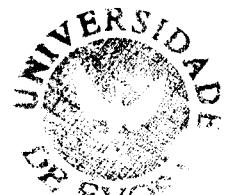


UNIVERSIDADE DE ÉVORA

CARACTERIZAÇÃO, CONSERVAÇÃO E PRODUÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DE PAIO DE PORCO ALENTEJANO

Miguel Nuno Geraldo Viegas dos Santos Elias



Dissertação apresentada para a obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Alimentar

Orientador: António Mário Rodrigues Ribeiro (Prof. Catedrático Jubilado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa)

Co-Orientador: Alfonso Vicente Carrascosa Santiago (Investigador Titular do Conselho Superior de Investigações Científicas, Madrid)

Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri

Évora, 2004

**Aos Engenheiros Zootécnicos
que, com competência, dignidade e dedicação,
souberam construir uma profissão.**

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Projecto PAMAF Nº 7174 – Caracterização de enchidos tradicionais do Alentejo. Estudo de culturas microbianas promotoras da tipicidade.

Índice

Resumo	VII
Abstract.....	XI
Agradecimentos	XIII
Introdução.....	1
I - Revisão bibliográfica	3
1 - O porco da raça Alentejana e o seu sistema de produção.....	5
1.1 - Os sistemas de produção do porco Alentejano	6
1.2 - O montado em Portugal.....	9
2 - Factores de qualidade dos produtos do porco Alentejano	11
2. 1. - Qualidade nutricional dos produtos do porco Alentejano	15
3 - Dados históricos sobre a produção de enchidos: das origens à actualidade	19
3.1 - Evolução da actividade salsicheira no sul de Portugal durante o último século.	21
4 - Tecnologia da produção de enchidos: etapas do processo de fabrico	25
4. 1 - Selecção das matérias-primas.....	25
4. 2 - Miga	26
4. 3 - Preparação da massa	27
4. 4 – Maturação das massas de carne.....	31
4. 5 - Enchimento.....	32
4. 6 - Cura	34
4. 7 - Algumas considerações sobre a fumagem	36
5 - Alterações físicas, bioquímicas e microbiológicas associadas à cura dos enchidos	41
5.1 - Alterações físicas.....	41

5. 2 – Alterações bioquímicas	43
5.2.1 - Fermentação de carbohidratos e produção de ácido láctico.....	43
5.2.1.1 - Importância tecnológica da fermentação dos hidratos de carbono	45
5.2.1.2 - Influência da fermentação dos hidratos de carbono sobre o aroma e o sabor dos enchidos	47
5.2.2 - Efeito dos nitratos e nitritos.....	48
5.2.2.1 - Transformação e estabilização pigmentar.....	48
5.2.2.2 - Produção de aroma e sabor.....	51
5.2.2.3 - Efeito antimicrobiano.....	52
5.2.3 - Lipólise.....	53
5.2.3.1 - Fenómenos hidrolíticos	54
5.2.3.1.1 - Lipólise endógena	55
5.2.3.1.2 - Lipólise exógena	56
5.2.3.1.3 - Influência da lipólise sobre o aroma e sabor	58
5.2.3.2 - A autoxidação nos enchidos	59
5.2.4 - Proteólise e alterações nos compostos azotados no decurso da cura dos enchidos	66
5.2.4.1 - Proteólise endógena	68
5.2.4.2 - Proteólise exógena.....	69
5.2.4.3 - Degradação dos aminoácidos.....	71
5.2.4.4 - Acção da proteólise na cor, textura, sabor e aroma dos enchidos.....	75
5.3 – Alterações microbiológicas.....	77
5.3.1 - Alterações na microbiota bacteriana.....	79
5.3.2 - Alterações na microbiota fúngica	81
6 - Culturas de arranque	85
6.1 – Contribuição das culturas de arranque para a melhoria da qualidade dos produtos de salsicharia	88
6.2 - Bactérias lácticas	90
6.2.1 - Características gerais	90
6.2.2 - Taxonomia	91
6.2.3 - Contribuição das bactérias lácticas para assegurar e melhorar a qualidade dos enchidos	93
6.2.4 - Actividade antimicrobiana das bactérias lácticas.....	96
6.2.4.1 - Actividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos	96
6.2.4.2 - Actividade antimicrobiana de componentes inorgânicos.....	97
6.3 - Micrococáceas.....	98
6.3.1 - Características gerais e taxonomia.....	99
6.3.2 - Contribuição das micrococáceas para assegurar e melhorar a qualidade dos enchidos	100
6.4 - Bolores	102
6.4.1 - Contribuição dos bolores para assegurar e melhorar a qualidade dos enchidos.	103
6.5 - Leveduras	105
6.5.1 - Contribuição das leveduras para assegurar e melhorar a qualidade dos enchidos	105

II – Metodologia	107
7 – Objectivos e plano do trabalho	109
8 – Materiais e métodos	111
8.1 - Matéria-prima e processo de fabrico.....	111
8. 2 – Duração e condições ambientais das etapas de fabrico	112
8.2.1 – Análise estatística	114
8.3 – Caracterização das matérias-primas subsidiárias	114
8.3.1 – Análise estatística	115
8.4 – Caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico	115
8.4.1 – Análise estatística	116
8.5 – Conservação do paio de porco Alentejano.....	116
8.5.1 – Análise estatística	117
8.6 - Selecção de estirpes da família <i>Micrococcaceae</i> e do género <i>Lactobacillus</i> para utilização como culturas de arranque no fabrico de enchidos	117
8.6.1 - Isolamento das estirpes a estudar	118
8.6.2 - Manutenção das estirpes isoladas.....	118
8.6.3 - Provas de identificação prévia	119
8.6.3.1 - Coloração pelo método de Gram	120
8.6.3.2. - Crescimento em anaerobiose	120
8.6.4 - Provas selectivas.....	120
8.6.4.1 - Produção de CO ₂	120
8.6.4.2 - Capacidade nitrato-reductase	121
8.6.4.3 - Tolerância ao cloreto de sódio	122
8.6.4.4 - Crescimento a 4,5°C e a 7°C	123
8.6.4.5 - Tolerância a 100 ppm de nitrito de sódio	123
8.6.5 - Identificação das estirpes seleccionadas.....	123
8.6.5.1 - Família <i>Micrococcaceae</i>	123
8.6.5.1.1 - Crescimento em agar FP	123
8.6.5.1.2 - Provas bioquímicas.....	124
8.6.5.1.2.1 – Galerias API STAPH	124
8.6.5.2 - Família <i>Lactobacillaceae</i>	126
8.6.5.2.1 - Provas bioquímicas	126
8.6.5.2.2.1.1 - Prova da acidificação a partir de hidratos de carbono	126
8.6.5.2.1.2 - Galeria API 50 CHL.....	127
8.6.6 – Outras provas de interesse tecnológico	127
8.6.6.1 - Capacidade proteolítica das estirpes seleccionadas.....	127
8.6.6.1.1 - Hidrólise da caseina.....	127
8.6.6.2 - Capacidade lipolítica das estirpes seleccionadas	128
8.6.6.2.1 - Hidrólise da tributirina	128
8.6.6.2.2 - Hidrólise do tween 40.....	128
8.6.6.2.3 - Hidrólise do tween 80.....	129
8.6.6.3 - Produção de compostos inibidores por <i>Lactobacillus</i> pelo método de difusão	129

8.6.6.4 - Liofilização	130
8.7 – Ensaios de inoculação.....	130
8.7.1 - Multiplicação das estirpes a inocular	130
8.7.2 - Inoculação das massas de carne para fabrico de paio	132
8.7.3 – Análise estatística	132
8.8 - Métodos laboratoriais	132
8.8.1 - Análises físico-químicas, químicas e físicas	132
8.8.1.1 - Preparação da amostra.....	133
8.8. 1.2 - pH.....	133
8.8. 1.3 - Actividade da água (a_w).....	133
8.8.1.4 - Humididade.....	133
8.8.1.5 - Teor de matéria gorda livre	133
8.8.1.6 - Proteína total.....	134
8.8.1.7 - Cinza total	134
8.8.1.8 - Teor de azoto básico volátil total (ABVT)	134
8.8.1.9 - Acidez da gordura	134
8.8.1.10 - Teor de cloreto.....	135
8.8.1.11 - Determinação objectiva da cor.....	135
8.8.1.12 - Perfil de ácidos gordos.....	135
8.8.1.13 - Determinações reológicas.....	136
8.8.2 - Análises microbiológicas dos enchidos	136
8.8.2.1 - Preparação da amostra.....	136
8.8.2.2 - Contagem de microrganismos mesófilos totais.....	137
8.8.2.3 - Contagem de microrganismos psicrotróficos totais.....	137
8.8.2.4 - Contagem de fungos	137
8.8.2.5 - Contagem de <i>Lactobacillus</i> spp.	137
8.8.2.6 - Contagem de bactérias ácido-lácticas.....	138
8.8.2.7 - Contagem de <i>Micrococcaceae</i>	138
8.8.2.8 - Contagem de esporos de bactérias aeróbias.....	138
8.8.2.9 - Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	138
8.8.2.10 - Contagem de <i>Streptococci</i> do grupo D	138
8.8.2.11 – Estimativa do número de células viáveis de esporos de <i>Clostridia</i> sulfito-redutores	139
8.8.2.12 - Estimativa do número de células viáveis de bactérias coliformes.....	139
8.8.2.13 - Estimativa do número de células viáveis de <i>Escherichia coli</i>	140
8.8.3 - Análises Microbiológicas à Água	140
8.8.3.1 – Preparação da amostra.....	140
8.8.3.2 - Bactérias aeróbias.....	140
8.8.3.3 - Estimativa do número mais provável de <i>Streptococci</i> fecais.....	141
8.8. 3.4 - Estimativa do número mais provável de esporos de <i>Clostridia</i> sulfito-redutores	141
8.8.3.5 - Estimativa do número mais provável de bactérias coliformes	142
8.8.3.6 - Estimativa do número mais provável de células viáveis de <i>Escherichia coli</i> . ¹⁴²	142
8.8.4 - Análise sensorial.....	142
8.8.4.1 - Preparação da amostra.....	142
8.8.4.2 - Painel de provadores	143
8.8.4.3 - Avaliação sensorial	143

III - Resultados e discussão	145
9 - Duração e condições ambientais das etapas de fabrico.....	147
9.1 - Duração das etapas de fabrico	147
9.2 - Avaliação das condições ambientais.....	149
9.2.1 - Cais de recepção das carcaças	149
9.2.2 - Câmara de recepção de carcaças	150
9.2.3 - Sala de Desmancha	152
9.2.4 - Câmara de maturação de massas.....	153
9.2.5 - Sala de enchimento	156
9.2.6 - Condições ambientais em que decorreu o processo de cura	156
9.2.6.1 - Câmara de cura forçada (fábrica A)	157
9.2.6.2 - Sala de cura natural (fábrica A).....	158
9.2.6.3 - Fumeiro (fábrica B)	160
9.2.6.4 - Câmara de secagem (fábrica B)	161
9.3 - Avaliação das perdas de peso ao longo do processo de cura	163
10 - Caracterização das matérias-primas subsidiárias	165
10.1 - Condimentos	165
10.2 - Tripas	171
10.3 - Sal.....	175
10.4 - Água	177
11 – Caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico.	179
11.1 – Análises físico-químicas.....	179
11.2 - Perfil de ácidos gordos.....	186
11.3 - Análises microbiológicas	191
12 - Conservação do paio de porco Alentejano.....	201
12.1 – Análises físico-químicas.....	201
12.2 - Perfil de ácidos gordos.....	210
12.3 - Análise do perfil de textura e força e trabalho de corte.....	222
12.4 - Análises microbiológicas	232
12.5 - Análise Sensorial	244

13 - Selecção de estirpes da família <i>micrococcaceae</i> e do género <i>lactobacillus</i> para utilização como culturas de arranque	255
13.1 - Provas de identificação prévia.....	255
13.2 - Provas selectivas	259
13.3 - Provas complementares.....	265
13.3.1 - Identificação taxonómica final das estirpes com potencial para utilização como culturas de arranque	269
13.3.1.1 - Família <i>Micrococcaceae</i>	269
13.3.1.2 - Género <i>Lactobacillus</i>	273
14 - Ensaios de inoculação.....	277
14.1 - Análises físico-químicas.....	277
14.2 - Análise do perfil da textura e força e trabalho de corte.....	284
14.3 - Análises microbiológicas	287
14.4 - Análise sensorial.....	300
15 - Perspectivas futuras	307
iii - Conclusões	309
16 – Conclusões	311
iii - Bibliografia.....	315

Resumo

Na revisão bibliográfica efectuada foram abordados aspectos relacionados com o porco da raça Alentejana e a qualidade dos seus produtos, a tecnologia de produção de enchidos, alterações físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas associadas à cura dos enchidos e foi ainda apresentada informação sobre a utilização de culturas de arranque no fabrico de enchidos.

O trabalho experimental incidiu sobre um produto do porco Alentejano de amplo consumo, o paio, produzido em 2 fábricas (uma, designada por fábrica B, utiliza-se a fumagem na cura dos enchidos e na outra, designada por fábrica A, não) e foi abordado em 6 ensaios:

- 1 - Duração e condições ambientais das etapas de fabrico. Nesta parte do trabalho foi registado o tempo de duração de cada uma das etapas do processo de fabrico do paio de porco Alentejano e foram calculadas as perdas de peso ao longo das fases de fabrico. Foram medidas a temperatura e a humidade relativa do ar nos diferentes locais relacionados com o fabrico do paio de porco Alentejano nas duas fábricas objecto de estudo.
- 2 - Caracterização das matérias-primas subsidiárias. Nesta fase do trabalho experimental foram avaliadas algumas características físico-químicas e microbiológicas das massas de pimentão e alho e das tripas usadas no fabrico do paio de porco Alentejano. Fez-se também o controlo microbiológico do sal e da água utilizados na formulação daquele produto.
- 3 - Caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico. A partir de amostras recolhidas em 4 fases do processo de fabrico (1-massa não condimentada, 2-pré-enchimento, 3-fase intermédia da cura e 4-produto final) realizaram-se análises físico-químicas e microbiológicas e determinou-se o perfil de ácidos gordos.
- 4 - Conservação do paio de porco Alentejano. Para realizar esta parte do trabalho, produtos finais, inteiros, dos enchidos estudados no âmbito do ponto anterior (caracterização do paio de porco Alentejano) foram embalados sob vácuo e sob um tipo de atmosfera modificada (20% de CO₂; 80% de N₂) e mantiveram-se à temperatura ambiente. Foram analisadas amostras aos 0, 3, 6 e 9 meses de conservação. Em cada um destes tempos de conservação fizeram-se análises físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais e determinou-se, também, o perfil de ácidos gordos.
- 5 - Selecção de estirpes da família *Micrococcaceae* e do género *Lactobacillus* para utilização como culturas de arranque. Estirpes daqueles 2 grupos bacterianos que haviam sido isoladas, principalmente, no decurso do estudo da caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico, foram sujeitas a provas de selecção. Escolheram-se e identificaram-se as mais adaptadas às condições de fabrico dos enchidos estudados, perspectivando a sua utilização como culturas de arranque no fabrico de enchidos.

6 - Ensaio de inoculação. Nesta última fase do trabalho foram inoculadas 2 das estirpes seleccionadas (uma de *Lactobacillus sakei* e outra de *Staphylococcus xylosus*) em massas de carne destinadas ao fabrico de paio de porco Alentejano. Realizaram-se 2 ensaios em cada uma das duas fábricas objecto de estudo e foi avaliado o efeito da introdução daquelas culturas sobre parâmetros físicos-químicos, reológicos, microbiológicos e sensoriais.

Os resultados obtidos indicaram haver variações entre lotes de fabrico tanto para a duração das etapas de cura como para os parâmetros ambientais (temperatura e humidade relativa do ar) usados nos diferentes lotes de paio estudados.

Quanto ao estudo das matérias-primas subsidiárias verificou-se que, de um modo geral, foram mais estáveis e de melhor qualidade as utilizadas na fábrica que recorre à fumagem dos enchidos (fábrica B), momente no que respeita à massa de alho, à tripa e ao sal.

