19,3	14,9	22,9	18,7	20,5	33,1

Ekici & Omer (2018) realizaram um estudo em enchidos fermentados turcos (não especificado) em 10 marcas diferentes. Os resultados obtidos encontram-se no **Quadro 14**.

Quadro 14. Perfil de aminas biogénicas obtido por Ekici & Omer (2018). Valores expressos em mg/kg de peso fresco.

Marca	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Triptamina	20,00	40,88	25,54	22,78	37,39	33,36	11,1	16,63	35,72	19,82
β-feniletilamina	2,473	2,329	7,588	2,622	4,297	5,530	7,746	37,750	4,376	2,207
Putrescina	24,602	2,318	6,570	4,278	1,008	1,050	1,073	5,093	1,278	1,168
Cadaverina	320,0	203,5	162,1	72,2	211,8	23,8	630,6	681,2	41,40	148,0
Histamina	99,88	41,50	5,18	13,68	68,89	0,87	343,91	280,26	23,39	43,91
Tiramina	160,67	95,78	118,55	69,42	162,40	63,61	273,91	265,37	53,50	56,26
Espermidina	34,41	68,71	54,05	40,66	53,41	52,43	19,38	23,84	26,64	13,24
Espermina	7,55	19,96	10,28	2,74	3,85	6,05	38,28	16,16	17,7	19,06

Ikonić *et al.* (2013) realizaram um estudo em *Petrovska klobasa*, um enchido fermentado tradicional do norte da Sérvia. Para o produto acabado foram obtidos valores de 41,9 mg/kg, 18,7 mg/kg, 18,5 mg/kg, 13,2 mg/kg, 31,2 mg/kg e 37,8 mg/kg, para a triptamina, β -feniletilamina, putrescina, cadaverina, tiramina e espermina, respetivamente. A histamina e a espermidina não foram detetadas em nenhuma das amostras analisadas. Todas as aminas analisadas são expressas em mg/kg de peso seco.

Coloretti *et al.* (2014) realizaram um estudo em enchidos fermentados (não especificado). Para o produto acabado foram obtidos os seguintes valores: 56,41 mg/kg, 75,59 mg/kg, 22,19 mg/kg, 3,70 mg/kg, 102,90 mg/kg, 190,43 mg/kg e 26,79 mg/kg, para tiramina, histamina, β -feniletilamina, triptamina, cadaverina, putrescina e espermina, respetivamente. A espermidina esteve abaixo do limite de deteção. Todas as aminas analisadas são expressas em mg/kg de peso fresco.

Dias *et al.* (2018) realizaram um estudo em paio, onde foram obtidos os seguintes valores para o produto acabado: 26,21 mg/kg, 4,80 mg/kg, 329,11 mg/kg, 439,42

mg/kg, 10,58 mg/kg, 113,99 mg/kg, 11,02 mg/kg e 37,88 mg/kg, para triptamina, β -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina, respetivamente. Todas as aminas analisadas são expressas em mg/kg de peso fresco.

Domínguez *et al.* (2016b) realizaram um estudo em enchidos curados de poltro. Foram obtidos valores de 4,53 mg/kg, 3,27 mg/kg, 15,59 mg/kg, 4,12 mg/kg, 7,23 mg/kg, 11,75 mg/kg e 24,10 mg/kg, para β -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina, respetivamente. Todas as aminas analisadas são expressas em mg/kg de peso fresco.

De Mey *et al.* (2014) realizaram um estudo em enchidos fermentados, nomeadamente enchido seco e *chorizo*. Para o enchido seco foram obtidos os seguintes valores: 5,6 mg/kg, 6,7 mg/kg, 3,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 6,1 mg/kg e 0,3 mg/kg, para triptamina, putrescina, cadaverina, tiramina, espermina e espermidina, respetivamente. A β -feniletilamina e histamina estiveram abaixo do limite de deteção. Todas as aminas analisadas são expressas em mg/kg de peso fresco.

Laranjo *et al.* (2016) realizaram um estudo em catalão e salsichão. Para o catalão foram obtidos os seguintes valores: 117,22 mg/kg, 4,43 mg/kg, 103,36 mg/kg, 5,86 mg/kg, 43,31 mg/kg, 53,22 mg/kg e 50,62 mg/kg, para triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina, respetivamente. A β -feniletilamina esteve abaixo do limite de deteção. Para o salsichão foram obtidos os seguintes valores: 119,87 mg/kg, 83,34 mg/kg, 9,04 mg/kg, 122,62 mg/kg, 6,39 mg/kg e 48,90 mg/kg, para triptamina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina, respetivamente. A β -feniletilamina e a putrescina encontravam-se abaixo do limite de deteção. Todas as aminas analisadas são expressas em mg/kg de peso fresco.

Através do **Quadro 12** é possível observar que para o produto acabado a amina biogénica predominante é a tiramina. Estes resultados estão de acordo com os resultados de De Mey *et al.* (2014), Alves *et al.* (2017) (para duas linguiças e o chouriço de carne) e Ekici & Omer (2018) (para três das dez fábricas estudadas). Contudo, segundo Ferreira *et al.* (2006) para além da tiramina, a β -feniletilamina também é uma das

aminas mais abundantes nos enchidos, o que não se verificou no presente estudo. Também no presente estudo existe um elevado valor de triptamina, podendo ser resultado do crescimento microbiano, nomeadamente das BAL e dos estafilococos (**Quadro 10**), pois, como foi dito anteriormente, a triptamina é o resultado da agregação de concentrações elevadas de tiramina com as BAL e estafilococos coagulase-negativos (Ekici & Omer, 2018).

Ao comparar os resultados obtidos no nosso estudo com os resultados de outros autores, acima apresentados, é possível inferir que para a maioria dos resultados de outros autores há uma discrepância em relação aos resultados deste estudo, mais propriamente nos teores de triptamina e β -feniletilamina. A concentração destas aminas biogénicas é normalmente reduzida, sendo a triptamina e a β -feniletilamina consideradas como aminas menores em enchidos. Tendo em conta que a putrescina e cadaverina são aminas biogénicas utilizadas como indicadores de higiene, pode-se afirmar que em relação aos estudos de outros autores apresentados, o processo de fabrico do presente estudo indica uma fraca higiene, sendo necessário proceder a alterações no processo de higiene e desinfeção, quer dos trabalhadores da fábrica em questão, quer dos equipamentos e dos materiais utilizados no fabrico do paio. Estas diferenças entre resultados de produtos semelhantes pode dever-se a diversas razões, como por exemplo a matéria-prima utilizada, pois a carne é uma fonte natural do substrato utilizado para a formação de aminas biogénicas (Stadnik, 2018). Outro fator que poderá contribuir para as diferenças de resultados poderá ser a utilização ou não de culturas de arranque de BAL. Contudo mesmo que a formulação dos enchidos seja semelhante há que ter em consideração o calibre do enchido, a temperatura ao longo do processo, o potencial redox, a evolução do pH e o teor de sal utilizado, entre outros fatores.

De acordo com os resultados obtidos e tendo em consideração as diferenças nos teores das aminas biogénicas em estudo, pode-se afirmar que a eliminação dos nitratos/nitritos não tem efeito significativo. Assim, a nível dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e do perfil de aminas biogénicas poder-se-á recomendar a eliminação dos nitratos e nitritos na formulação do paio. Contudo será preciso realizar mais análises

de modo a perceber quais as alterações nas características organoléticas, já que a nível de segurança dos alimentos não existem diferenças significativas.

CAPÍTULO VII

Conclusões



7. Conclusões

Para dar cumprimento ao primeiro objetivo deste trabalho foi feita uma caracterização físico-química e microbiológica de um produto cárneo curado seco, o paio. Esta caracterização foi feita ao longo do processo de fabrico em duas fábricas do Alentejo. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que existem diferenças no processo de fabrico do paio entre as duas fábricas em estudo. As diferenças entre os resultados destas duas fábricas poderão ter origem nos hábitos de higiene e limpeza/desinfecção praticados em cada fábrica, bem como no processo tecnológico.

Em relação às análises realizadas na fábrica A, foi detetada a presença de *Salmonella* spp., demonstrando que as práticas de higiene e limpeza/desinfecção desta fábrica podem e devem ser melhoradas, pois a *Salmonella* spp. é uma bactéria que pertence ao grupo das enterobactérias, cujo *habitat* é o trato gastrointestinal. Assim, a presença de *Salmonella* spp. poderá estar relacionada com o tipo de tripa que é utilizada no processo de fabrico. Na mesma fábrica (fábrica A) foram obtidas contagens elevadas de *Listeria monocytogenes*. A *L. monocytogenes* é uma bactéria ubiquitária e o seu crescimento pode ter origem na utilização de matéria-prima (carne) contaminada (tendo ocorrido no matadouro ou na fábrica em questão), ou numa má higienização do ambiente fabril. Foi ainda observada uma diminuição do crescimento de *L. monocytogenes* entre a meia cura e o produto acabado, devida sobretudo à diminuição dos valores de a_w , o que demonstra um bom processo de cura/fumagem, por parte da fábrica.