No que concerne ao estudo do processo de fabrico, houve diferenças significativas para a maioria das variáveis físico-químicas, tanto quando considerado o factor fábrica, como para o factor fase de fabrico. Os paios produzidos na fábrica B foram mais salgados, em cerca de 1%, que os da outra fábrica (fábrica A: 5,02% NaCl; fábrica B: 5,97% NaCl). Os valores de a_w do produto final foram semelhantes nas duas fábricas (fábrica A: 0,821; fábrica B: 0,818). Contudo, a a_w desceu mais rapidamente nos paios produzidos na fábrica B, consequência das condições ambientais da cura, apresentando já na fase 3 (meio da cura) valores de a_w (0,895) que garantiam a estabilidade do produto. Também como resultado das condições ambientais, a meio da cura os valores de ABVT (azoto básico volátil total) nos produtos da fábrica B (94,57 mg NH₃/ 100 g) foram significativamente superiores aos da fábrica A (64,53 mg NH₃/ 100 g). Quanto ao perfil dos ácidos gordos, verificaram-se diferenças significativas entre as fases de fabrico para os ácidos: mirístico ($p<0,05$), palmítico ($p<0,01$), oleico ($p<0,01$) e heneicosenoíco ($p<0,001$). De entre os ácidos gordos que apresentaram diferenças significativas entre fábricas, quando considerada a mesma fase de fabrico, os ácidos láurico, linoleico, linolénico e gadoleico foram superiores na fábrica A e o ácido palmitoleico foi superior na fábrica B. Os teores do ácido oleico evidenciaram uma tendência para decrescerem ao longo da cura. A maioria das determinações microbiológicas realizadas foram diferentes entre fábricas e ao longo do processo de fabrico, com valores, de um modo geral, superiores para os produtos da fábrica A. Os microrganismos com interesse tecnológico (*Lactobacillus* spp., bactérias ácido lácticas e *Micrococcaceae*) multiplicaram-se, de um modo geral, desde o início até ao fim do processo de fabrico. O decréscimo dos valores de *Enterobacteriaceae*, bactérias coliformes e *E. coli* ao longo das fases do processo de fabrico evidencia a eficiência destes processos na redução daqueles grupos de microrganismos para valores compatíveis com a utilização destes enchidos na alimentação humana.

O modo de conservação do paio de porco Alentejano (vácuo ou atmosfera modificada) não interferiu de forma significativa nas várias características estudadas. Os resultados da análise sensorial revelaram que todos os enchidos poderiam ser conservados mantendo os padrões de qualidade até aos 6 meses. De um modo geral conservaram-se melhor os produtos da fábrica B.

Os resultados das provas de selecção de microrganismos com vista à sua utilização como culturas de arranque proporcionaram formar uma colecção constituída por 6 estirpes de *Micrococcaceae* (5 de *Staphylococcus xylosus* e 1 de *Staphylococcus simulans*) e 10 estirpes do género *Lactobacillus* (5 da espécie *Lactobacillus sakei*, 2 de *L. curvatus*, 2 de *L. plantarum* e 1 de *L. alimentarius*).

Quanto aos ensaios de inoculação, a estirpe de *Staphylococcus xylosus* testada foi responsável pelos decréscimos mais significativos nos valores de a_w . A estirpe de *Lactobacillus sakei* que inoculámos teve um papel fundamental na redução dos efeitos negativos sobre as propriedades sensoriais dos enchidos que resultaram de um mau funcionamento do processo de fabrico. Esta estirpe, sobretudo em cultura pura, promoveu reduções significativas nos valores do pH e foi responsável por decréscimos nas contagens de *Enterobacteriaceae* e de *Streptococci* do grupo D. A cultura mista de *L. sakei* e *S. xylosus* foi responsável pela boa ligação entre as massas de carne, traduzida pelos valores mais elevados do parâmetro reológico coesividade, nos lotes inoculados com aquela cultura mista.

Abstract

The influence of the processing technology on the quality characteristics of raw fermented meat products, in particular those obtained from the Alentejano pig breed, is discussed in the present study. A great emphasis is put on the physic-chemical, biochemical and microbiological changes introduced by technical aspects of the ageing (ripening) process and by the addition of starter cultures. For this purpose, the systems used in "Paio" sausage production, applied in two different meat processing plants (A and B) were compared, in accordance with the next work package:

- 1 - Monitorization of environmental conditions and duration of the different processing phases and registration of weigh losses occurred.
- 2 - Physic-chemical and microbial characterization of subsidiary raw materials, including garlic and sweet paprika pastes, sodium chloride and natural casings.
- 3 - Physic-chemical and microbial characterization of "Paio" sausages along the different processing steps. The fatty acid profile was also analysed in raw materials (fat and meat) before spicing (phase 1), in spiced raw materials during the storage period under refrigeration for seasonings taste uptake (phase 2), "Paio" sausage obtained after an intermediate ripening period (phase 3) and the final product (phase 4).
- 4 - Evaluation of the influence of atmosphere (vacuum and 20% CO₂ + 80% N₂ modified atmosphere) and duration (0, 3, 6 and 9 months) of storage at environmental temperature, on the physic-chemical, microbiological, rheological and sensorial properties of "Paio" sausage final product.
- 5 - Selection of starter cultures based on *Micrococcaceae* and *Lactobacillus* genera. The strains were previously isolated, identified and selected according to physiological characteristics thought as appropriated to the processing conditions applied to this type of product.
- 6 - Inoculation essays with 2 different starters (*Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus*), repeated twice in each meat processing plant. The physico-chemical, microbiological, rheological and sensorial properties of the final products were analysed.

A great variability on the duration and environmental temperature and relative humidity observed during the ripening phase of the meat plants was registered.

Subsidiary raw materials used at plant B presented a better and uniform quality, in particular for the garlic paste, the salt and casings.

The meat factory and the processing phase influenced significantly the physico-chemical parameters of "Paio" sausage. The product processed at factory B presented a NaCl content 1% higher than that measured at factory A, taking into account identical ripening periods. Such difference could be the reflex of the faster decrease on a_w values obtained in production B, due to the environmental conditions applied there. ABVT mean values obtained in samples from phase 3 were significantly higher at factory B (94,57 mg NH₃/100 g). The processing phase is also an important source of variation in the fatty acid

profile of “Paio” sausage with the oleic acid denoting lower percentages with the ripening duration.

Most microbiological parameters of “Paio” sausage produced in factory A showed significantly higher mean values. Regardless the considered processing methods, *Lactobacilli*, Lactic acid bacteria (LAB) and *Micrococcaceae* increased their populations all over the processing time. The decrease of *Enterobacteriaceae*, Coliforms bacteria and *E. coli* numbers clearly shows that the processing methods constituted an efficient technology allowing the safe consumption of the products.

The tested storage methods did not influence the quality parameters. Sensorial evaluation along the storage period confirmed that “Paio” sausages maintained their standards of quality up to 6 months of storage. Products from plant B exhibited higher quality evaluation scores than those from plant A.

The selection of micro-organisms for starters production allowed the collection of 6 *Micrococcaceae* (5 *Staphylococcus xylosus* and 1 *Staphylococcus simulans*) and 10 *lactobacilli* (5 *Lactobacillus sakei*; 2 *L. curvatus*; 2 *L. plantarum* and 1 *L. alimentarius*) strains. The inoculation of *Staphylococcus xylosus* gave rise to products with lower a_w values. The use of *Lactobacillus sakei* minimized the appearance of abnormal quality characteristics due to inappropriate processing development. This strain, mainly when used as pure culture, reduced pH values and the number of *Enterobacteriacea* and *Streptococci* of group D. The mixed starter culture made of *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus* promoted a better meat/fat binding capacity, confirmed by the higher cohesiveness values.

Agradecimentos

O trabalho que apresento é o resultado do esforço e da dedicação, muitas vezes abnegada, de um vasto conjunto de pessoas a quem eu agradeço reconhecido.

Ao Senhor Professor António Mário Rodrigues Ribeiro, pela orientação deste trabalho, pelos vastos conhecimentos que me tem transmitido e pela amizade com que me tem distinguido.

Ao meu Amigo Doutor Alfonso Vicente Carrascosa Santiago, co-Orientador desta tese, pela sugestão do tema, pelas sugestões feitas tanto para a execução da parte prática como para a redacção da tese e pela invulgar disponibilidade que sempre manifestou para me ajudar a realizar esta tarefa.

Às empresas Salsicharia Estremocense Lda., na pessoa do Senhor Francisco Arvana, e Barrancarnes Lda., na pessoa do Senhor António Carvalho Fialho, por me haverem franqueado as suas portas.

Aos Engenheiros Cláudia Silvano, Patrícia Pacheco, Ana Chouriço, Helena Barbosa, Ana Ferreira, Teresa Pisco, Anabela Almeida, Luís Soares, Bárbara Raposo, Carla Baixinho e Vera Palma, pelo precioso auxílio na recolha de dados.

Às pessoas que constituíram o painel de provadores dos enchidos: Eng.^º Colaço do Rosário, Eng.^º Técnico Agrário João Torres, Prof.^a Cristina Agulheiro, Prof. Carlos Roquete, Prof. Alfredo Pereira, Prof. Gabriel Barata, Prof. Gottlieb Bash, Eng.^º Fernando Marques, Eng.^a João Cabrita, Eng.^º Paulo Laureano, Eng.^º Fernando Rei e Eng.^º Lopes de Castro.

Ao Professor Doutor Nuno Maria de Vilas Boas Potes, pelo seu constante incentivo e pelo muito que tenho aprendido com os seus conhecimentos.

Às Professoras Ana Maria Ludovice, Eduarda Potes e João Cabrita, por me terem aliviado a carga horária, como docente, em momentos decisivos para a prossecução deste trabalho.

À Prof.^a Maria José Monteiro, pelas sugestões feitas para a análise estatística dos dados.

À Dr.^a Jaqueline Ouakinin, ao Prof. Alfredo Pereira e ao Dr. Armando Marques, pela leitura deste texto. Novamente ao Dr. Armando Marques pela ajuda determinante nos arranjos gráficos finais.

Aos meus Amigos, fundamentais para a manutenção do meu equilíbrio emocional.

À Ana Cristina, pela importante ajuda na redacção da bibliografia, pelos arranjos feitos no texto, nos quadros e nas figuras e por ter aturado de cara alegre o meu mau feitio, só possível a quem ama mais que muito.

Ao Zé e ao Manel, meus filhos mais que queridos, por gostarem tanto de mim e permitirem que eu goste tanto deles, tónicos essenciais para a superação das dificuldades que foram surgindo ao longo do trabalho.

A muitas outras pessoas que também contribuíram para a realização desta tese, que eu não enumero para não cometer a imprudência de esquecer alguma.

Introdução

Desde os tempos mais remotos que o Homem sentiu a necessidade de conservar a carne dos animais que caçava nas estações de abundância para consumo posterior, quando a caça não fosse possível. Esta necessidade de conservar a carne terá estado na origem da salsicharia. Práticas como a secagem ou a fumagem da carne, conhecidas desde o Paleolítico Superior (40 000 a 12 000 anos a.C.), resultaram da necessidade de prolongar a duração da conservação daquele alimento e não de um imperativo do paladar.

Nas regiões do interior de Portugal, até há poucas décadas atrás (talvez não mais de três) não havia electricidade em muitas casas de habitação. Nestas condições, a salga das carnes e do toucinho e o fabrico de enchidos no período do Inverno, aproveitando as baixas temperaturas para maior garantia da salubridade dos produtos, eram práticas fundamentais para garantir uma fonte de proteína e gordura de origem animal durante o resto do ano.

Hoje em dia a realidade é bem diferente. Os enchidos são consumidos, principalmente, não pelo seu valor nutritivo mas por saberem bem. Neste contexto, o consumidor, cada vez mais exigente, procura enchidos com elevada qualidade sensorial. De entre estes enchidos, os fabricados com matérias-primas procedentes do porco da raça Alentejana são uns dos melhores e de maior valor comercial.

A superior qualidade dos enchidos de porco Alentejano deve-se, fundamentalmente, à qualidade da matéria-prima e aos processos de transformação usados. Com efeito, as características genéticas daqueles animais, caracterizadas essencialmente pelo seu carácter adipogénico, com elevados teores de gordura intramuscular rica em ácido oleico, e pela sua resistência ao stresse, aliadas aos sistemas de produção adoptados para aqueles animais (regime extensivo ou semi-extensivo), com ingestão de erva e bolota, fazem com que a carne e a gordura do porco Alentejano seja particular. Por outro lado, os processos de fabrico daqueles enchidos, lentos e a temperaturas relativamente baixas, contribuem para a elevada qualidade dos enchidos.

O reconhecimento, por parte das entidades nacionais e comunitárias, da especificidade destes produtos traduz-se na protecção jurídica de que alguns deles beneficiam, designadamente através de Denominações de Origem Protegidas (DOP) e Indicações Geográficas Protegidas (IGP). Estas medidas de protecção, entre outras vantagens, têm o mérito de fomentar o respeito por uma tradição de fabrico que se reconheceu como particular e que se pretende continuada através dos tempos. Relativamente aos produtos do porco Alentejano, beneficiam de Denominação de Origem Protegida o "Presunto de Barrancos" e a carne de "Porco Alentejano". São considerados produtos com Indicação Geográfica Protegida alguns enchidos da região de Portalegre e outros da região de Estremoz e Borba. Beneficiam ainda da mesma protecção o "Torresmo de Estremoz e Borba", o "Toucinho de Estremoz e Borba" e a "Banha de Estremoz e Borba".

A elevada qualidade sensorial dos enchidos de porco Alentejano, juntamente com o aumento do grau de conhecimento e de exigência do consumidor fizeram aumentar a procura daqueles enchidos. Como consequência, cresceu também o número de fábricas que produzem aqueles enchidos. A primeira surgiu em Barrancos e começou a laborar em Dezembro de 1994, actualmente existem no Alentejo cerca de 50 unidades a produzir enchidos de porco Alentejano, embora muito poucas fabriquem exclusivamente salsicharia.

do porco Alentejano. No momento, há novas fábricas em construção e outras na fase de projecto.

Com a expansão que esta actividade está a ter, muito importante como motor de desenvolvimento para uma região carenciada de recursos como é o Alentejo, é imperioso conhecer tão pormenorizadamente quanto possível os fenómenos inerentes ao fabrico daqueles enchidos, por forma a intervir de modo consciente e eficaz sempre que necessário. Por outro lado, o fabrico de enchidos tradicionais ainda é caracterizado por processos que utilizam muita mão-de-obra e que são condicionados, em parte, pelas condições ambientais exteriores. Esta realidade conduz à produção de enchidos com características não regulares ao longo do tempo. Assim sendo, importa encontrar mecanismos que contribuam para a reprodutibilidade das características dos enchidos ao longo do tempo, por forma a melhor fomentar hábitos de consumo e a tornar mais eficazes os mecanismos que garantem a manutenção da qualidade destes produtos.

Como resposta aos objectivos traçados neste último parágrafo a utilização de culturas de arranque com base na microbiota autóctone pode vir a desempenhar um papel importante. Com efeito, a aplicação destas culturas no fabrico de enchidos, entre outros aspectos, pode melhorar as suas características sensoriais, contribuir para a sua bio preservação e salubridade, prolongar o tempo de conservação e pode também contribuir ainda para uma maior uniformização dos produtos.

O presente trabalho usou como objecto de estudo um enchido tradicional de porco Alentejano com expressão no mercado, o paio de porco Alentejano, produzido com e sem recurso à fumagem, e propusemos como principais objectivos a atingir: ⁱ⁾conhecer aspectos relacionados com a produção do paio de porco Alentejano. Para alcançarmos este objectivo foram estudadas a duração e as condições ambientais (temperatura e humidade relativa do ar) das etapas de fabrico, algumas características físico-químicas e microbiológicas das matérias-primas subsidiárias utilizadas e foram estudadas também características físico-químicas e microbiológicas, assim como o perfil de ácidos gordos ao longo do fabrico do paio de porco Alentejano. ⁱⁱ⁾Conhecer a evolução das características do paio curado de porco Alentejano quando conservado durante 9 meses sob vácuo e sob um tipo de atmosfera modificada (20% de CO₂; 80% de N₂), à temperatura ambiente. Para tanto foram realizadas análises físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais; determinou-se também o perfil de ácidos gordos. ⁱⁱⁱ⁾Seleccionar estírpes da família *Micrococcaceae* e do género *Lactobacillus* para utilização como culturas de arranque no fabrico de enchidos. ^{iv)}Verificar a acção de duas estírpes de microrganismos (uma da família *Micrococcaceae* e outra do género *Lactobacillus*), em cultura pura e em cultura mista, sobre características físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais do paio de porco Alentejano. ^{v)}Encontrar uma metodologia de trabalho que sirva para um melhor conhecimento dos fenómenos relacionados com o fabrico de enchidos tradicionais de elevada qualidade.

I - Revisão bibliográfica

1 - O porco da raça Alentejana e o seu sistema de produção

A origem do porco doméstico é atribuída a três espécies selvagens: *Sus scrofa ferus*, *Sus striatus vitatus*, e *Sus mediterraneus*, estando na origem destes o Corifodonte do Eoceno inferior, era cenozóica (Frazão, 1965).

É clássico considerarem-se três troncos principais de suínos: o Céltico, com origem no *Sus scrofa ferus*, representante dos porcos do Norte da Europa, Norte de Portugal e Norte de Espanha; o Ibérico, da bacia mediterrânea, também designado por Românico e originário da espécie selvagem *Sus mediterraneus*; o tronco Asiático ou Chino a que pertencem as actuais raças domésticas asiáticas, e que terá evoluído do *Sus striatus vitatus*, (Nunes, 1993).

De acordo com Nunes (1992), os hábitos alimentares e os recursos disponíveis na península Ibérica fizeram desenvolver dois troncos: o Céltico, nas zonas setentrionais, que deu origem à raça Bísara que povoou o Norte do país, e o Ibérico, nas zonas meridionais. Este tronco deu origem à raça Alentejana e às raças espanholas: “Negra lampiña”, ou “Pelon guadianés”; “Negra entrepelada”; “Rubia andaluza”, ou “Rubia campiñesa”; e “Manchada de Jabugo”, ou “Andaluza manchada” (Montilla, 1953). Dentro da raça Alentejana eram distinguidas três variedades, de acordo com a cor da pelagem: a “Escura”, também chamada “Caldeira”, com pelagem preta; a “Ruiva clara”, também designada por “Ervideira”, e a “Loira” que já em 1965 Frazão dizia estar a desaparecer. Vicissitudes várias levaram a um intenso mestiçamento entre todas as raças do tronco Ibérico, tanto entre as raças espanholas como entre raças dos dois países. Esta realidade levou a que os zootecnistas espanhóis considerassem uma raça única: o porco Ibérico (Nunes, 1992). Na actualidade, e talvez por uma questão de brio patriótico, os animais originários de Espanha são designados por Ibéricos e os produzidos em explorações portuguesas designam-se por porcos da raça Alentejana.

Na primeira metade do século passado a dispersão dos suínos da raça Alentejana atingiu praticamente todo o território Nacional, embora a sua dominância se encontrasse no Alentejo, principalmente, Beira Baixa, Estremadura e Algarve, nas áreas onde existiam as manchas mais importantes dos montados de azinho e de sobreiro.

Vários autores consideraram a raça Alentejana como a melhor raça porcina nacional (Miranda do Vale, 1949; Bernardo Lima, 1965) havendo mesmo quem a tivesse considerado “a melhor raça pecuária nacional” (Costa Júnior, 1947). As preferências por esta raça deviam-se à sua grande rusticidade, à elevada aptidão cevatriz (para formar depósitos adiposos, importantes não só como alimento directo, caso do toucinho, mas também como fonte de gordura utilizada na preparação de pratos fritos) e à sua extraordinária adaptação ao sistema de exploração extensivo e às condições climáticas das regiões onde habitualmente era produzido. Como consequência das características apresentadas, esta raça apresentava uma baixa taxa de prolificidade, entre 5 e 8 leitões por ninhada (Frazão, 1965; Aparicio-Macarro, 1987; Nunes, 1993).

Andrade (1938) refere que a primeira estimativa do efectivo suíno no Alentejo foi feita por Carlos Bonnet, em 1849, e indicava a existência de 236 118 animais. Ainda segundo aquele autor, os registos de 1852 referem a existência de 206 667 suínos. O Recenseamento Geral dos Gados no Reino de Portugal de 1870 apurou a existência de 207 234 suínos, no Alentejo, repartidos do seguinte modo: 56 926 no distrito de Portalegre, 72 246 no distrito de Évora e 78 062 no distrito de Beja. Contudo, na opinião de Miranda do

Vale (1949) admitiu-se que 25% do efectivo não tenha sido recenseado, pelo que deveriam existir 257 041 suínos no Alentejo.

Na opinião de Carvalho (1964), nos anos cinquenta, esta raça representava 45% do efectivo suíno nacional. Em 1957 estavam registadas 40 000 porcas da raça Alentejana nos distritos de Évora, Beja e Portalegre. Em 1989, na área de intervenção da Direcção Regional de Agricultura do Alentejo existiam 3 428 fêmeas reprodutoras e 382 machos reprodutores. O censo oficial de Abril de 1992 registou 4 944 fêmeas reprodutoras e 437 machos reprodutores. De acordo com Freitas (1998), no final de 1997 existiam 118 criadores de porcos Alentejanos que possuíam 5 600 porcas reprodutoras em 126 explorações. De acordo com Coelho (2003), em Junho de 2003 existiam 7 933 fêmeas reprodutoras e 800 machos reprodutores, espalhados por 262 explorações.

O drástico decréscimo verificado no efectivo suíno Alentejano a partir dos finais dos anos 50, que colocou a raça em risco de extinção, foi consequência de vários factores. Por um lado, os surtos de peste suína Africana que assolararam o nosso país, o primeiro em 1957, sem efeito aparente no Alentejo, e o segundo em 1960. Por outro lado, as fortes campanhas orquestradas pelos Estados Unidos da América e pelos países do Norte e Centro da Europa, que penalizavam fortemente as gorduras do porco Alentejano e enalteciam as virtudes das gorduras poli-insaturadas de origem vegetal, tão intensamente produzidas naqueles países. A este propósito refira-se que a grande produção no nosso país de óleo de baleia, nos anos 40 e 50, com origem nos Açores, também contribuiu para o decrescente interesse na gordura do porco Alentejano. Por outro lado, os sistemáticos e desordenados cruzamentos a que esta raça foi sujeita, também eles como consequência da alteração dos hábitos alimentares, exigindo mais carne e menos gordura, preocupações dietéticas relacionadas com as cardiopatias, contribuíram para o tão significativo decréscimo do efectivo suíno Alentejano.

Actualmente a raça Alentejana é alvo de um interesse cada vez maior, tanto por parte dos agentes relacionados com a produção de animais como daqueles que se dedicam à transformação e comercialização dos produtos do porco Alentejano e que justificam o interesse dos primeiros. O interesse referido deve-se essencialmente ao elevado grau de rusticidade destes animais e à qualidade da sua carne, devida principalmente à composição e quantidade da gordura. Estes produtos, comercializados quer sob a forma de carne fresca, quer sob a forma de produtos transformados de charcutaria, atingem elevados preços de mercado, devido essencialmente às suas características sensoriais superiores. Contudo, convém referir também o adequado valor nutritivo destes produtos.

1.1 - Os sistemas de produção do porco Alentejano

O porco da raça Alentejana esteve sempre associado à exploração em regime extensivo, integrado no complexo agro-silvo-pastoril e valorizando recursos naturais como as ervas dos poussios, os restolhos dos cereais e, principalmente, os frutos e as ervas dos montados de sobre e de azinho.

Tradicionalmente, os porcos de um produtor estavam divididos em três varas: as porcas reprodutoras, os animais em fase de recria e os porcos de engorda (Pereira, 1995, citado por Freitas, 1998).

Os partos eram concentrados em duas épocas; na Primavera, entre Março e Maio, chamada *erviça* ou *ervana*, porque a alimentação da descendência era baseada na erva, e no Outono, entre Setembro e Novembro, chamada *outoniça* ou *montanheira*, porque a descendência fazia o aproveitamento do montado. Em algumas explorações os partos eram concentrados em Janeiro e em Julho, denominando-se as épocas de parição, respectivamente, por *janeirinha* e *veraniça* ou *espiguenha* (Vacas, 1944; Frazão, 1965). Hoje em dia, grande parte da produção está concentrada no Alto Alentejo, onde são frequentes as parições em Janeiro, com desmames em Março, e parições em Junho, com desmames em Agosto. Os animais nascidos em Janeiro são acabados na montanheira do ano seguinte e os nascidos em Junho são acabados com os nascidos em Janeiro do ano seguinte. É prática corrente o cruzamento com raças precoces para as parições de Junho destinando-se os produtos ao mercado do leitão assado (Nunes, 1993).

O manejo alimentar destes animais quase sempre foi condicionado pelos recursos disponíveis. A produção do porco da raça Alentejana é fortemente baseada no aproveitamento dos subprodutos da exploração agrícola e no aproveitamento dos recursos naturais, cuja disponibilidade quantitativa e qualitativa condicionam o crescimento dos animais. Este crescimento, lento durante os períodos de maior carência alimentar, é compensado durante a montanheira (período de alimentação no montado coincidente com a época de produção de bolota ou lande). A engorda na montanheira é considerada um factor determinante para as características da carne e dos transformados do porco Alentejano, constituindo na actualidade um factor de qualidade acrescida para estes produtos.

De acordo com Póvoas-Janeiro (1951a) o principal recurso alimentar das porcas era a pastagem. As mães passavam a noite com as crias, pela manhã saiam para o campo, regressavam ao meio dia para amamentarem durante uma hora, pelo menos, e regressavam ao campo até ao anoitecer. Somente nos períodos de maiores necessidades alimentares, em que a pastagem disponível era insuficiente, se recorria à suplementação com cereais (cevada, aveia ou milho), leguminosas (gramicha, fava ou grão preto), restos da apanha da azeitona, bagaço de azeitona, restolhos ou farelos, dependendo dos recursos disponíveis nas explorações (Póvoas-Janeiro, 1951a; Frazão, 1965; Bettencourt, 1984). De acordo com Picão (1944), era frequente a utilização dos montados pelas porcas uma vez terminada a engorda dos porcos.

O ciclo de produção do porco Alentejano de Montanheira é habitualmente dividido em três fases: a cria (compreendida entre o nascimento e o desmame, normalmente feito às oito semanas), a recria (período entre os dois meses de vida e o início da engorda) e a fase de engorda, em montanheira. Os recursos alimentares do montado são, basicamente, a bolota, a lande e a vegetação herbácea. Contudo, a voracidade do porco e a sua condição de omnívoro permitem-lhe completar a ingestão de bolota, lande e erva com diversos alimentos, como raízes tenras, tubérculos, cogumelos e vermes que desenterra nos terrenos mais húmidos (Miranda do Vale, 1949; Oliveira, 1959), ou mesmo insectos, pequenos roedores, pequenos répteis, larvas, restos de esqueletos ou detritos de cadáveres de outras espécies e ovos de aves que nidificam no solo (Aparício- Macarro, 1987). No sistema silvo-pastoril a bolota e a lande constituem uma fonte energética fundamental na fase de acabamento do porco Alentejano. A fonte proteica é maioritariamente disponibilizada pelas leguminosas, fundamentalmente, e gramíneas do sob-coberto arbóreo e arbustivo (Freitas, 1998).

Neste modelo de exploração os leitões ingeriam exclusivamente leite materno até aos 20-25 dias de idade (Frazão, 1965). A partir dessa altura era comum o fornecimento de cevada em grão, em quantidade crescente, até ao limite de, em média, 400 g por leitão (Frazão, 1965). Contudo, segundo Póvoas-Janeiro (1951b), os animais nascidos na Primavera eram suplementados com grão de cevada ou centeio, enquanto que aos

nascidos no Outono era distribuída bolota pisada, entre a 4^a e a 5^a semanas de idade, e bolota inteira a partir dessa idade. Com um mês ou mês e meio de idade os leitões começavam a fazer o aproveitamento das pastagens. O desmame ocorria aos dois meses de idade; aos três meses, ou um pouco mais tarde, procedia-se à castração dos animais, com excepção dos destinados à reprodução (Vacas, 1944; Frazão, 1965). A partir desta altura os animais nascidos na Primavera eram alimentados, basicamente, com alguma erva, se ainda a houvesse, e com os restolhos dos cereais, onde aproveitavam algum grão. Os nascidos no Outono alimentavam-se da erva natural e dos restos de bolota deixados pelos porcos engordados no montado (Frazão, 1965). Nas épocas de penúria de pastagem recorria-se à cevada, ao milho, ao bagaço de azeitona, à fava, às limpaduras, conforme as disponibilidades de cada exploração (Vacas, 1944; Pereira, 1945; Frazão, 1965; Bettencourt, 1984).

Segundo Nunes (1993), entre Novembro e Fevereiro utilizavam a montanheira, termo que designa a engorda nos montados. Entre Março e Maio faziam o aproveitamento da vegetação herbácea primaveril, pequenos roedores, ovos de aves que nidificam no solo e cogumelos. Nos meses de Junho a Agosto aproveitavam as espigas não aproveitadas das faias agrícolas. O período de maior carência era o de Agosto a Outubro, durante o qual os animais eram suplementados com abóboras que se haviam semeado a propósito e algum cereal secundário (Nunes, 1993). Nos nossos dias, a alimentação do porco Alentejano não difere grandemente da referida, embora já se não semeiem abóboras para este fim e se recorram a suplementações mais frequentes com alimentos compostos. Em alguns casos, a produção não comercializável de frutos constitui parte importante de algumas dietas. O ciclo produtivo dos animais da raça Alentejana ainda hoje é caracterizado por regimes de pós-desmame e pré-acabamento nutricionalmente pobres e por um acabamento tardio, fortemente amiláceo, em montanheira, o que origina uma produção marcadamente sazonal (Nunes, 1993).

Neste sistema de produção tradicional, a exploração de reprodutores constituía uma actividade secundária, necessária para fornecer porcos magros para serem engordados nos montados (Freitas, 1998). A complementaridade entre as explorações que produziam reprodutores e as que se dedicavam à engorda de porcos era feita nas várias feiras de gado que ocorriam entre finais de Setembro e inícios de Outubro nas regiões de grandes concentrações de suínos: Évora, Sousel, Castro Verde e Zafra (Picão, 1944; Balabanian, 1980). O encabeçamento suportado por cada montado era avaliado por pessoas experimentadas, tendo por base a estimativa da produção de frutos e de erva e as condições climáticas (Frazão, 1965; Balabanian, 1980). Na opinião de Balabanian (1980) os melhores anos de montanheira quase sempre coincidiam com Primaveras chuvosas pelo que quando a precipitação era abundante em Maio os produtores mais avisados criavam mais porcos.

Bernardo Lima (1965) informa que na segunda metade do século XIX os porcos da raça Alentejana eram engordados nos montados entre os 18 meses e os 2 anos de idade e atingiam pesos finais entre 210 e 225 kg de peso vivo, contudo por vezes eram superados os 250 kg de peso vivo (Pratas, 1934; Frazão, 1965). Reportando-nos ao século passado, nos anos 40 os porcos entravam no montado com 2 anos de idade e 45 kg, em média, de peso vivo. No final da montanheira pesavam entre 105 e 120 kg, chegando algumas vezes a atingir os 150 -165 kg. Os porcos de 18 meses de idade entravam no montado com 35 kg de peso vivo e saíam com 70-75 kg. Os porcos de 1 ano iniciavam a montanheira com cerca de 30 kg e quando saíam normalmente pesavam 60 kg (Natividade, 1950).

Na actualidade, as modalidades de exploração conservam as principais características do sistema de produção tradicional, nomeadamente a engorda de porcos na montanheira associada e complementando a exploração de porcas reprodutoras (Freitas, 1998). Não

existe um sistema de produção uniforme. As épocas de cobrição, o manejo alimentar, o peso e a idade de entrada dos animais na montanheira e inclusivamente o peso de abate, apresentam variações entre explorações. A maioria das explorações tem como objectivo principal tanto a venda de leitões desmamados destinados ao mercado do leitão assado como a venda de porcos engordados na montanheira. Contudo, existem algumas explorações dedicadas exclusivamente a uma das actividades acabadas de referir (Freitas, 1998).

O efectivo reprodutor varia entre 5 e 100 fêmeas. Recorre-se a duas épocas de cobrição por ano: uma entre Janeiro e Junho, predominantemente entre Março e Abril, e outra entre Julho e Dezembro, com maior incidência nos meses de Setembro e Outubro. No entanto, Freitas (1998) informa que nas explorações cujo efectivo de porcas reprodutoras está dividido em dois lotes, as cobrições ocorrem entre Fevereiro e Março, entre Maio e Junho, entre Agosto e Setembro e entre Novembro e Dezembro.

Nos actuais sistemas de produção do porco Alentejano o sistema semi-extensivo surge como um ajustamento do sistema extensivo tradicional às novas realidades económicas. Desta forma procura-se encurtar a duração do ciclo de produção através de um crescimento sustentado e contínuo dos animais no período que antecede a montanheira (Nunes, 1993). Seguindo este objectivo, a melhoria da alimentação dos animais constituiu uma das principais alterações introduzidas neste recente sistema de produção. Na realidade, embora continuando a utilizar os recursos alimentares da exploração, designadamente pastagens, cereais, restolhos, abóboras, restos de frutos e os recursos da montanheira no manejo alimentar dos reprodutores e dos porcos em crescimento, o recurso a alimentos compostos é prática corrente. As porcas são suplementadas nas fases críticas da gestação e da lactação, os leitões ingerem alimentos compostos desde a 3^a semana de idade até aos dois meses (idade do desmame) e os porcos destinados à engorda são suplementados nas épocas de menores disponibilidades de recursos naturais com cereais ou alimentos compostos, para que atinjam os desejáveis 60-90 kg de peso vivo no início da montanheira (Freitas, 1998).

1.2 - O montado em Portugal

O montado é um ecosistema agro-silvo-pastoril característico das regiões mediterrânicas. É composto por espécies do género *Quercus*, geralmente a azinheira (*Q. rotundifolia*) e o sobreiro (*Q. suber*), embora existam pequenas áreas onde predomina o carvalho-negral (*Q. pyrenaica*) ou o carvalho-cerquinho (*Q. faginea*). De um modo geral, o montado é uma formação relativamente aberta em que dominam os estratos arbóreo e herbáceo (natural ou induzido), acompanhados por um estrato arbustivo ou sub-arbustivo, dominado e temporário. Os montados resultaram da intervenção sobre os bosques climáticos espontâneos, por acção de aclaramento e destruição do sub-bosque (situação típica do montado de azinho), ou da charneca arbustiva resultante da degradação anterior do bosque. Em outros casos foi fomentado o estrato arbóreo e exerceu-se controlo do sub-bosque para utilização agro-silvo-pastoril, situação típica do montado de sobre (Palma *et al.*, 1986). O montado é um sistema cultural, não natural, originalmente seria um bosque denso que se transformou, por desflorestação sucessiva, num ecossistema frágil, com um equilíbrio entre o bosque e o deserto.