Relativamente às análises realizadas na fábrica B, não houve crescimento de *Salmonella* spp. nem de *L. monocytogenes* e as contagens de enterobactérias foram também inferiores às da fábrica A. Deste modo, parece-nos que na fábrica B há um maior cuidado a nível da higiene em geral, e da limpeza/desinfecção dos materiais e equipamentos, que o que faz com que o produto da fábrica B seja mais seguro a nível microbiológico.

Salienta-se que ambas as fábricas obtiveram valores de pH e a_w que promovem a segurança e estabilidade do produto final, apesar das diferenças observadas entre as duas fábricas.

O segundo objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da eliminação de nitratos e nitritos na formulação do paio. Esta avaliação apenas foi realizada na fábrica A, cuja formulação habitual do paio tem uma concentração de nitratos/nitritos considerada normal em relação ao que é utilizado neste tipo de produtos. Após a realização deste estudo foi possível observar que não existem diferenças significativas entre os paios controlo e os paios sem nitratos e nitritos. No entanto, como também foi observado na primeira parte do estudo, as contagens de *L. monocytogenes* foram elevadas. Tal como foi dito no parágrafo anterior, esta contaminação tem origem ambiental, pelo que pode ter origem numa matéria-prima que já vem contaminada do matadouro (por falta de higienização ou má higienização deste) e/ou na má prática de higiene e limpeza/desinfecção na própria fábrica. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a eliminação de nitratos e nitritos na formulação do paio não causa alterações nos parâmetros físico-químicos estudados, nem aumento das contagens microbiológicas ou do teor em aminas biogénicas. Consequentemente, a eliminação de nitratos e nitritos na formulação do paio traduz-se num benefício resultante da eliminação ou redução do teor em nitrosaminas, uma vez que estas são formadas a partir da reação entre uma amina biogénica e um agente nitrosante como o nitrito. Ainda assim, e apesar de se esperar um menor teor de nitrosaminas com a eliminação dos nitratos e nitritos na formulação, deverão ser feitas análises aos paios sem nitratos e nitritos para se confirmar esta hipótese.

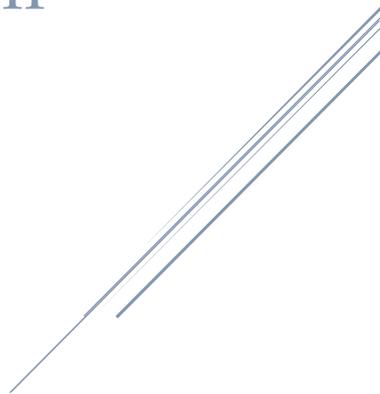
Além do mais, é necessário assegurar a manutenção da qualidade do paio, avaliada através de parâmetros como a cor, o aroma, o sabor e a textura. Os nitratos e nitritos são compostos utilizados como conservantes, pelo que podem ter influência no desenvolvimento destes parâmetros. Portanto, deverão ser realizadas análises à cor e à textura do paio, bem como análises sensoriais em amostras controlo e sem nitratos e

nitritos para se perceber se há diferenças nas características organolépticas. A aceitação destes novos produtos por parte do consumidor também deve ser assegurada.

Por fim, recomenda-se a realização de análises aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e ao perfil de aminas biogénicas ao longo do período de validade do produto, uma vez que no presente estudo apenas se realizaram análises ao longo do processo de fabrico até ao produto acabado.

Com base nos resultados obtidos neste estudo e realizadas as análises adicionais sugeridas, poderá eventualmente vir a propor-se às salsicharias a redução ou mesmo a eliminação de nitratos e nitritos da formulação deste tipo de produtos cárneos curados.