Este ecossistema é a base de sistemas extensivos de produção de várias espécies de interesse zootécnico e constitui, em simultâneo, o habitat de uma variada e abundante fauna migratória e residente, onde se incluem espécies cinegéticas. Toda a fauna e flora que caracterizam o montado vivem num equilíbrio dinâmico, fundamental para a garantia da manutenção do património genético e da biodiversidade das espécies que lhe estão associadas.

É indubitável que este sistema é de grande importância para a economia das regiões onde ele está implantado, regra geral, zonas desfavorecidas e carenciadas de muitos recursos associados ao desenvolvimento. A contribuição do montado para essas economias faz-se através dos seus produtos de origem vegetal, essencialmente madeira e cortiça; da produção animal que se pratica, em que os animais são dotados de elevada rusticidade, produzidos em sistemas extensivos, originando produtos normalmente de elevada qualidade; complementados com a racional exploração da caça e com a valorização da paisagem natural, através do turismo.

Em Portugal, o montado implanta-se nos distritos de Beja, Évora, Portalegre, Setúbal, Santarém, Tomar e Castelo Branco, ocupando uma área de cerca de 1 150 000 ha, correspondendo a sua maior parte à região Alentejo. Nos montados de Portugal 669 000 ha estarão ocupados por sobreiros (*Quercus suber*) e 472 000 ha ocupados por azinheiras (*Quercus rotundifolia*). No norte alentejano existe também o castanheiro (*Castanea sativa*).

O meio natural do montado caracteriza-se por uma altitude média entre 350-450 m, pelo predomínio da semi-aridez dos solos, onde a pluviosidade anual varia, consoante as zonas, entre 450-700 mm, com grandes variações entre anos e distribuição irregular dentro de cada ano. Normalmente o Verão é seco e quente e o Inverno frio e húmido, quando cai a maior parte da pluviosidade.

No montado, os recursos alimentares dependem de vários factores, sendo particularmente importante a densidade de árvores (Freitas, 1998). Com efeito, uma baixa densidade origina uma reduzida produção de frutos, enquanto que um excesso de árvores compromete o desenvolvimento herbáceo. No entanto, a densidade do montado varia com a região geográfica, com o clima, com os solos e com os sistemas de exploração desses solos. Na opinião de Dobao *et al.* (1988) e de Diéguez (1992), nos montados de azinho com aproveitamento pastoril a densidade considerada óptima varia entre 40 e 70 árvores por hectare. Balabanian (1980) informa que nos montados de sobreiro são frequentes densidades de 70 a 100 árvores por hectare, sendo estes valores muitas vezes ultrapassados.

2 - Factores de qualidade dos produtos do porco Alentejano

As características peculiares da raça Alentejana conferem às carnes qualidades absolutamente distintas das procedentes de porcos de raças precoces. Esta qualidade é influenciada por vários factores, alguns intrínsecos, como a raça, sexo e idade ao abate, e outros extrínsecos, como a alimentação e o sistema de produção.

De entre as características daqueles animais, assumem particular interesse a sua elevada resistência ao stresse e o seu carácter adipogénico. O primeiro aspecto, para além de ser uma vantagem para a sua exploração, resulta de grande valor como factor de qualidade da sua carne. O segundo, caracterizado por teores elevados de gordura de infiltração, favorece a obtenção de produtos transformados com características organolépticas superiores, mormente suculência, aroma e sabor.

De acordo com De Pedro (1989) e Neves (1998), de entre os factores intrínsecos o genótipo é o que mais influencia a qualidade da matéria-prima. Estas diferenças podem-se verificar na percentagem de proteína, no diâmetro das fibras musculares e na textura; contudo, as maiores variações verificam-se no teor em gordura, o qual é normalmente maior nos animais sujeitos a um processo de selecção menos acentuado, e na composição dessa gordura.

Uma característica importante daquele genótipo é o elevado grau de monoinsaturação do tecido adiposo, como pode ser observado na Quadro 1, que compara a composição em ácidos gordos do tecido adiposo do porco Ibérico e do Large-White, alimentados com ração comercial. Nesta tabela é mostrado o elevado teor que a gordura do porco Ibérico apresenta em ácido oleico (18:1), sendo o teor em ácido palmítico (16:0), o ácido gordo saturado mais representativo, superior no Large-White.

Quadro 1 - Valores médios dos ácidos gordos (%) no tecido adiposo de porcos Ibérico e Large White alimentados com ração comercial.

	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Ibérico	0,11	1,53	23,35	3,53	10,83	51,12	8,62	1,05
LargeWhite	0,16	1,52	26,23	2,45	14,53	44,73	9,830	0,56

Fonte: Fallola *et al.* (1998)

A composição em triacilglicéridos, tal como as suas propriedades, depende do teor em ácidos gordos do tecido adiposo, o qual é condicionado, entre outros factores, pelo genótipo. O Quadro 2 mostra a composição, em percentagem, de triglicéridos da gordura subcutânea do porco Ibérico e do Large-White, alimentados com ração comercial. Este quadro evidencia que existem marcadas diferenças, quantitativas e qualitativas, quanto à composição em triglicéridos da gordura subcutânea daqueles animais. Enquanto o triglicérido com os radicais palmitilo, oleilo, oleilo (POO) representa 45,7% nos animais da raça Ibérica, nos Large-White representa apenas 27,9%. Nesta última raça, em termos percentuais, os triglicéridos estão distribuídos mais uniformemente, não havendo, de forma clara, a predominância de um em relação aos demais, como acontece com o porco Ibérico. Por outro lado, enquanto que na gordura de porco Ibérico em todos os triglicéridos em que

entra o ácido oleico (18:1) este aparece na posição sn-2, na gordura do Large-White ocorrem os triglicéridos palmitilo, palmitilo, oleilo (PPO) e estearyl, estearilo, oleilo (EEO), sendo estas diferenças atribuídas a factores genéticos (Fallola *et al.*, 1998; Gandemer *et al.*, 2000).

Quadro 2 – Composição (%) em triacilglicéridos da gordura subcutânea de porcos Ibéricos e Large White alimentados com ração comercial.

	OOL	POL	OOO	POO	POP	EOO	POE	PPO	EEO
Ibérico	3,8	11,1	7,6	45,7	7,3	5,1	18,9	-	-
LargeWhite	-	13,6	7,8	27,9	-	-	17,3	8,0	5,0

Fonte: Fallola *et al.* (1998)

Ainda a propósito do factor genótipo, Fallola *et al.* (1998) e Rodrigáñez *et al.* (2000) informam que no caso do porco Ibérico, a presença de carcaças PSE é bastante rara, contudo podem ocorrer casos de carcaças DFD. Em alguns casos os animais chegam ao matadouro com muito poucas reservas energéticas devido ao constante exercício durante o pastoreio e às inadequadas condições de transporte.

A idade dos animais ao abate é outro dos factores que influencia sobremaneira a qualidade dos produtos do porco Alentejano. Normalmente, os animais são abatidos com peso compreendido entre os 110 e os 150 kg, o que habitualmente é conseguido entre os 18 e os 24 meses, nos sistemas extensivos, e os 10 -12 meses nos sistemas mais intensivos. De acordo com vários autores (Pearson e Tauber, 1984; Lawrie, 1985; Sabio *et al.*, 1998; Sierra *et al.*, 1998; Andrés *et al.*, 2000), quanto maior for a idade dos animais ao abate mais escuras serão as carnes deles obtidas, devido a um aumento da concentração em mioglobina, maiores serão os teores de gordura de infiltração e consequentemente mais baixos os teores de água. De acordo com Leseigneur-Meynier e Gandemer (1991), as fibras vermelhas são preferencialmente aeróbias e usam os lípidos como substrato energético. Esta é a razão porque as fibras vermelhas têm uma maior quantidade de pigmento muscular e um sistema vascular mais desenvolvido. Assim, a cor da carne dos porcos com maior proporção de gordura de infiltração é mais intensa que a das raças precoces. Devido à elevada proporção de fibras vermelhas, a carne dos animais do tronco Ibérico é mais aromática e de sabor mais intenso, na medida em que os metabolitos da degradação lipídica apresentam uma grande variedade de substâncias químicas, responsáveis por uma maior intensidade de aroma e sabor (León, 1992; Sabio *et al.*, 1998). Farelo (1993) informa que a taxa de insaturação dos ácidos gordos diminui com a idade. Na opinião de Bailey e Robins (1976), o abate de suínos com pesos elevados pode ter efeitos negativos na qualidade da carne, aumentando a sua dureza em consequência do progressivo sobre cruzamento entre as moléculas de tropocolagéneo. Não obstante, Malagón (1988) e Ramos (1990) referem que estes valores evoluem favoravelmente até à idade com que são abatidos os animais do tronco Ibérico.

No que respeita ao sexo, os machos inteiros possuem uma gordura mais insaturada, devido aos níveis superiores de ácido linoleico e inferiores em ácidos esteárico e palmítico que os machos castrados; as fêmeas têm uma composição intermédia, ainda que mais próxima da dos machos inteiros (Smithard *et al.*, 1980; Girard *et al.*, 1983; Enser, 1984;

Barone *et al.*, 2000; Gandemer *et al.*, 2000). Na opinião de León (1992), a castração de machos e fêmeas destinados a engorda é imperativa, afectando a qualidade da carne, contribuindo para uma maior acumulação de gordura nos tecidos dos animais castrados.

Flores e Nieto (1985), Pérez (1986) e Fallola *et al.* (1998) informam que o odor sexual que surge nos machos inteiros e pesados se deve fundamentalmente à androsterona e, possivelmente, ao androsterol, esteróides secretados pelos testículos que se acumulam na gordura. Pérez (1986) e Farelo (1993) referem que este odor pode ser também devido ao escatol (3-metilindol), um produto resultante da degradação do triptofano pela microbiota intestinal.

Considerando os factores extrínsecos, a alimentação é outro factor de extrema importância nas características finais dos produtos obtidos do porco Alentejano. Normalmente, este faz o aproveitamento dos montados, onde ingere quantidades apreciáveis de bolota, fruto da azinheira (*Quercus rotundifolia*) e de lande, fruto do sobreiro (*Quercus suber*). Estes frutos são ricos em ácido oleico, que segundo Martin Peña *et al.* (1992) representa mais de 65% dos ácidos gordos da bolota. A influência da alimentação repercutir-se-á, naturalmente, na composição da gordura, neste caso com benefícios não só do ponto de vista organoléptico como também nutricional.

A dieta determina, em grande medida, as características finais da carcaça, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo (De Pedro, 1989; Fallola *et al.*, 1998; Garcia Rebollo *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2000; Neves *et al.* 2004). Sendo o porco um animal monogástrico, está sujeito a modificações na composição dos seus lípidos tissulares se algumas gorduras são introduzidas na sua dieta, uma vez que os ácidos gordos da dieta são incorporados nos lípidos tissulares sem sofrerem qualquer modificação estrutural importante (Wood, 1984; Gandemer *et al.*, 2000). Neste sentido, é referido que a gordura de porco Alentejano alimentado com erva e bolota apresenta uma textura mais branda e oleosa, tal como uma composição em ácidos gordos particular (Espinosa *et al.*, 1992; Neves, 1998; Elias *et al.*, 2000; Neves *et al.*, 2004).

Trabalhos apresentados por Fallola *et al.* (1998) evidenciam que a bolota é mais rica em gordura e mais pobre em proteína e em hidratos de carbono do que os cereais e alimentos compostos usados no processo de engorda.

No que respeita aos animais alimentados com alimentos compostos, é de salientar as diferentes categorias de produtos encontradas no mercado. Sobre este propósito foi já realizado um grande número de estudos que relacionam a qualidade da gordura dos animais com a dieta. A metodologia mais comumente adoptada nestes estudos tem incidido sobre a descrição da composição em ácidos gordos e em triglicéridos da gordura subcutânea.

A leitura do Quadro 3 mostra que a gordura dos porcos Ibéricos alimentados com bolota é caracterizada por teores mais elevados em ácido oleico (18:1) e menores teores em ácido palmítico (16:0).

Quadro 3 - Composição em ácidos gordos (%), segundo diferentes autores, da gordura de presunto de porco Ibérico alimentado com bolota e com ração comercial (adaptado de Farelo, 1993).

Ácidos Gordos	Bolota			Alimento Composto		
	A	B	C	A	B	C
Láurico (12:0)	0,2	-	-	0,3	-	-
Mirístico (14:0)	1,5	1,6	2,0	1,4	2,1	1,9
Palmítico (16:0)	25,9	21,6	18,4	23,0	27,2	26,5
Palmitoleico (16:1)	5,0	3,1	3,5	5,5	5,0	3,4
Esteárico (18:0)	9,3	9,3	7,7	7,1	9,5	13,8
Oleico (18:1)	45,0	53,7	58,4	52,6	51,1	46,7
Linoleico (18:2)	3,1	8,6	6,4	8,2	5,1	6,1
Linolénico (18:3)	0,1	2,1	-	0,5	-	1,6
Aráquico (20:0)	0,1	2,1	-	0,5	-	1,6
Araquidónico (20:4)	0,9	-	-	1,4	-	-

A - Departamento de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Navarra (Pamplona).

B - Instituto Catalão da Carne.

C - Instituto de Agroquímica e Tecnologica de Alimentos (Valência).

Melgar *et al.* (1993) estudaram presuntos de porcos Ibéricos que haviam sido submetidos a três sistemas de alimentação (bolota, bolota e ração comercial e apenas ração comercial) e concluiram que os presuntos procedentes de animais cuja alimentação incluía bolota apresentavam maiores quantidades de gordura intramuscular, caracterizada por um índice de iodo superior, e portanto um maior grau de insaturação, do que os animais alimentados só com alimento composto.

Por outro lado, o aroma dos produtos cárneos transformados é muito dependente da quantidade e qualidade da gordura, sobretudo pelos ácidos gordos livres, com especial referência para o linoleico (Melgar *et al.*, 1993).

As gorduras de origem vegetal, como a da bolota, fornecem quantidades consideráveis de ácidos gordos insaturados, principais responsáveis pelos fenómenos de oxidação que conduzem à formação de compostos precursores do aroma. Estes ácidos contribuem para uma menor consistência da gordura. Deste modo, os porcos alimentados na montanheira terão uma gordura fortemente insaturada e por conseguinte fluida, o que em determinadas ocasiões dá um aspecto untuoso aos produtos, nomeadamente quando a temperatura ambiente não é baixa.

É conhecido que durante o período de engorda ocorre uma importante deposição de gordura oriunda da dieta nos tecidos lipídicos do animal. Este processo é designado por síntese exógena de lípidos. Neste processo da síntese os triglicéridos da dieta são hidrolisados pelas lipases pancreáticas nas suas ligações éster terminais (sn-1 e sn-3), dando lugar à formação de monoglicéridos esterificados na posição sn-2 e de ácidos gordos livres. Mais tarde, os triglicéridos são regenerados rapidamente (Mataix e Martinez, 1988;

Fallola *et al.*, 1998). Pelo exposto se depreende que a posição sn-2 permanece imutável durante a síntese exógena dos triglicéridos. Contudo, uma dieta rica em bolota, em que a maioria dos triglicéridos é do tipo OOO, contribui para a presença de triglicéridos em que o ácido oleico está na posição sn-2.

O outro processo de formação das reservas lipídicas é a síntese endógena. Neste caso, a maior parte dos compostos imediatamente digeridos, principalmente os glúcidos, é metabolizada em Acetyl-CoA. Este componente funciona como substrato para a síntese de ácidos gordos (Rerat, 1978, 1981; Garcia-Rebollo *et al.*, 1998; Neves, 1998; Wood *et al.*, 2004). O primeiro ácido gordo formado pela via da síntese dos ácidos carboxílicos é o palmítico (C16:0), o qual se transforma parcialmente em ácido esteárico (18:0). Finalmente, o ácido esteárico é transformado em ácido oleico (C18:1) pela acção da enzima acetil-δ-9 dessaturase. A falta de um sistema enzimático próprio nos mamíferos interrompe o processo de formação do ácido linoleico (18:2). Deste modo, no porco todo o ácido linoleico presente na gordura tem origem na síntese exógena.

Assim, dietas ricas em gordura vão favorecer a síntese exógena, enquanto que as dietas ricas em hidratos de carbono estimulam a síntese endógena de lípidos, favorecendo a presença de ácido palmítico na gordura do animal.

O sistema de exploração adoptado para a grande maioria dos porcos Alentejanos, regime extensivo, força o animal ao exercício muscular. Este facto, associado aos movimentos exercidos durante a alimentação com bolota (durante o período de montanheira) impõe uma modificação funcional nas fibras musculares, para formas mais aeróbicas, o que origina, também associado à idade dos animais, uma maior proporção de fibras vermelhas e, consequentemente, uma maior intensidade do aroma e do sabor.

De acordo com Ramos (1990) e Sabio *et al.* (1998), a alimentação na montanheira, por obrigar a que os animais se desloquem durante longos períodos de tempo em busca de alimento, melhora a qualidade do músculo. Nestas condições, o músculo apresenta maior capacidade para acumular glicogénio, o que permitirá obter na carne fresca valores de pH próximos do óptimo (5,5 a 5,8) (Pérez, 1985; Monfort, 1989; Rodriguez, 1990; Fallola *et al.*, 1998). Igualmente devido à maior actividade muscular, os porcos produzidos em sistemas extensivos possuem teores superiores em mioglobina e consequentemente carnes mais escuras, quando comparados com animais da mesma raça produzidos em sistemas intensivos (Lawrie, 1985; Ramos, 1990; Andrés *et al.*, 2000).

2. 1. - Qualidade nutricional dos produtos do porco Alentejano

Para além dos aspectos que se relacionam com as sensações organolépticas proporcionadas pelos produtos do porco Alentejano, há toda uma riqueza nutricional que importa esclarecer.

Actualmente, existe um interesse crescente, tanto do ponto de vista científico como do ponto de vista do consumidor, no conhecimento da composição das gorduras que são ingeridas na dieta, no seu valor nutricional e na sua relação com a saúde.

A composição da gordura do porco Alentejano em ácidos gordos tem um papel importante na qualidade nutricional e na sua acção sobre aspectos ligados à saúde dos seus consumidores. Isto porque este tipo de gordura apresenta um perfil com elevadas proporções de ácidos gordos monoinsaturados e um baixo teor de ácidos gordos saturados,

sendo este perfil muito diferente do apresentado por produtos elaborados a partir de carnes de raças precoces e produzidas em sistemas intensivos.

Na verdade, nas tabelas de composição de alimentos (United States Department of Agriculture, 1983), a gordura de porco surge como desaconselhável em virtude do seu elevado teor em ácidos gordos saturados. No entanto, os animais do tronco Ibérico pelas suas características genéticas e pelo manejo alimentar a que são sujeitos possuem lípidos com uma composição totalmente distinta da dos outros animais da mesma espécie, destacando-se os seus teores elevados em ácido oleico (López-Bote *et al.*, 1990; Martin Peña *et al.*, 1992; Farelo, 1993; Neves, 1998; Neves *et al.*, 2004).

Até há pouco tempo atrás pensava-se que a aterosclerose era uma consequência inevitável do processo de envelhecimento. Hoje, sabe-se que para além dos processos evolutivos actuam uma série de factores de risco, de entre os quais a hipercolesterolemia é o principal e sobre o qual se pode actuar mediante modificações na dieta, nos hábitos de vida e, em certas ocasiões, recorrendo a fármacos (Havel e Rapaport, 1995).

Na aterosclerose é produzida uma acumulação de colesterol na parede arterial. De entre todas as lipoproteínas plasmáticas (proteínas transportadoras de lípidos no plasma), as LDL (lipoproteínas de baixa densidade, encarregues de abastecer de colesterol os distintos tecidos) são as que maioritariamente fornecem colesterol às lesões ateromatosas. O depósito e a interiorização do colesterol dependem de receptores que reconhecem as diferentes apoproteínas que se encontram na superfície das lipoproteínas. Estas apoproteínas têm como missão a regulação metabólica dos lípidos circulantes e estão relacionadas com os receptores dos macrófagos que captam as LDL oxidadas, que apresentam uma densidade ainda menor que as LDL nativas, contribuindo assim de forma mais intensa para a deposição lipídica arterial (García-Rebollo, 1996).

Por outro lado existe a HDL, que é uma lipoproteína de alta densidade que transporta o colesterol em excesso nos diversos tecidos até ao fígado, donde pode ser eliminado através da via biliar.

Actualmente, há concordância acerca da ideia de que o consumo de ácidos gordos saturados aumenta a colesterolémia e por isso aumenta a incidência de doenças cardíacas. Foi também demonstrado que o consumo, na dieta, de ácidos gordos polinsaturados, particularmente os das séries ω-6 e ω-3, reduzem a incidência daquelas doenças (García-Rebollo *et al.*, 1998). O efeito benéfico destes ácidos gordos polinsaturados pode estar relacionado com os compostos resultantes das acções metabólicas em que aqueles ácidos gordos se envolvem, os eicosanóides, que por sua vez têm uma acção importante sobre o tônus vasomotor e sobre a agregação das plaquetas, factores envolvidos no desenvolvimento das lesões ateromatosas.

Contrariando o que vinha sendo hábito, nos anos mais recentes os estudos têm incidido sobre a importância dos ácidos gordos monoinsaturados, demonstrando-se que dietas ricas neste tipo de ácidos gordos são tão eficazes como outras ricas em ácidos gordos polinsaturados e, inclusivamente, não apresentam os seus possíveis efeitos nocivos, como potencial oncogénico e alterações no sistema imunitário, entre outros (García-Rebollo *et al.*, 1998).

O principal representante dos ácidos gordos monoinsaturados é o ácido oleico, abundantemente distribuído na natureza, especialmente no azeite (65%-80%) e na gordura do porco do tronco Ibérico (até 70%, quando criado na montanheira).

Do ponto de vista dietético, o ácido oleico é considerado como antitrombótico, originando uma menor oxidação das LDL e aumentando os valores das HDL, reduzindo, portanto, o risco de enfermidades coronárias (Willet *et al.*, 1995).

García-Rebollo (1996) realizou um estudo em que avaliou a influência do consumo de presunto ibérico, procedente de porcos alimentados com bolota, nos lípidos plasmáticos. Os seus resultados permitiram afirmar que uma dieta onde seja consumida, de forma moderada, carne de porco do tronco Ibérico, particularmente o alimentado com bolota, aumenta as concentrações plasmáticas de ácidos gordos monoinsaturados (oleico) e polinsaturados (araquidónico) e reduz os teores de ácidos gordos saturados. Em consequência, uma dieta deste tipo produz um efeito benéfico sobre os lípidos plasmáticos, caracterizado por um decréscimo do colesterol total, triglicéridos e LDL-colesterol e pela manutenção das concentrações de HDL-colesterol.

Podemos ainda inferir que, devido à sua composição em ácidos gordos, a carne de porco Alentejano, principalmente o alimentado com bolota, e os produtos resultantes da sua transformação, são recomendáveis e podem substituir, como fonte de proteínas, outras carnes vermelhas convencionais, com efeitos benéficos sobre os lípidos plasmáticos.

3 - Dados históricos sobre a produção de enchidos: das origens à actualidade

Desde os tempos mais remotos que a carne faz parte dos hábitos alimentares das populações. Nos primórdios era obtida exclusivamente da caça e era prontamente consumida na medida em que ainda não tinham sido encontradas formas para a conservar. Na verdade, o contraste entre a abundância de carnes em determinadas épocas do ano, sobretudo na Primavera e no Verão, e a escassez noutras épocas, normalmente no Inverno, levou o Homem a empreender formas de conservar este produto. Desta necessidade surgem as práticas de congelação (nas zonas em que havia neve), salga, desidratação e fumagem, actuando algumas destas práticas, usualmente, de forma combinada, para se alcançar uma conservação mais eficaz.

No Paleolítico, a alimentação baseava-se na carne (De Laet, 1997) e o fogo ainda não havia sido descoberto, pelo que o Homem se alimentava de carne crua proveniente das suas caçadas (Póvoas-Janeiro, 1948). Contudo, as práticas de transformação de carnes, apoiadas nas operações de fumagem e desidratação, conhecidas desde o Paleolítico Superior (40 000 a 12 000 anos a. C.), estão na base de uma necessidade de prolongar a duração de conservação dos alimentos e não de um imperativo do paladar (Saramago, 1997).

Em descrições referentes ao Paleolítico Superior, Klima (1997) alude ao facto dos povos deste período viverem principalmente da caça, especialmente de herbívoros de grande porte, sendo exploradas todas as partes do animal. O mesmo autor refere que naquele período a carne era comida depois de cozinhada no fogo, assando-se provavelmente apenas uma parte, sendo algumas porções das entradas consumidas em cru. A carne podia ainda ser seca ou fumada, guardada em cinzas ou gelada, e assim mantida até ser necessária. O mesmo autor refere ainda como uma importante inovação deste período a construção em larga escala de abrigos artificiais e chama a atenção para o achado de pequenas fossas hemisféricas (interiores ou exteriores aos locais de abrigo) cujo conteúdo e forma permitiram deduzir o uso de cozinhar a carne, presumindo-se que funcionariam como braseiros. Noutros casos, a presença de estruturas de osso trabalhado sugeriam o hábito de grelhar a carne.

Em relação à parte sul da Península Ibérica, Saramago (1997) refere terem sido descobertos vários vestígios arqueológicos paleolíticos que testemunham uma alimentação mais centrada na carne, diversificada por várias espécies animais, algumas delas de animais de grande porte. Estações arqueológicas acheulenses – unidade arqueológica do Paleolítico – existentes no sul de Espanha, revelam a existência de locais próprios para a desmancha de mamutes. Contudo, persiste a dúvida sobre se tais sítios coincidiram ou não com o local de abate daqueles animais.

No período entre, aproximadamente, 3000 e 700 anos a.C., abrangendo portanto o Calcolítico e a Idade do Bronze, voltamos a ter indicações acerca dos processos de conservação de alimentos. Möhen (1991) menciona a descoberta, na Dinamarca, de abundantes fósseis de cabeça de peixe, sugerindo que seriam especificamente preparadas para conservação através da secagem ou da fumagem. O mesmo autor, referindo-se a uma técnica posterior de conservação, a salga, decorrente do início de uma nova indústria, a produção de sal, informa que o aparecimento desta técnica mais recente terá surgido com o objectivo de permitir o consumo de alimentos no Inverno ou fazer a sua troca por outros bens, alimentares ou não. Abordando o período da Idade do Bronze Final, Saramago (1997) refere vários povoados no litoral alentejano (Cerradinho, na Lagoa de Santo André;

Quitéria e Pessegueiro, perto de Sines) e outros dois situados no interior do Alentejo (Castelo do Giraldo e Coroa de Frades, ambos perto de Évora) que seriam palco de importantes intercâmbios comerciais. O mesmo autor refere que a caça e a carne de porco eram trocados por peixe e sal.

Na opinião de Póvoas-Janeiro (1948) teriam sido os gregos e os romanos quem fez nascer a indústria de salsicharia. De acordo com este autor cabe aos gregos o mérito de terem sido os primeiros a considerar a qualidade da carne, classificando-a em classes de acordo com a idade, o sexo e a espécie animal. Os romanos foram os primeiros a realizar matanças para abastecimento público e, consequentemente, foram os primeiros a organizar o comércio da carne. Homero, na Odisseia (Séc. IX a.C.) fez a primeira referência histórica aos produtos de salsicharia com a descrição de um enchido que continha sangue. Aristótoles (Séc. III a.C.) numa das suas comédias tem como personagem um salsicheiro que entra em cena com um recipiente cheio de enchidos (Póvoas-Janeiro, 1948).

Em Portugal, a salsicharia parece ter sido introduzida pelos Celtas, depois por Visigodos, Godos, Ostrogodos, Vândalos e outros povos invasores (Anónimo, 1991). Saramago (1997) corrobora esta opinião ao atribuir o aparecimento da indústria salsicheira no nosso país aos povos célticos, provenientes da Europa Central, que se teriam estabelecido a Sul do Tejo cerca do século VI a.C.. Ainda segundo este autor, terão sido estes povos, assim como os da Ibéria, os que primeiramente souberam preparar o porco, tanto no que respeita à preparação de carne fresca como à prática da fumagem.

Nos séculos I e II da era cristã, o Império Romano dominava na Península Ibérica, a região Alentejo não constituiu excepção e esta civilização influenciou a evolução das técnicas de salsicharia. No decurso dos dois séculos seguintes (séculos III e IV) as lutas entre o Império Romano e os Bárbaros (designação dada aos povos invasores) foram agravadas. Nos 300 anos que vão desde o fim do Império Romano até à conquista da Península pelos muçulmanos, os povos Suevo e Visigodo não tentaram erigir nenhum modelo novo de sociedade. Na opinião de Saramago (1997) o nascimento de outras civilizações e a chegada de outros povos depois da queda do Império Romano não terá modificado muito os hábitos alimentares das pessoas. As modificações introduzidas terão sido o aumento da actividade silvo-pastoril, fortalecimento do auto-consumo e considerável diminuição da demografia. Contudo, a carne de porco continuou a ser um alimento importante na dieta destes povos.

O domínio árabe no sul da Península Ibérica ocorreu durante um período de, aproximadamente, 500 anos (711 – 1200/1300 d.C.) e alterou os hábitos alimentares das populações, particularmente pela proibição do consumo de carne de porco, animal considerado impuro por imposição corânica.

A partir do século XIII a carne de porco volta a aparecer como um alimento de primeiro plano, superando a criação de ovinos, espécie dominante na época de ocupação árabe. Estes acontecimentos estão associados a uma nova alteração nos hábitos alimentares dos povos, e as tradições célticas e visigóticas ressurgiram.

Na época posterior à reconquista das terras aos árabes, a produção agrária apontava para dois objectivos principais: pagamento dos compromissos senhoriais (rendas e foros) e assegurar as solicitações alimentares crescentes das novas classes urbanas. De acordo com Saramago (1997) os camponeses foram obrigados a retirar muitos alimentos da sua dieta quotidiana em favor da cidade, levando-os a mercados e feiras para venda. É neste contexto que a dieta das gentes do campo fica reduzida a pão, azeite, vinho, cereais (em maior proporção) e aos produtos provenientes do aproveitamento do porco: carne que se guardará todo o ano, salgada ou sob a forma de enchidos fumados, produtos que complementados com alguma caça permitiram suprimir as necessidades de carne destas

populações rurais. Ainda durante o período da Idade Média, o hábito da cura de carnes de porco no fumeiro ter-se-á instalado também nos hábitos das populações urbanas que passaram a considerar o porco como uma “despensa” para todo o ano. Nestes casos a criação de animais era feita em chiqueiros públicos (adúas). Estes novos costumes conduziram a um tal aumento do número de porcos nos centros urbanos que fizeram com que em determinados locais, por exemplo na cidade de Évora, os porcos fossem objecto de disposições legais (ordenações) que pretendiam limitar o seu número e circulação nas cidades, facto que originou conflitos entre populações e autoridades.

Ainda de acordo com a opinião de Saramago (1997), entre os séculos XV e XVIII os enchidos continuaram a ser a fonte maioritária de proteína animal, ao longo de todo o ano, para as populações rurais. O porco continuou a ser o animal mais comum e, consequentemente, a sua carne a mais consumida.

Durante o período dos descobrimentos, a introdução do pimento no nosso país veio alterar as características dos enchidos feitos até então. Na realidade, a mistura entre carne, alho e massa de pimentão, proporcionou o aumento da variedade de enchidos produzidos e melhorar as suas características aromáticas e sápidas, assim como aumentar o seu período de conservação (Chouriço, 1999).

Até um passado muito recente, ainda com raras aplicações nos nossos dias, os enchidos eram um dos componentes principais da dieta das populações rurais. No Inverno, época de matanças, devido às baixas temperaturas ambientais e ao aproveitamento da montanheira, as carnes de porco eram temperadas, cheias em tripas e fumadas em chaminés ou então eram conservadas na salgadeira (arca de madeira onde a carne era mantida no interior de sal grosso). As carnes conservadas desta forma eram a base da alimentação nas jornadas de trabalho primaveris e estivais (Cabaço, 1995).

A indústria da salsicharia no Alentejo parece ter nascido na Vila de Castelo de Vide, distrito de Portalegre, a partir da qual se terá espalhado por todo o Alto e Baixo Alentejo. A maior parte dos habitantes de Castelo de Vide abatiam porcos no Inverno e produziam enchidos. Uns eram destinados ao auto-consumo e outros eram vendidos a apreciadores que viviam fora da vila. O sucesso conseguido pelos salsicheiros de Castelo de Vide terá encorajado outros na actividade salsicheira primeiramente em outras zonas do distrito de Portalegre e, posteriormente, por todo o Alentejo (Paiva, 1944; Chouriço, 1999).

3.1 - Evolução da actividade salsicheira no sul de Portugal durante o último século

As actividades relacionadas com o abate de animais e a produção de enchidos no início do século passado estão, em certa medida, retratadas num relatório de “fiscalização das carnes do gado suíno em Aldegallega do Ribatejo nos meses de Fevereiro e Março de 1910”, elaborado por Paredes e Horta. Naquela altura, as matanças industriais coincidiam com a realização, no Alentejo, dos mercados de compra e venda de porcos Alentejanos. Estes mercados ocorriam com maior intensidade entre os meses de Dezembro a Março. Além do mais, esta época do ano seria a mais propícia ao fabrico de enchidos na medida em que as baixas temperaturas reduziam os riscos de deterioração dos produtos.