CAPÍTULO VIII
Referências
bibliográficas



8. Referências bibliográficas

- Adams, M.R., Moss, M.O., 2009a. The Microbiology of Food Preservation, in: Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, pp. 63–118.
- Adams, M.R., Moss, M.O., 2009b. Fermented and Microbial Food, in: Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, pp. 310–369.
- Adams, M.R., Moss, M.O., 2009c. Bacterial Agents of Foodborne Illness, in: Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, pp. 182–269.
- Alfaia, A., Alfaia, C.M., Patarata, L., Fernandes, M.J., Fernandes, M.H., Elias, M., Ribeiro, M.H., Fraqueza, M.J., 2015. Binomial effects of high isostatic pressure and time on the microbiological, sensory characteristics and lipid composition stability of vacuum packed dry fermented sausages “chouriço.” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 32, 37–44. doi:10.1016/j.ifset.2015.09.012
- Alves, S.P., Alfaia, C.M., Škrbić, B.D., Živančev, J.R., Fernandes, M.J., Bessa, R.J.B., Fraqueza, M.J., 2017. Screening chemical hazards of dry fermented sausages from distinct origins: Biogenic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy elements. *J. Food Compos. Anal.* 59, 124–131. doi:10.1016/j.jfca.2017.02.020
- Ambrosiadis, J., Soultos, N., Abraham, A., Bloukas, J.G., 2004. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. *Meat Sci.* 66, 279–287. doi:10.1016/S0309-1740(03)00100-1
- Banks, L.D., Harris, K.L., Harris, K.J., Mantey, J.A., Hood, D.B., Archibong, A.E., Ramesh, A., 2019. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, in: Biomarkers in Toxicology. Academic Press, pp. 519–527. doi:10.1016/B978-0-12-814655-2.00029-3
- Ben Slima, S., Ktari, N., Trabelsi, I., Triki, M., Feki-Tounsi, M., Moussa, H., Makni, I., Herrero, A., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas Perez, C., Ben Salah, R., 2017.

- Effect of partial replacement of nitrite with a novel probiotic *Lactobacillus plantarum* TN8 on color, physico-chemical, texture and microbiological properties of beef sausages. *LWT - Food Sci. Technol.* 86, 219–226. doi:10.1016/j.lwt.2017.07.058
- Berardo, A., Devreese, B., De Maere, H., Stavropoulou, D.A., Van Royen, G., Leroy, F., De Smet, S., 2017. Actin proteolysis during ripening of dry fermented sausages at different pH values. *Food Chem.* 221, 1322–1332. doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.023
- Blaschek, H.P., 2014. *Clostridium* 1, 444–448. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00067-7
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K.Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. El, Benbrahim-tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K., Agency, I., Working, M., 2015. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat 2045, 1–2. doi:10.1016/S1470-2045(15)00444-1
- Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., 2014. Processing Contaminants: Biogenic Amines. *Encycl. Food Saf.* 2, 381–391. doi:10.1016/B978-0-12-378612-8.00216-X
- Bryan, N.S., van Grinsven, H., 2013. The Role of Nitrate in Human Health, *Advances in Agronomy*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-407247-3.00003-2
- Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E., Córdoba, M.G., 2012. Microbiological quality of salchichón and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. *Food Control* 24, 191–198. doi:10.1016/j.foodcont.2011.09.026
- Cenci-Goga, B.T., Rossitto, P. V., Sechi, P., Parmegiani, S., Cambiotti, V., Cullor, J.S., 2012. Effect of selected dairy starter cultures on microbiological, chemical and sensory characteristics of swine and venison (*Dama dama*) nitrite-free dry-cured

- sausages. *Meat Sci.* 90, 599–606. doi:10.1016/j.meatsci.2011.09.022
- Chen, J., Hu, Y., Wen, R., Liu, Q., Chen, Q., Kong, B., 2019. Effect of NaCl substitutes on the physical, microbial and sensory characteristics of Harbin dry sausage. *Meat Sci.* 156, 205–213. doi:10.1016/j.meatsci.2019.05.035
- Chen, X., Huang, G., An, C., Yao, Y., Zhao, S., 2018. Emerging N- nitrosamines and N- nitramines from amine-based post- combustion CO₂ capture – A review. *Chem. Eng. J.* 335, 921–935. doi:10.1016/j.cej.2017.11.032
- Chen, X., Li, Jiapeng, Zhou, T., Li, Jinchun, Yang, J., Chen, W., Xiong, Y.L., 2016. Two efficient nitrite-reducing *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented pork (Nanx Wudl) as competitive starter cultures for Chinese fermented dry sausage. *Meat Sci.* 121, 302–309. doi:10.1016/j.meatsci.2016.06.007
- Christieans, S., Picgirard, L., Parafita, E., Lebert, A., Gregori, T., 2018. Impact of reducing nitrate/nitrite levels on the behavior of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in French dry fermented sausages. *Meat Sci.* 137, 160–167. doi:10.1016/j.meatsci.2017.11.028
- Coloretti, F., Tabanelli, G., Chiavari, C., Lanciotti, R., Grazia, L., Gardini, F., Montanari, C., 2014. Effect of wine addition on microbiological characteristics, volatile molecule profiles and biogenic amine contents in fermented sausages. *Meat Sci.* 96, 1395–1402. doi:10.1016/j.meatsci.2013.11.027
- Crawford, C.B., Quinn, B., 2017. The interactions of microplastics and chemical pollutants. *Microplastic Pollut.* 131–157. doi:10.1016/b978-0-12-809406-8.00006-2
- De Mey, E., De Klerck, K., De Maere, H., Dewulf, L., Derdelinckx, G., Peeters, M.C., Fraeye, I., Vander Heyden, Y., 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 Sci.* 96, 821–828.

doi:10.1016/j.meatsci.2013.09.010

Demirok Soncu, E., Arslan, B., Ertürk, D., Küçükkaya, S., Özdemir, N., Soyer, A., 2018. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Turkish fermented sausages (sucuk) coated with chitosan-essential oils. *Lwt* 97, 198–204. doi:10.1016/j.lwt.2018.06.049

Dias, I., Laranjo, M., Fialho, R., Potes, M.E., Véstia, J., Agulheiro-Santos, A.C., Fraqueza, M.J., Elias, M., 2018. Effect of autochthonous starter cultures in the production of Paio, a traditional Portuguese dry-cured sausage. *Arch. Zootec.* 66, 161–165. doi:http://dx.doi.org/10.21071/az.v66i254.2334

Domínguez, R., Agregán, R., Lorenzo, J.M., 2016a. Role of commercial starter cultures on microbiological, physicochemical characteristics, volatile compounds and sensory properties of dry-cured foal sausage. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 6, 396–403. doi:10.1016/S2222-1808(15)61055-6

Domínguez, R., Munekata, P.E., Agregán, R., Lorenzo, J.M., 2016b. Effect of commercial starter cultures on free amino acid, biogenic amine and free fatty acid contents in dry-cured foal sausage. *LWT - Food Sci. Technol.* 71, 47–53. doi:10.1016/j.lwt.2016.03.016

Dwivedi, H.P., Devulder, G., Juneja, V.K., 2014. *Salmonella: Detection by Immunoassays*, Second Edi. ed, *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00299-8

Ecdc-efsa, 2020. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections linked to eggs, fourth update. *Eur. Cent. Dis. Prev. Control.* doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1799

ECDC, 2020. *Salmonellosis - Annual Epidemiological Report for 2017*. *Eur. Cent. Dis. Prev. Control.*

- Ekici, K., Omer, A.K., 2018. The determination of some biogenic amines in Turkish fermented sausages consumed in Van. *Toxicol. Reports* 5, 639–643. doi:10.1016/j.toxrep.2018.05.008
- Elias, M., Fraqueza, M.J., Laranjo, M., 2018. Biogenic Amines in Food: Presence and Control Measures, in: Joanna Stadnik (Ed.), *Biogenic Amines*. Nova Science Publisher, Inc, pp. 129–176.
- Elias, M., Potes, M.E., Roseiro, L.C., Santos, C., Gomes, A., 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 3, 45–56. doi:10.5539/jfr.v3n3p45
- Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Pérez-Alvarez, J.A., 2008. Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Sci.* 80, 410–417. doi:10.1016/j.meatsci.2008.01.010
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Felício, M.T., Mena, C., Hogg, T., Gibbs, P., Teixeira, P., 2007a. Characterisation of alheiras, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. *Food Control* 18, 436–440. doi:10.1016/j.foodcont.2005.11.011
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Gibbs, P., Hogg, T., Teixeira, P., 2009. Microbiological profile of Salpicão de Vinhais and Chouriça de Vinhais from raw materials to final products: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 279–283. doi:10.1016/j.ifset.2008.11.001
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., João Monteiro, M., Hogg, T., Gibbs, P., Teixeira, P., 2007b. Chemical and microbiological characterisation of “Salpicão de Vinhais” and “Chouriça de Vinhais”: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Food Microbiol.* 24, 618–623.