Referia aquele relatório “carências de instalações e de condições higio-sanitárias” relacionadas tanto com o abate dos animais como com a obtenção das suas carnes, o que

"de certeza interferia negativamente na qualidade dos produtos obtidos". Na opinião de Paredes e Horta (1910) os principais problemas da indústria salsicheira daquela região situar-se-iam nos seguintes aspectos:

- a) Tempos de maturação por vezes excessivos, resultando em estados iniciais de putrefacção das carnes, que muitas vezes eram misturadas com outras de melhor qualidade.
- b) Quantidade de condimentos utilizados e momento da sua aplicação decididos arbitrariamente de acordo com as preferências dos salsicheiros.
- c) Falta de homogeneidade dentro de cada unidade de enchido, decorrente do deficiente processo de enchimento.
- d) Locais de cura de carnes incorrectamente concebidos. Eram indicados como principais problemas a ausência de chaminés de tiragem e a permanência de portas completamente fechadas, o que não permitia controlar a temperatura nem renovar o ar e o fumo.
- e) Utilização de madeiras resinosas e húmidas na fumagem.
- f) Cuidados de higiene insuficientes por parte dos operários, principalmente em relação às mãos e ao vestuário.

Paiva (1944), abordando a salsicharia no distrito de Portalegre, informa que no início da década de 40 esta actividade era predominantemente do "tipo caseiro". Esclarecia o autor que os locais de fabrico consistiam em várias dependências, anexas ou não à casa do salsicheiro. Contudo, destaca que "os estabelecimentos de maior laboração dispõem, em regra, de dependências destinadas ao corte ou desmancho das carcaças, à migra ou retalho da carne e enchimento desta, câmaras de fumagem ou fumeiros, secadores, armazéns de acondicionamento e expedição, câmaras de salga e armazenamento de toucinhos e untos, etc. (...) Quasi todas as dependências se localizam nos prédios dos respectivos industriais, umas vezes como acessórios (...) outras vezes fazendo parte integrante da habitação. (...) Não há critério na orientação e situação relativa dos vários compartimentos (...) quer entre si, quer em relação às outras dependências contíguas ou vizinhas (...). Na sua maioria (...) há um anexo onde ao público se vende (...) carne fresca e gorduras, subprodutos, produtos preparados (...)" . No que respeita às condições higio-sanitárias das instalações o mesmo autor refere que "em quasi todos os estabelecimentos a situação é imprópria e a iluminação e ventilação insuficientes (...); a limpeza muito satisfatória nuns casos e regular noutras (o asseio é um dos mais típicos e bem conhecidos das gentes alentejanas); quasi todos são providos de redes de distribuição de água e esgotos. Nalguns os pavimentos encontram-se devidamente impermeabilizados; noutras são assoalhados ou térreos e as paredes só rebocadas e caiadas. Faltam (...) lavatórios para uso pessoal e as latrinas e mictórios não estão instalados segundo os preceitos de higiene. (...) O pessoal não usa vestuário apropriado nem é submetido periodicamente a inspecção médica". Do equipamento mais comum faziam parte bancas de madeira, alguidares de barro vidrado, tachos de cobre, facas diversas, tesouras, balanças, tábuas para medição do comprimento de alguns enchidos, picos para furar as tripas e enchedoras. Relativamente a este equipamento assinalava o autor que existiam " (...) vários inconvenientes de ordem higiénica (...) em especial o uso de mesas de madeira e recipientes de cobre e barro vidrado". Refere ainda o autor que os produtos de salsicharia fabricados nestas condições não tinham "por via da regra, uma apresentação atractiva. A composição e constituição dos enchidos não possuem fixidez, não obedecem a características definidas e constantes; neste tipo de produtos os invólucros não são calibrados e a composição, recheio, dimensões e peso carecem de uniformidade. (...) As embalagens têm deficiente ou mesmo mau aspecto e o

acondicionamento da mercadoria nem sempre é o melhor ou mais conveniente. (...) Continuam a ser empregues os cestos de vêrga ou as alcofas, as latas (conservados em azeite), (...).

Nos finais da década de 50 e início dos anos 60 ocorrem os surtos de peste suína africana em Portugal. Foi igualmente nestes anos que surgiu uma forte opinião contra a gordura de porco Alentejano, o que resultou na introdução no nosso país de raças precoces, mais magras e proporcionando, por isso, um maior aproveitamento industrial. Estes factos, associados a uma procura crescente de carne e produtos transformados de porco por parte de uma população em crescimento junto dos grandes centros urbanos levou a um significativo deslocamento da industria salsicheira portuguesa para zonas próximas a esses centros: Península de Setúbal, Rio Maior e Grande Porto. Nestas zonas concentravam-se as explorações intensivas de porcos de raças precoces, designadamente Large White e Landrace.

Num trabalho publicado em 1962, Abreu *et al.* referem um estudo realizado pela então designada Direcção Geral de Serviços Pecuários que esclarece sobre “o estado de quase completa desorganização da (...) indústria de preparação e transformação de carnes” em Portugal. As críticas e objecções deste estudo abrangem todo o ciclo de produção, desde a produção dos animais até ao produto final, fresco ou transformado. As críticas mais pesadas incidiram sobre o sistema de distribuição da matéria-prima, referindo não existirem, na altura, garantias de salubridade nem quanto à origem das carnes que davam entrada nas oficinas de transformação, nem quanto aos produtos que delas saiam. Contudo, aqueles autores reconhecem terem sido verificadas até aquela data renovações em instalações e aquisições de novos equipamentos de salsicharia, chegando a afirmar existirem alguns estabelecimentos fabris com características técnicas e higiénicas bastante aceitáveis. Desde essa altura até aos nossos dias a indústria salsicheira nacional evoluiu positivamente. Foram criadas novas indústrias, de dimensões variáveis, normalmente apetrechadas com equipamento adequado e utilizando mão-de-obra qualificada e em muitos casos dispõem de pessoal técnico. Estas indústrias, de um modo geral, fabricam produtos de qualidade, com características sensoriais adequadas ao consumidor e com garantia higio-sanitária, no entanto de valor nutritivo muito variável.

No que respeita às tradicionais unidades de transformação do porco da raça Alentejana, até à primeira metade da década de 80 a industria salsicheira tradicional organizada era praticamente inexistente. Na verdade existiam afamadas casas particulares onde eram produzidos bons enchidos, contudo à margem de qualquer enquadramento legal.

Na Universidade de Évora, em 1986 começou a ser planeado um projecto de reinserção de porco Alentejano no montado. Este projecto teve efeitos práticos na recuperação do efectivo de porcos Alentejanos, na revalorização do montado, sobretudo o de azinho, e, consequentemente, na revitalização da indústria tradicional do porco Alentejano. Na realidade, em finais dos anos 80, princípios dos anos 90, do século passado, surgem as primeiras unidades transformadoras de porco Alentejano devidamente legalizadas. Esse número foi crescendo paulatinamente e actualmente, no Alentejo, existem cerca de 50 unidades a fabricar enchidos de porco Alentejano, entre as 105 salsicharias licenciadas, que operam no Alentejo. Contudo, quase todas as salsicharias que produzem enchidos de porco Alentejano transformam em simultâneo e maioritariamente carne de porcos de raças precoces. Estes valores demonstram a expansão desta actividade numa região que, apesar de tudo, ainda continua muito carenciada de recursos.

4 - Tecnologia da produção de enchidos: etapas do processo de fabrico

A indústria da salsicharia conjuga várias operações cujo objectivo último, na sua génese, é o aproveitamento tão completo quanto possível da carne, vísceras, gorduras e sangue do porco e a sua conservação para usos diversificados.

No que respeita à tecnologia da produção de enchidos (Paiva 1944; Póvoas-Janeiro, 1948; Palumbo e Smith, 1977; Lücke, 1984; Liepe, 1985; Frey, 1995; Pérez-Alvarez *et al.*, 1999; Fernández, 2000; Muguerza *et al.*, 2003; Muguerza *et al.*, 2004; Ruusunen e Puolanne, 2004; Zanardi *et al.*, 2004), de um modo geral podemos considerar seis fases: selecção da carne e da gordura (ou selecção das matérias-primas), migra, preparação da massa, maturação da massa, enchimento e cura (secagem, fumagem e maturação dos enchidos).

4. 1 - Selecção das matérias-primas

Segundo Lücke (1998), na produção de enchidos podem ser utilizadas carnes de porco, bovino, cavalo, entre outras, de acordo com os hábitos de consumo, os costumes e os gostos de cada região. Contudo, a carne de porco é, de longe, a mais utilizada. A aptidão tecnológica destas carnes dependerá do seu pH final e da sua capacidade de retenção de água, assim como da intensidade da cor dos enchidos que venham a ser produzidos com essas carnes. Devido a estes aspectos é recomendada a utilização de carnes de animais adultos.

Na opinião de Pezacki (1979) as carnes utilizadas na produção de enchidos devem ser firmes, com poder tampão e boa capacidade de retenção de água e valores de pH entre 5,4 e 6,0. Não se consideram adequadas as carnes DFD, dada a sua excessiva capacidade de retenção de água e elevado pH, nem as carnes PSE, devido ao seu baixo poder tampão. No entanto, estas últimas poderão empregar-se na formulação de enchidos em que se usam massas com fragmentos de dimensão muito reduzida, como o salame (Towsend e Olson, 1994).

Paiva (1944) e Póvoas-Janeiro (1948) recomendam que deverão ser eliminadas da carne aponevroses, tendões e gânglios. Wheiling (1973) acrescenta que também devem ser eliminadas as gorduras moles.

A composição e a estrutura dos diferentes músculos que constituem a carcaça do porco podem variar amplamente, com diferenças significativas nas percentagens de água, proteínas e lípidos, entre outros constituintes. Deste modo, torna-se importante a escolha criteriosa da carne destinada ao fabrico de cada tipo de enchido para que se obtenha um produto final com composição e características desejáveis (Abreu *et al.*, 1962). De acordo com estes autores, no processo de escolha o salsicheiro decide também a quantidade de gordura que ficará aderente às peças. Quando se utilizam peças demasiado gordas incorre-se em riscos tecnológicos como o baixo poder de retenção de água ou a difícil ligação das massas. Ainda segundo a opinião daqueles autores, quando se utilizam peças excessivamente magras poderá ocorrer uma rápida secagem do produto, com quebras de peso exageradas, sendo prejudicadas também a aparência, textura e sapidez do enchido.



Póvoas-Janeiro (1948) menciona ainda que nesta fase o salsicheiro gradua a percentagem de tecido conjuntivo a deixar na carne.

Na produção da maioria dos enchidos adopta-se como critério a escolha de gordura firme, na grande maioria dos casos o toucinho dorsal, com um ponto de fusão alto e com baixo teor em ácidos gordos insaturados, uma vez que estes aumentam a ocorrência de fenómenos autoxidativos e de exsudação da gordura do enchido (Frey, 1995; Pereda e Perales, 2001). Na opinião de alguns autores (Alvarez, 1994; Fallola *et al.*, 1998; Sábio *et al.*, 1998), constituem uma excepção os enchidos elaborados com carnes de porcos do tronco Ibérico. A gordura destes animais é caracterizada por um elevado nível de insaturação, com repercussões directas no aroma e sabor característicos destes produtos. Além do mais, este tipo de gordura está protegido da rancificação mercê da presença de tocoferois e polifenois que estes animais consomem quando alimentados na montanheira.

4.2 - Miga

Esta operação tem por finalidade reduzir a matéria-prima (carne e toucinho) a pequenos fragmentos com dimensões adequadas a cada tipo de enchido. Deste modo, produtos há constituídos por um só fragmento, caso do paio de lombo, fragmentos de dimensões variáveis, é o caso da maioria dos enchidos: chouriços, linguiças, paios, palaios, entre outros, e ainda os de fragmentos tão diminutos que formam pastas, como é caso de alguns salames, por exemplo. O grau de redução de tamanho está directamente relacionado com a eliminação de água, que será mais lenta nos fragmentos de maior dimensão, e estes, em termos gerais, estarão associados a períodos de cura mais prolongados.

As Fotografias 1 e 2 mostram aspectos de pormenor de uma miga manual, normalmente utilizada nos processos de fabrico caseiros, e de miga mecânica com recurso a uma cortadora eléctrica de crivos.



Fotografia 1 - Pormenor de uma miga manual de carne.



Fotografia 2 – Pormenor da miga de carnes com recurso a uma cortadora mecânica.

A miga deve ser realizada a baixas temperaturas, entre -5°C e 0°C, por forma a que o corte seja preciso e sem que se liberte gordura intramuscular, nas carnes gordas, como é o caso das do porco Alentejano. Tal situação originaria alterações na cor dos enchidos durante a cura (Frey, 1995; Lago, 1997).

Na opinião de Girard (1991), a miga promove a desorganização das estruturas dos tecidos pelas operações de corte, esmagamento e ruptura. A desorganização das estruturas permite aos fragmentos interactuar intimamente graças às forças estabelecidas entre si: pontes de hidrogénio, forças electrostáticas, forças hidrofóbicas e forças de Van der Waals. Estas forças vão assegurar a coesão da massa pela aglomeração de fragmentos, constituídos por células mais ou menos intactas. A posterior reunião destes fragmentos tissulares confere a desejada estrutura dos produtos sujeitos à miga. Neste estádio, o grau de ruptura das células dos tecidos afectados é limitado. Deste modo, as quantidades de componentes proteicos e lipídicos citoplasmáticos obtidos com aquela ruptura são reduzidas, dependendo principalmente da intensidade da miga, ou se quisermos, do grau de redução de tamanho produzido nas carnes. Os fragmentos de carne, ou de gordura, ou a mistura dos dois, aderem entre si, ligam, como é usual dizer. Esta ligação resultará, em grande medida, da acção exercida pelas proteínas, lípidos e água parcialmente exsudados e repartidos em torno dos fragmentos de carne e de gordura, sob a acção das forças anteriormente referidas (Girard, 1991; Pereda e Perales, 2001).

Durante a miga, devido ao aumento da superfície específica da carne e da gordura e por acção do contacto destas com o ar, as superfícies de trabalho, os ingredientes, entre outros, as reacções químicas e bioquímicas e, principalmente, o desenvolvimento microbiano, de um modo geral, aumentam de velocidade. Este tipo de fenómenos tem consequências de natureza física e química, com repercussões mais relevantes na cor, no sabor e nas características reológicas do produto final (Stiebing e Rödel, 1988; Gorsh *et al.*, 1994; Lago, 1997; Cáceres, 2001).

4. 3 - Preparação da massa

Depois de se proceder à escolha, limpeza e redução de tamanho das peças (miga) são adicionados os restantes ingredientes do enchido do que resulta uma mistura denominada massa.

O conjunto dos ingredientes adicionados às matérias-primas (carne e toucinho) é muito variável, de acordo com o tipo de enchido. Podemos agrupá-los em água, nalguns casos vinho, condimentos e aditivos, estes últimos de uso muito limitado nos enchidos tradicionais ou mesmo não utilizados. Por nos parecer pertinente passamos a referir sumariamente os ingredientes usados mais frequentemente na produção generalizada de enchidos, para além da carne e do toucinho.

O **sal** é, seguramente, o ingrediente mais antigo que se conhece, desempenhando inúmeras funções na carne. A sua adição às massas destinadas à produção de enchidos deve-se essencialmente à sua actividade como agente depressor da actividade da água (a_w), funcionando como bacteriostático. Todavia, o sal produz muitos outros efeitos de inquestionável interesse. É agente promotor do sabor, produz uma diminuição do pH, que devido ao efeito Donnan (Möhler, 1984; Goutefongea, 1991) provoca um abaixamento do ponto isoeléctrico das proteínas e, consequentemente, uma maior capacidade de retenção de água.

Em relação ao papel bacteriostático do sal, são vários os autores que destacam a sua acção sobre a microbiota aeróbia responsável pela alteração da carne fresca, assim como sobre alguns patogénicos (Kröckel, 1995; Houtsma *et al.*, 1996), na medida em que induz, juntamente com outros solutos (nitratos, nitritos, hidratos de carbono, etc.), um decréscimo na a_w para valores de 0,97-0,96 (Rubio, 1994; Fernández, 2000). Este facto, de forma indireta, favorece o desenvolvimento da microbiota láctica (Pezacki, 1979) uma vez que as bactérias aeróbias Gram-negativas e a microbiota patogénica são muito sensíveis aos decréscimos dos valores de a_w e a microbiota láctica se desenvolve bem em tais condições (Rubio, 1994).

Goutefongea (1991) refere que para concentrações de sal de 10% o crescimento da maior parte das formas bacterianas halosensíveis é inibido, enquanto que concentrações de 5% inibem apenas formas anaeróbias. Nos tempos mais recentes, por exigências relacionadas com as preferências dos consumidores, a concentração utilizada não ultrapassa os 3% (Lücke, 1998).

O sabor “salgado” que o cloreto de sódio transmite à carne deve-se, de forma directa, aos seus iões cloro (Cl^-) e sódio (Na^+), este último estimulando os receptores de electrões (Amerine *et al.*, 1965; Froelich *et al.*, 1983; Goutefongea, 1991; Ramarathnam e Rubin, 1994; Gimeno *et al.* 2001a,b) e, de forma indireta, à sua influência sobre a actividade das catepsinas musculares (Baldini *et al.*, 1977; Gil *et al.*, 1999).

Na opinião de Hamm (1960) o valor do pH das proteínas da carne crua, quando se adiciona sal nas doses clássicas, diminui de 0,2. Goutefongea (1991) considera ser esta diminuição, em condições normais de fabrico, a razão do aumento da diferença entre o pH das moléculas proteicas e o pH do meio, o que, consequentemente, aumenta o poder de retenção de água da carne. A acção do sal sobre as proteínas reflecte-se nas características tecnológicas da carne, destacando-se a sua acção na ligação das massas e, em resultado disso, sobre as características texturais dos enchidos, sendo estas favorecidas pelo aumento da solubilidade das proteínas miofibrilares (Alvarez, 1994; Fernández, 2000). Por sua vez, o aumento da solubilidade proteica é proporcionado pelo aumento da força iónica provocado pela adição de sal (Fernández, 2000). Contudo, parecemos oportuno referir também que a adição de sal tem um carácter prejudicial sobre a fracção lipídica na medida em que acelera a ocorrência de fenómenos de autoxidação.

A penetração de sal na carne faz-se em função do equilíbrio osmótico entre o interior e o exterior das células, sendo a velocidade de penetração tanto menor quanto mais próximo se estiver daquele equilíbrio. De acordo com Goutefongea (1991), os factores que influem na velocidade com que aquele equilíbrio é estabelecido são o pH da carne (cujo aumento dificulta a penetração do sal), a temperatura (cujo aumento beneficia a penetração do sal), a concentração de sal na salmoura (que tem uma relação linear e proporcional com a velocidade de penetração do sal) e a relação entre a concentração de sal na salmoura e a carne (até certos limites, relações maiores promovem maior velocidade de penetração do sal na carne).

As **especiarias** são produtos de origem vegetal, em natureza, fraccionados ou reduzidos a pó, que se adicionam aos alimentos de modo a conferir-lhes sabor e aroma particulares. Gerhardt (1975) adianta que para além de aumentarem a capacidade de conservação dos produtos cárneos, são substâncias com interferências desejáveis no organismo humano.

Wheiling (1973) e Rosário (1989) esclarecem que quanto menores forem as partículas das especiarias maior será a sua acção. Gerhardt (1975) e Garcia e Bejarano (2001) informam que as propriedades reconhecidas das especiarias são atribuídas aos óleos essenciais, constituídos por hidrocarbonetos aromáticos, alifáticos e cílicos, e alguns

derivados oxigenados e sulfurados. Os mesmos autores referem ainda que as especiarias determinam um aumento da actividade glandular, com maior produção de saliva e de suco gástrico, o que contribui para uma melhor digestão. Shehata (1998) sustenta que, nos enchidos, as especiarias têm um efeito estimulador da formação do ácido láctico, que parece dever-se aos elevados teores de magnésio de algumas delas, elemento necessário para a actividade de algumas enzimas da cadeia respiratória dos lactobacilos.

O aumento da capacidade de conservação dos produtos cárneos devido ao emprego de especiarias está relacionado com a actividade bacteriostática ou bactericida das especiarias, actuando sobre os sistemas oxido-redutores das células bacterianas. As especiarias apresentam ainda actividade antioxidante sobre as gorduras, possivelmente pela sua capacidade quelante de metais, inibindo o aparecimento da fase inicial da autoxidação, capacidades de hidratação e de emulsão e propriedades farmacológicas (Wheiling, 1973; Gerhardt, 1975; Zaika e Kissinger, 1981; Farag *et al.*, 1989; Garcia e Bejarano, 2001).

As especiarias utilizam-se sob diversas formas, frescas após colheita, em diversos graus de desidratação, oleoresinas e óleos essenciais. Devido à sua origem e posterior manipulação, podem constituir uma fonte de contaminação dos alimentos, sendo, por isso, exigência corrente a sua esterilização, por processos ditos frios, que respeitem a manutenção dos aromas e dos sabores (óxido de etileno e radiações ionizantes).

As especiarias são ainda consideradas agentes camufladores de outros sabores, e antissépticos gastrointestinais, justificando assim o seu elevado uso em países com temperaturas médias diárias elevadas, como o México, áreas da África e da Índia (Hall e Merwin, 1981). Provavelmente, por razões semelhantes, os países da orla mediterrânea usam, de um modo geral, uma forte condimentação nos enchidos (Rosário, 1989).

São várias as especiarias utilizadas no fabrico de enchidos, contudo, as mais frequentemente usadas, pelas suas características sápidas e aromáticas, são o alho (*Allium sativum*), ou a massa de alho, e o pimento (*Capsicum annuum L.*), sob a forma de massa de pimentão, ou de pimentão desidratado (colorau). O pimentão é também utilizado pela coloração alaranjada que transmite aos enchidos.

A parte utilizada da planta de alho é o seu bulbo. Para além do seu sabor típico, particularmente acre e sulfuroso, relacionado com o seu teor em alicina, o alho possui uma marcada actividade antimicrobiana. De acordo com Gerhardt (1975), se ingerido em doses elevadas, diminui a pressão sanguínea e elimina a microbiota intestinal indesejável. Segundo o mesmo autor, apesar de haver algumas variedades com poucos açúcares, a maioria dos bulbos tem quantidades relativamente elevadas; contêm também as vitaminas A, B₁, B₂, e amida do ácido nicotínico.

A família das Solanáceas, a que pertence o pimento, é caracterizada pelos seus teores elevados em alcalóides, particularmente a capsaina que existe em quantidades elevadas nas sementes. Porém, na grande maioria dos casos as sementes não são usadas como especiaria. Gerhardt (1975) apresenta como valores indicativos teores em capsaina entre 30 e 100 mg por 100 g de produto. A coloração vermelha alaranjada é atribuída à capxantina, à capso rubina e à presença de pequenas quantidades de um carotenóide. O seu teor em vitamina C, muito elevado, pode alcançar os 200 mg por 100 g de produto (Gerhardt, 1975; Garcia e Bejarano, 2001).

A Fotografia 3 apresenta três das matérias-primas subsidiárias mais utilizadas no fabrico de enchidos tradicionais alentejanos: sal, massa de pimentão e massa de alho.

Outras especiarias usadas são a cebola, a salsa, o louro, a pimenta, o cravinho, os cominhos, a noz-moscada, o tomilho, a manjerona, o óregão, a mostarda, entre outros.

Algumas destas especiarias são aplicadas em quantidades muito pequenas devido à forte acção aromática e saborizante. O seu uso varia com a região e o tipo de produto, e o costume de cada um dos fabricantes (Rosário, 1989).



Fotografia 3 – Três das matérias-primas subsidiárias mais usadas no fabrico de enchidos tradicionais alentejanos: sal, massa de pimentão e massa de alho.

Os **aditivos** aplicados na formulação de enchidos, são agrupados por Gerhardt (1980) de acordo com a função que desempenham: física ou química. Este autor considera aditivos de acção física os sais de ácidos orgânicos, os sais do ácido pirofosfórico, os emulsionantes (mono e diacilglicéridos, ésteres de ácidos orgânicos) e os estabilizadores de textura (amido, agar, pectina, carragenatos, gelatina, plasma sanguíneo, proteínas de leite e de soja). Nos aditivos de acção química estão incluídos os melhoradores da cor (nitrato e nitrito de sódio e de potássio); os coadjuvantes do avermelhamento (ácidos acético, cítrico, tartárico, láctico, ascórbico e gluconona-δ-lactona); os melhoradores do sabor (glúcidos, hidrolisados de proteína, ribonucleótidos, aminoácidos); antioxidantes (ácido ascórbico e derivados, tocoferol e derivados fenólicos) e culturas de arranque (micrococos, lactobacilos, leveduras e bolores).

Alvarez (1994) e Fernández (2000), ao abordarem os aditivos para uso na elaboração de enchidos crús curados referem 8 grupos: os corantes (cochinilha (ácido carmínico), carotenóides, xantófilas, entre outros); os conservantes (o ácido sórbico e os seus sais de sódio e de potássio; os nitratos e os nitritos de sódio e de potássio, apesar de serem usados com o principal objectivo de promoverem e estabilizarem a cor, pertencem ao grupo dos conservantes); os anti-oxidantes (naturais como os tocoferóis, ou artificiais como, por exemplo, o ácido ascórbico e os ascorbatos); os estabilizantes, emulsionantes, espessantes e gelificantes (fosfatos, carragenatos, caseinatos, proteínas de soja, entre outros); os potenciadores do sabor (ácido glutâmico e glutamatos, ácido guanílico e guanilatos, entre outros); os reguladores do pH (ácido láctico, ácido cítrico, gluconona-δ-lactona, entre outros); os reguladores da maturação (por exemplo glucose, sacarose, lactose, culturas de arranque); e, por último, os aditivos para tratamento de superfície, como a pimaricina.

As quantidades máximas de aditivos aplicadas às matérias-primas, assim como os valores residuais máximos admissíveis no produto final estão definidas na maioria dos países. Em Portugal essa definição é feita através da Norma Portuguesa 1736, de 1986.

A água, quando utilizada, é aplicada como excipiente. A adição de água às massas tem por objectivo difundir mais facilmente os condimentos e os aditivos, tornando-os mais facilmente absorvíveis pela carne, e facilitar a homogeneização das massas. Por outro lado, a adição de água contribui para incrementar o desenvolvimento microbiano, uma acção desejável em produtos fermentados, como são a grande maioria dos enchidos. A adição de água nalguns casos ocorre apenas na etapa de preparação da massa e em outros casos ocorre uma ou várias vezes no decurso da etapa de fabrico seguinte, a maturação. Nos enchidos mais industrializados é comum adicionar água com o objectivo de reduzir as quebras de peso durante as etapas sequentes do processo.

Em algumas zonas do nosso país é usual a adição de vinho como condicionante do aroma e do sabor de alguns enchidos regionais.

4. 4 – Maturação das massas de carne

A maturação é um fenómeno resultante da acção desenvolvida pelo sal, água e microrganismos específicos, cada um deles desempenhando um papel de relevo. Durante esta etapa do fabrico pretende-se favorecer a interacção dos diferentes ingredientes.

Esta fase do processo é caracterizada, essencialmente, pela entrada de sal nos fragmentos da carne e concomitante extracção de água e proteínas miofibrilares e pelo desenvolvimento microbiano, de que resulta a libertação de produtos do seu metabolismo. As proteínas miofibrilares, quando extraídas, tornam viscosas as superfícies dos fragmentos e desempenham um papel determinante na ligação das massas.

Os parâmetros ambientais indicados para que estes fenómenos ocorram de forma adequada são valores de temperatura entre 0 e 5°C e de humidade relativa entre 90% e 95%, embora haja autores (Lago, 1997; Pereda e Perales, 2001) que referem temperaturas a variar entre 5 e 10°.

A Fotografia 4 mostra carros em aço inoxidável com massas de carne a maturar em câmara refrigerada.



Fotografia 4 – Carros em aço inoxidável com massas de carne a maturar em câmara refrigerada.

A microbiota interveniente na maturação das massas é variada e tendencialmente específica, sendo conhecidos vários grupos de microrganismos implicados: bactérias do

ácido láctico, micrococáceas, bactérias Gram-negativas, leveduras e bolores, embora estes últimos com um papel bastante mais limitado (Oliveira *et al.*, 1987; Rosário, 1989; Stahnke, 1995a; Borch *et al.*, 1996; Samelis *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1998; Lizaso *et al.*, 1999; Garcia-Varona *et al.*, 2000; Gimeno *et al.*, 2001a; Pereda e Perales, 2001). Os efeitos da multiplicação microbiana são acompanhados por fenómenos físico-químicos como o aumento da concentração salina e o consequente decréscimo da actividade da água, a acidificação do meio e o abaixamento do potencial redox (Stahnke, 1995a, Pérez-Alvarez *et al.*, 1999; Patarata, 2002).

A duração desta etapa, dependendo do calibre dos enchidos e do grau de redução de tamanho a que foram submetidas as carnes, varia entre as 24 e as 48 horas, nos processos mais industrializados, e entre os 2 e os 4 dias, nos processos artesanais.

4. 5 - Enchimento

O **enchimento** é a operação que consiste em introduzir a massa, repousada e maturada, num invólucro adequado (Abreu *et al.*, 1962; Ribeiro, 1978). O invólucro proporciona à massa coesão, forma e dimensões, protegendo-a de algumas influências externas prejudiciais, designadamente contaminações microbianas, não podendo constituir ela própria, uma fonte de contaminação, microbiana ou química.

A massa deve ser introduzida no invólucro de modo a que não fiquem espaços com ar no seu interior, podendo, nestes casos, ocorrer fenómenos putrefactivos originados pelo desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (Wheiling, 1973; Cambero *et al.*, 1998). A inexistência de bolsas de ar no interior das massas que estão circunscritas aos invólucros permite uma melhor formação da cor, uma consistência mais firme, um retardamento na ocorrência de reacções oxidativas das gorduras indesejáveis e, consequentemente, uma melhor conservação dessas massas (Cambero *et al.*, 1998; Fernández, 2000).

Na produção de enchidos artesanais são utilizados vários tipos de invólucros, nomeadamente as tripas (intestino delgado e grosso), as serosas peritoniais (vulgarmente designadas por pele das banhas), o estômago (correntemente designado por bucho) e as bexigas. Estes invólucros são designados por naturais. No entanto, em processos mais industrializados são utilizadas, também, tripas artificiais, fabricadas a partir de celulose, de pergaminho ou de fibras membranosas, ou ainda da combinação das últimas duas (Wheiling, 1973; Migaud e Frentz, 1978; Fraqueza, 1992). Para além destas, Schiffner *et al.* (1996) e López e Nieto (2001) referem tripas artificiais sintéticas à base de poliamidas, poliésteres, polímeros mistos de dicloreto de polivinilideno (PVDC), polipropileno e polietileno. Ockerman e Hansen (1996) e Fernández (2000) informam que de entre as tripas artificiais as mais utilizadas são as de colagénio reconstituído, uma vez que possuem características semelhantes às naturais. Algumas tripas de colagénio usadas na produção de enchidos curados crus são reforçadas com seda ou com uma malha de algodão. Muitas destas tripas têm uma envoltura periférica em corda para dar uma aparência artesanal ao produto final (Price e Schweigert, 1994).

Ainda que muitos fabricantes continuem a preferir as tripas naturais, as artificiais e as sintéticas têm ganho cada vez maior importância devido à robustez e fácil manipulação e à precisão do seu calibre (Alvarez, 1994). As tripas naturais contribuem para a melhor aparência dos enchidos e são usadas, sobretudo, em produtos de alta qualidade. De um modo geral, a utilização de tripas naturais carece de mais mão-de-obra que as artificiais, na

medida em que requerem um maior número de manipulações até serem usadas e, sobretudo, por se romperem com relativa facilidade durante a operação de enchimento.

A Fotografia 5 representa o enchimento de paio de porco Alentejano usando como invólucro uma tripa natural de porco (intestino grosso).



Fotografia 5 – Pormenor do enchimento de paio de porco Alentejano usando como invólucro uma tripa natural de porco.

As tripas naturais são perecíveis, razão porque são, geralmente, conservadas em sal, a temperaturas de 2°C a 4°C, congeladas ou desidratadas. Aquelas, se armazenadas a temperaturas elevadas podem ser alteradas por desenvolvimento de bactérias e bolores halófilos, produtores de pigmentos vermelhos. Em alguns casos desenvolvem-se bactérias do género *Halobacterium*, com actividade proteolítica, o que pode afectar negativamente a resistência da tripa. Se congeladas, as tripas tornam-se frágeis, rompendo-se com maior facilidade durante o enchimento (Frey, 1995; López, 1997).

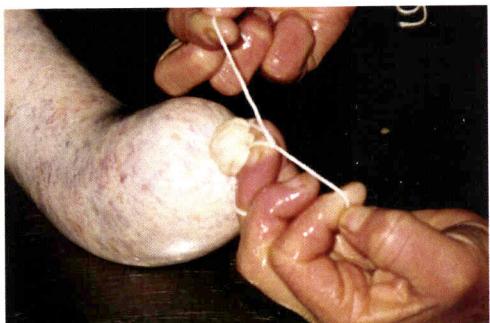
Antes de serem cheias, as tripas naturais salgadas devem ser demolhadas para eliminação do sal, caso contrário poder-se-iam obter massas com centrações em sal acima do desejável. Deverá igualmente haver o cuidado de retirar o excesso de água das tripas demolhadas por foma a evitar a ocorrência de defeitos na cor dos enchidos, como insuficiente avermelhamento ou a formação de pigmentos cinzentos ou verdes (Fraqueza, 1992; Frey, 1995; López e Nieto, 2001).