doi:10.1016/j.fm.2006.12.007

- Ferreira, V., Barbosa, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., Monteiro, M.J., Hogg, T., Gibbs, P., Teixeira, P., 2006. Chemical and microbiological characterization of alheira: A typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Sci.* 73, 570–575. doi:10.1016/j.meatsci.2006.02.011
- Fiedorowicz, J.G., Swartz, K.L., 2004. The role of monoamine oxidase inhibitors in current psychiatric practice. *J. Psychiatr. Pract.*
- Gallego, M., Mora, L., Escudero, E., Toldrá, F., 2018. Bioactive peptides and free amino acids profiles in different types of European dry-fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 276, 71–78. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.009
- García Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Martínez, S., Franco, I., Carballo, J., 2007a. Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 1610–1622. doi:10.1016/j.lwt.2006.10.007
- García Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Parada, A., Franco, I., Carballo, J., 2007b. Microbiological characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiol.* 24, 52–58. doi:10.1016/j.fm.2006.03.007
- Gika, H., Kaklamanos, G., Manesiotis, P., Theodoridis, G., 2015. Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography, 1st ed, *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00159-8
- Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., Pereira, A.P., Gomes, A., Araújo, J.P., Saavedra, M.J., Estevinho, L., Butler, F., Pires, P., Dias, T., 2015. Relating physicochemical and microbiological safety indicators during processing of linguíça, a Portuguese traditional dry-fermented sausage. *Food Res. Int.* 78, 50–61. doi:10.1016/j.foodres.2015.11.007
- González, B., Díez, V., 2002. The effect of nitrite and starter culture on microbiological

- quality of “chorizo” - A Spanish dry cured sausage. *Meat Sci.* 60, 295–298. doi:10.1016/S0309-1740(01)00137-1
- Greppi, A., Ferrocino, I., La Stora, A., Rantsiou, K., Ercolini, D., Cocolin, L., 2015. Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *Int. J. Food Microbiol.* 212, 67–75. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.016
- Grubbs, F.E., 1950. Sample Criteria for Testing Outlying Observations. *Ann. Math. Stat.* 21, 27–58. doi:10.1214/aoms/1177729885
- Gushgari, A.J., Halden, R.U., 2018. Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. *Chemosphere* 210, 1124–1136. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.07.098
- Hospital, X.F., Carballo, J., Fernández, M., Arnau, J., Gratacós, M., 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. doi:10.1016/j.foodcont.2015.04.024
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M., 2014. Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella Typhimurium*. *Food Res. Int.* 62, 410–415. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.055
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M., 2012. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 395–401. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.032
- Hospital, X.F., Hierro, E., Stringer, S., Fernández, M., 2016. A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 218, 66–70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.009

- Hu, Y., Chen, Q., Wen, R., Wang, Y., Qin, L., Kong, B., 2019. Quality characteristics and flavor profile of Harbin dry sausages inoculated with lactic acid bacteria and *Staphylococcus xylosum*. *Lwt* 114, 108392. doi:10.1016/j.lwt.2019.108392
- Hui, Y.H., 2012. Meat Safety and Workers Safety, in: *Handbook of Meat and Meat Processing*. CRC Press, pp. 701–957.
- Ikonić, P., Tasić, T., Petrović, L., Škaljac, S., Jokanović, M., Mandić, A., Ikonić, B., 2013. Proteolysis and biogenic amines formation during the ripening of Petrovska klobása, traditional dry-fermented sausage from Northern Serbia. *Food Control* 30, 69–75. doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.021
- ISO 11290-2, 2015. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 2: Enumeration method.
- ISO 15214, 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees C.
- ISO 21528, 2017. Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae-Part 2: Colony- count technique.
- ISO 2917, 1999. Meat and meat products – Measurement of pH (Reference method).
- ISO 6579, 2002. Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* -- Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., 2005. *Modern Food Microbiology*, 7th ed. Springer.
- Jenkins, C., Rentenaar, R.O.B.J., Landraud, L., Brisse, S., 2017. Enterobacteriaceae, in: *Infectious Diseases*. pp. 1565–1578. doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00180-5

- Kurt, S., Zorba, O., 2010. Biogenic amine formation in Turkish dry fermented sausage (sucuk) as affected by nisin and nitrite. *J. Sci. Food Agric.* 90, 2669–2674. doi:10.1002/jsfa.4138
- Laranjo, M., Agulheiro-Santos, A.C., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Fraqueza, M.J., Elias, M., 2015. Effects of genotype, salt content and calibre on quality of traditional dry-fermented sausages. *Food Control* 56, 119–127. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.018
- Laranjo, M., Elias, M., 2015. Salsicharia Tradicional Portuguesa Melhorar a Segurança , Manter a Qualidade 6–11.
- Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A.C., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Rocha, J.M., Roseiro, L.C., Fernandes, M.J., Fernandes, M.H., Fraqueza, M.J., Elias, M., 2016. Characterisation of “Catalão” and “Salsichão” Portuguese traditional sausages with salt reduction. *Meat Sci.* 116, 34–42. doi:10.1016/j.meatsci.2016.01.015
- Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A.C., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Rocha, J.M., Roseiro, L.C., Fernandes, M.J., Fraqueza, M.J., Elias, M., 2017. Impact of salt reduction on biogenic amines, fatty acids, microbiota, texture and sensory profile in traditional blood dry-cured sausages. *Food Chem.* 218, 129–136. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.056
- Lázaro, C.A., Conte-Júnior, C.A., Canto, A.C., Monteiro, M.L.G., Costa-Lima, B., Cruz, A.G. da, Mársico, E.T., Franco, R.M., 2015. Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 15–21. doi:10.1016/j.lwt.2014.09.025
- Liu, S.J., Xu, J.J., Ma, C.L., Guo, C.F., 2018. A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC. *Food Chem.* 266, 275–283. doi:10.1016/j.foodchem.2018.06.001

- Lonergan, S.M., Topel, D.G., Marple, D.N., 2019. Sausage processing and production. *Sci. Anim. Growth Meat Technol.* 229–253. doi:10.1016/b978-0-12-815277-5.00014-7
- Lorenzo, J.M., Gómez, M., 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. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.025
- Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., Domínguez, R., 2017. Role of autochthonous starter cultures in the reduction of biogenic amines in traditional meat products. *Curr. Opin. Food Sci.* 14, 61–65. doi:10.1016/j.cofs.2017.01.009
- Montanari, C., Gatto, V., Torriani, S., Barbieri, F., Bargossi, E., Lanciotti, R., Grazia, L., Magnani, R., Tabanelli, G., Gardini, F., 2018. Effects of the diameter on physico-chemical, microbiological and volatile profile in dry fermented sausages produced with two different starter cultures. *Food Biosci.* 22, 9–18. doi:10.1016/j.fbio.2017.12.013
- Motarjemi, Y., Lelieveld, H., 2014. Fundamentals in Management of Food Safety in the Industrial Setting: Challenges and Outlook of the 21st Century, in: *Food Safety Management - A Practical Guide for the Food Industry*. Elsevier, pp. 1–20.
- NP 2262, 1986. Regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores.
- Omer, M.K., Prieto, B., Rendueles, E., Alvarez-Ordoñez, A., Lunde, K., Alvseike, O., Prieto, M., 2015. Microbiological, physicochemical and sensory parameters of dry fermented sausages manufactured with high hydrostatic pressure processed raw meat. *Meat Sci.* 108, 115–119. doi:10.1016/j.meatsci.2015.05.002
- Park, Y.S., Lee, J.Y., 2012. The effect of kimchi on the microbiological stability of fermented sausage. *Meat Sci.* 92, 721–727. doi:10.1016/j.meatsci.2012.06.028

- Pavli, F.G., Argyri, A.A., Chorianopoulos, N.G., Nychas, G.-J.E., Tassou, C.C., 2019. Effect of *Lactobacillus plantarum* L125 strain with probiotic potential on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of dry-fermented sausages. *Lwt* 108810. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108810>
- Perea-Sanz, L., Montero, R., Belloch, C., Flores, M., 2019. Microbial changes and aroma profile of nitrate reduced dry sausages during vacuum storage. *Meat Sci.* 147, 100–107. doi:[10.1016/j.meatsci.2018.08.026](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.08.026)
- Perea-Sanz, L., Montero, R., Belloch, C., Flores, M., 2018. Nitrate reduction in the fermentation process of salt reduced dry sausages: Impact on microbial and physicochemical parameters and aroma profile. *Int. J. Food Microbiol.* 282, 84–91. doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.004)
- Pereira, J. A. M., Porto-Figueira, P., Andrade, B., Gonçalves, P., Pataca, J., Câmara, J.S., 2018. Biogenic Amines in Food: Occurrence and Analytical Challenges for Their Analysis, in: Stadnik, J. (Ed.), *Biogenic Amines*. pp. 1–24.
- Podkowik, M., Park, J.Y., Seo, K.S., Bystro, J., Bania, J., 2013. International Journal of Food Microbiology Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci 163, 34–40. doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005)
- Potes, M.E., Laranjo, M., Elias, M., 2018. Animal Health, Biosafety and Food Safety. *Arch. Zootec.* 131–135.
- Prado, N., Sampayo, M., González, P., Lombó, F., Díaz, J., 2019. Physicochemical, sensory and microbiological characterization of Asturian Chorizo, a traditional fermented sausage manufactured in Northern Spain. *Meat Sci.* 156, 118–124. doi:[10.1016/j.meatsci.2019.05.023](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.05.023)
- Prevost, S., Cayol, J., Zuber, F., Tholozan, J., Remize, F., 2013. Characterization of clostridial species and sulfite-reducing anaerobes isolated from foie gras with respect to microbial quality and safety. *Food Control* 32, 222–227.

doi:10.1016/j.foodcont.2012.11.030

Riel, G., Boulaaba, A., Popp, J., Klein, G., 2017. Effects of parsley extract powder as an alternative for the direct addition of sodium nitrite in the production of mortadella-type sausages – Impact on microbiological, physicochemical and sensory aspects. *Meat Sci.* 131, 166–175. doi:10.1016/j.meatsci.2017.05.007

Rogers, K.L., Fey, P.D., Rupp, M.E., 2009. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 23, 73–98. doi:10.1016/j.idc.2008.10.001

Roseiro, C., Santos, C., Sol, M., Silva, L., 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 Sci.* 74, 557–563. doi:10.1016/j.meatsci.2006.03.030

Ruiz-Capillas, C., Herrero, A.M., 2019. Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods* 8. doi:10.3390/foods8020062

Santos, P.M., Nogal, S., Cordero, B.M., 2019. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in human biological samples : A critical review. *Trends Anal. Chem.* 113, 194–209. doi:10.1016/j.trac.2019.02.010

Sewell, A.M., Warburton, D.W., Boville, A., Daley, E.F., Mullen, K., 2003. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. From foods. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 123–129. doi:10.1016/S0168-1605(02)00221-0

Siriken, B., Özdemir, M., Yavuz, H., Pamuk, S., 2006. The microbiological quality and residual nitrate/nitrite levels in turkish sausage (soudjouck) produced in Afyon Province, Turkey. *Food Control* 17, 923–928. doi:10.1016/j.foodcont.2005.06.011

Smyth, J.A., McNamee, P., 2008. *Staphylococci, streptococci and enterococci, Poultry Diseases.* Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-7020-2862-5.50022-2

- Spaziani, M., Torre, M. Del, Stecchini, M.L., 2009. Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *Meat Sci.* 81, 77–85. doi:10.1016/j.meatsci.2008.06.017
- Stadnik, J., 2018. Biogenic Amines in Dry-Cured and Fermented Meats, in: Joanna Stadnik (Ed.), *Biogenic Amines*. Nova Science Publisher, Inc.
- Sucu, C., Turp, G.Y., 2018. The investigation of the use of beetroot powder in Turkish fermented beef sausage (sucuk) as nitrite alternative. *Meat Sci.* 140, 158–166. doi:10.1016/j.meatsci.2018.03.012
- Sun, J., Cao, C. chen, Feng, M. qin, Xu, X. lian, Zhou, G. hong, 2019. Technological and safety characterization of coagulase-negative staphylococci with high protease activity isolated from Traditional Chinese fermented sausages. *Lwt* 114, 108371. doi:10.1016/j.lwt.2019.108371
- Sun, Q., Zhao, X., Chen, H., Zhang, C., Kong, B., 2018. Impact of spice extracts on the formation of biogenic amines and the physicochemical, microbiological and sensory quality of dry sausage. *Food Control* 92, 190–200. doi:10.1016/j.foodcont.2018.05.002
- Tabanelli, G., Montanari, C., Grazia, L., Lanciotti, R., Gardini, F., 2013. Effects of awat packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. *Meat Sci.* 94, 177–186. doi:10.1016/j.meatsci.2013.01.018
- Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., 2007. Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments 77, 570–579. doi:10.1016/j.meatsci.2007.05.006
- Walz, F.H., Gibis, M., Herrmann, K., Weiss, J., 2019. Impact of smoking on

efflorescence formation on dry-fermented sausages. *Food Struct.* 20, 100111.
doi:10.1016/j.foostr.2019.100111

Wang, X., Zhang, Y., Ren, H., Zhan, Y., 2018. Comparison of bacterial diversity profiles and microbial safety assessment of salami, Chinese dry-cured sausage and Chinese smoked-cured sausage by high-throughput sequencing. *LWT - Food Sci. Technol.* 90, 108–115. doi:10.1016/j.lwt.2017.12.011

Wenzl, T., Zelinkova, Z., 2018. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and feed, *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.21805-2

Youdim, M.B., Edmondson, D., Tipton, K.F., 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat. Rev. Neurosci.*

9. Websites consultados

[1] Merck, <https://www.sigmaaldrich.com/portugal.html>, acedido em 19 de Março de 2020.

[2] Scharlau, <https://www.scharlab.com>, acedido em 19 de Março de 2020.

[3] Biomerieux, <https://www.biomerieux.pt/>, acedido em 19 de Março de 2020.

[4] GraphPad para Teste de Grubbs, <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>, acedido em 19 de Fevereiro de 2020.