As propriedades fundamentais atribuídas às tripas utilizadas no fabrico de enchidos são a sua elasticidade e a sua permeabilidade ao vapor de água e ao fumo, no caso dos produtos fumados, que constituem a grande maioria dos enchidos portugueses. A elasticidade é decisiva para que a retracção da tripa acompanhe a redução de tamanho do enchido resultante da sua desidratação. O coeficiente de difusão do vapor de água através da tripa é importante na medida em que a permeabilidade da tripa regula a desidratação necessária à estabilização do enchido, não podendo esta permeabilidade ser baixa ao ponto de impedir a adequada desidratação, nem alta ao ponto de promover uma secagem excessiva (Alvarez, 1994; Rubio, 1994; López, 1997; Fernández, 2000).

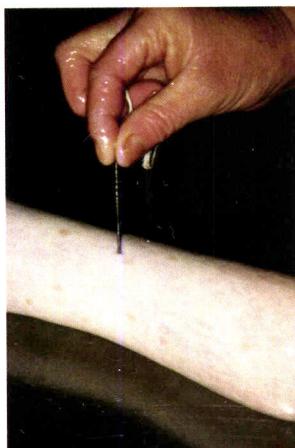
Após o enchimento as tripas são atadas nas extremidades e picadas, com agulhas. Wheiling (1973) e Lugo (Lago, 1997) sustentam que após o enchimento os enchidos devem ser imediatamente atados para que não haja diminuição da pressão de enchimento.

Sousa e Ribeiro (1983) referem que os enchidos são primeiramente comprimidos, para distribuição uniforme da massa em toda a sua extensão, e depois perfurados ao longo do invólucro, por forma a permitir a saída de gases e líquidos exsudados durante a cura. Só depois a tripa é cortada e atada nas duas extremidades. Contudo hoje em dia é muito frequente picar a tripa depois desta ter sido atada.

As Fotografias 6 e 7 mostram, respectivamente, a atadura de uma das extremidades da tripa com fio de algodão e a perfuração da tripa, com agulha.



Fotografia 6 - Atadura de uma das extremidades da tripa com fio de algodão.



Fotografia 7 - Perfuração da tripa com agulha.

4.6 - Cura

A carne depois de migada, temperada, amassada e maturada, transforma-se mediante o processo de cura numa substância alimentar com características organolépticas, físicas e químicas diferentes e “*sui generis*” (Povoas Janeiro, 1948). Com efeito, a cura dá continuidade aos processos físicos, químicos, bioquímicos e microbiológicos, iniciados na fase de maturação, que vão conduzir posteriormente à obtenção de um produto com características organolépticas e de conservação completamente diferentes das da matéria-prima que lhe deu origem (Rosário, 1989). Acrescenta o mesmo autor que a série de transformações resultantes da acção de diversos factores actuando em simultâneo intensificam-se nas massas em maturação e continuam após o enchimento, nas tripas ou outros invólucros, durante o período de secagem e fumagem. Deste modo, alguns enchidos adquirem a estabilidade pela acidificação resultante da fermentação, pela desidratação e consequente aumento do teor em sais e decréscimo da actividade da água, pela fumagem e pelo processamento térmico.

Durante a cura, os enchidos perdem grande parte do seu peso inicial devido à redução do teor em água, facto que contribui para o desenvolvimento da sua textura característica. É durante esta fase que são geradas as substâncias aromáticas e sápidas mediante a intervenção de enzimas, principalmente de origem microbiana mas também procedentes da própria carne. Até há poucos anos o resultado final dependia, em grande medida, do acaso,

dos microrganismos que se instalavam na massa e das condições climáticas no momento da produção dos enchidos. Na actualidade, nas salsicharias licenciadas todos estes processos são controlados com maior rigor devido à utilização de câmaras climatizadas. A utilização de culturas de arranque, prática a que ainda não recorre a salsicharia do nosso país, constitui um importante passo na melhoria da qualidade sensorial e higio-sanitária de muitos enchidos.

Na indústria salsicheira é frequente o recurso a três processos de cura: o escaldão, o ar ambiente e a fumagem, sendo este último processo, incontestavelmente, o mais utilizado na cura dos enchidos portugueses.

O escaldão é usado no nosso país essencialmente para a cura de morcelas. O processo consiste na introdução do enchido em água em ebullição até que a sua temperatura interna atinja, como mínimo, os 70°C, sendo desejável que se alcancem os 72°C. Como consequência da acção do calor ocorre gelificação proteica, com retenção de água e gordura, de que resulta uma consistência estável e firme do produto após arrefecimento (Frey, 1995; Bernáldez e Ramos, 2001; Merino e Bejarano, 2001; Rojas e Sereno, 2001). Com as temperaturas obtidas é destruída uma parte considerável da microbiota termossensível, patogénica e alterante, conseguindo-se deste modo uma certa estabilidade microbiológica do produto sob refrigeração (Ribeiro, 1986).

A cura dos enchidos utilizando apenas o ar ambiente é muito pouco usual no nosso país, ocorrendo apenas em certas regiões raianas, como Barrancos e Ficalho, e são um claro reflexo das influências espanholas. Em Barrancos estão instaladas duas salsicharias industriais que, respeitando as tradições daquela região, curam os seus produtos expondo-os unicamente à acção do ar, com valores de temperatura e de humidade relativa controlados em câmaras, ocorrendo a exposição dos produtos ao ar ambiente apenas após a estabilização microbiológica.

Nos processos industriais em que durante a cura os enchidos são expostos apenas ao ar, as condições ambientais normalmente estabelecidas são de 12-15°C de temperatura e humidade relativa decrescente, de forma progressiva, até valores de 70-75%. É imprescindível que ocorra uma boa ventilação para que se consiga uma secagem uniforme e homogénea.

A fumagem consiste na exposição dos enchidos à acção do fumo resultante da combustão de determinadas madeiras não resinosas. No sul e centro de Portugal o azinho é indiscutivelmente a madeira mais utilizada. Contudo no norte do país, para além do azinho, há também a utilização de outras madeiras, como a faia e a oliveira, por exemplo, na fumagem dos enchidos. Möhler (1980) indica valores de temperatura de 20-24°C para a fumagem a frio, valores de 60°C para uma fumagem que designa por temperada, usada na Baixa Baviera e no Tirol, onde é frequente o uso de lenha muito resina que produz muita fuligem, e valores de 130°C para a fumagem a quente, que permitem que no centro térmico do produto sejam atingidos os 80°C. De acordo com este autor, este tipo de fumagem é usado em produtos de cura rápida. Tem por objectivo acelerar a conversão da mioglobina em nitrosomioglobina, por acção do nitrito, o que ocorre a temperaturas superiores a 60°C, e uma coagulação mais ou menos intensa nas proteínas da carne, com repercussões na textura dos enchidos. Por outro lado, Girard (1991) e López e Nieto (2001) referem que na fumagem a frio as temperaturas estão, geralmente, compreendidas entre os 20 e os 25°C, não excedendo os 28°C, e com uma humidade na câmara de fumagem normalmente compreendida entre 70 e 80%. Para a fumagem a quente, que se aplica a produtos cozidos ou escaldados, aqueles autores indicam valores de temperatura de 30-35°C, no início do processo, sendo atingidos valores máximos de 50-55°C ou de 75-80°C. Após a saída do fumeiro, os enchidos completam o processo de cura em câmaras à temperatura de 10-

15°C, humidade relativa de 75-80% e ao abrigo da luz (Wheiling, 1973; Alvarez, 1994; Fernández, 2000; López e Nieto, 2001). Cambero *et al.* (1998) referem ser nestas câmaras que se processa grande parte da desidratação dos enchidos pelo que o ar deve circular de modo a abranger uniformemente todos os produtos.

4. 7 - Algumas considerações sobre a fumagem

A utilização da fumagem na conservação de alimentos parece remontar à descoberta do fogo. Em Zwierzyniec, na região de Cracóvia, Polónia, foi encontrada a câmara de fumagem mais antiga de que há registo, com cerca de 90 000 anos (Rosário, 1989).

O fumo é um sistema bastante complexo, cuja composição varia de acordo com inúmeros factores, sendo o papel de cada um deles difícil de definir clara e objectivamente. Segundo Girard (1991) o fumo produzido pela combustão da madeira é um aerosol constituído por uma suspensão de partículas sólidas e líquidas, com o diâmetro aproximado de 0,1μ (fase dispersa) num meio gasoso (fase dispersante).

A produção de fumo resulta da combustão incompleta da madeira onde ocorrem diversas reacções paralelas, entre elas a degradação térmica dos vários constituintes da madeira (celulose, hemicelulose e lenhina) em moléculas orgânicas mais simples (pirólise) e, em simultâneo, reacções de oxidação, de polimerização e de condensação. Estas reacções dão origem a vários compostos químicos, dos quais já foram identificados cerca de 300, entre cerca de um milhar que provavelmente existirão na composição química do fumo (Klettner, 1980; Girard e Talon, 1983; Girard, 1991; Prandl *et al.*, 1994). Na opinião de Girard (1991) os compostos do fumo, existentes tanto na fase dispersa como na dispersante, podem ser agrupados em 8 principais categorias: ⁱ⁾fenóis, ⁱⁱ⁾carbonilos, cetonas e aldeídos, ⁱⁱⁱ⁾ácidos carboxílicos, ^{iv)}furanos, ^{v)}álcoois e ésteres, ^{vi)}lactonas, ^{vii)}hidrocarbonetos alifáticos, ^{viii)}hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (H.P.A.). Outros autores (Kramlich *et al.*, 1973; Daun, 1975; Urbain, 1976; Klettner, 1980; Möhler, 1980) mencionam como componentes mais importantes do fumo os fenóis, os cresóis, os ácidos, os aldeídos, os álcoois, os ésteres, os furanos, as lactonas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, as misturas de ceras e resinas e os gases monóxido e dióxido de carbono, oxigénio e azoto.

As opiniões dos diferentes autores não são unânimes sobre a influência do tipo de lenha na composição do fumo. No entanto, Girard (1991) indica parâmetros que considera terem influência sobre a composição do fumo. Alguns destes parâmetros estarão relacionados com a tecnologia de produção do fumo (natureza e humidade da madeira, temperatura de combustão e fluxo de ar admitido no gerador de fumo) e outros relacionados com a tecnologia do produto a fumar, designadamente temperatura e humidade relativa pretendidas no fumeiro.

Segundo Obadia (1993), as madeiras podem classificar-se em duras (carvalho, faia, freixo, azinho, castanho, entre outras), macias ou brandas (bétula, amieiro, tília, entre outras) e resinosas (pinho e abeto, por exemplo). Na opinião de Girard (1991) as madeiras duras gerariam aromas superiores aos obtidos de madeiras brandas; as madeiras resinosas seriam responsáveis por aromas medíocres, alguns desagradáveis, sendo, por estas razões, de evitar a sua utilização. De acordo com o mesmo autor, as madeiras duras apresentam, em relação às macias, diferenças na estrutura química da lenhina, o que será determinante na formação de determinados compostos fenólicos e seus derivados,

importantes por conferirem aromas característicos e desejáveis aos produtos fumados. Por outro lado, as madeiras duras produzem fumos mais ricos em compostos aromáticos totais e em ácidos do que as madeiras resinosas.

Quanto ao teor de humidade da madeira, Girard (1991) adianta que para valores elevados de humidade os fumos são deficitários em fenóis e com grandes quantidades de ácidos e de compostos com grupos carbonilo. Refere o mesmo autor que para uma adequada combustão da madeira o seu teor de humidade deverá ser próximo dos 50%.

Segundo informam López e Nieto (2001), a quantidade de fenóis, carbonilos e ácidos do fumo atingem o seu máximo quando a temperatura de combustão é de 600 °C. De acordo com Möhler (1980) e Girard (1991) a formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) está directamente relacionada com a temperatura de combustão da madeira: começa quando se atingem os 400 °C, eleva-se progressivamente até atingir o máximo a 800 °C, diminuindo a sua produção com temperaturas mais elevadas. Por estas razões vários autores referem como mais adequadas temperaturas de pirólise da madeira situadas entre os 400 e os 600°C (Daun, 1975; Girard, 1991; López e Nieto, 2001). De acordo com Lawrie (1977) os HPA são formados quando a temperatura de combustão da madeira ultrapassa os 350 °C, temperatura a que é degradada a lenhina, composto frequentemente implicado com a formação de substâncias carcinogénicas. Contudo foi demonstrado não ser a lenhina mas a temperatura a que ela é decomposta que provoca o aparecimento dos HPA (Klettner, 1980).

Na opinião de Girard (1991), a quantidade de oxigénio disponível no momento da pirólise interfere no teor de HPA presentes no fumo, na medida em que teores de oxigénio mais elevados resultam em temperaturas de combustão superiores.

De acordo com Möhler (1980), a rapidez da combustão influí sobre a temperatura e por essa razão tem uma participação importante na composição do fumo. Deste modo, a presença de compostos furânicos diminui com o aumento do teor de oxigénio e o teor de compostos fenólicos aumenta até teores de oxigénio de 10%, diminui entre 10 e 20% e estabiliza para concentrações de oxigénio superiores a 20%. Assim, a concentração de oxigénio influenciará tanto a qualidade higiénica do fumo, como as características organolépticas dos produtos fumados, como se compreenderá nos parágrafos seguintes.

Nos nossos dias, os objectivos que se pretendem atingir com a fumagem das carnes transformadas traduzem-se na modificação do aroma, sabor e cor dos produtos fumados, na sua acção antioxidante sobre as gorduras, no efeito conservante resultante da sua acção inibidora ou letal sobre alguns microrganismos, e na sua intervenção sobre a textura dos produtos (Wheiling, 1973; Bard e Townsend, 1976; Möhler, 1980; Gray e Pearson, 1984; Girard, 1991; López e Nieto, 2001).

A complexidade do processo de aromatização pelo fumo reside no facto de nem o aroma nem o sabor dependerem apenas da acção dos componentes do fumo mas também das reacções destes com o substrato. Nos produtos fumados, as proteínas reagem, em primeiro lugar, com os compostos com grupos carbonilo (metilgioxal, dioxiacetona, diacetilo, furfural e hidroximetilfurfural), posteriormente ocorrem reacções com os fenóis (hidroquinona, pirogalol, catequinas) e com os ácidos carboxílicos de cadeia média, os hidroxicarboxílicos, oxocarboxílicos e dicarboxílicos. É aceite que o aroma e, consequentemente, o sabor a fumo se devem, essencialmente, aos fenóis e aos ácidos carboxílicos (Möhler, 1980; Girard e Talon, 1983; Gray e Pearson, 1984). Contudo, Girard (1991) sustenta que o aroma e o sabor típicos dos produtos fumados são devidos, principalmente, à acção de compostos fenólicos do fumo, embora estes não actuem isoladamente. A presença de outros compostos, como carbonilos, lactonas, furanos, álcoois e cetoalcoóis, ésteres, ácidos, intervêm na formação do aroma e do sabor. Por outro lado,

López e Nieto (2001) sustentam que os compostos fenólicos conferem o sabor típico dos produtos fumados; que lactonas, furanos, álcoois e ésteres têm, sobretudo, uma acção ao nível do sabor e que os ácidos carboxílicos (fórmico, acético e benzóico) intervêm debilmente na formação do aroma.

A cor conferida pela fumagem resulta, principalmente, da sedimentação de substâncias corantes, principalmente compostos voláteis do grupo dos fenóis, sujeitos a escurecimento por polimerização ou oxidação. A superfície absorve também compostos provenientes dos carbohidratos. Os mais importantes são o furfural e seus derivados. Todavia, a principal causa da coloração escura durante a fumagem reside nas reacções de escurecimento não enzimático, ou reação de Maillard (Möhler, 1980). Nesta reação há envolvimento de grupos amina livres das proteínas, ou de outros compostos azotados, com os grupos carbonilo dos glúcidios redutores, resultando compostos escuros denominados melanoidinas. Neste tipo de coloração são particularmente activos os derivados dos carbonilos de cadeia larga, designadamente glucoaldeído, gioxal, metilgioxal, hidroxiacetona, diacetilo. Entre as aminas são importantes as da lisina, da arginina, do glutamato, do aspartato, da histidina e da glicina (Möhler, 1980; Cheftel e Cheftel, 1984).

Na opinião de Möhler (1980) a intensidade e a conservação da cor são dependentes de vários factores, designadamente do teor de água à superfície (os fenóis são mais absorvidos numa superfície húmida), do pH do substrato (na medida em que a acidez favorece a fixação da cor), da duração do aquecimento e da natureza do substrato. A este propósito refira-se que os produtos fumados apresentam colorações muito diversas consoante a natureza da superfície e, neste âmbito, as proteínas são as primeiras a participar na série de reacções que ocorrem. Por esta razão o toucinho fixa menos cor que o músculo. Por outro lado, pela acção do calor durante a fumagem as proteínas sofrem coagulação de que resulta uma diminuição na capacidade de absorção de água. Por seu lado, a mobilização de água provocada pela coagulação pode modificar a película de humidade à superfície da carne, aumentando por essa razão a solubilidade dos componentes hidrófilos do fumo. A intensidade da cor está ainda ligada à quantidade de alcatrões presentes. O aspecto brilhante que o produto fumado apresenta resulta da formação de substâncias resinosas pela polimerização entre fenóis e compostos com grupos carbonilo (Girard e Talon, 1983; Girard, 1991). De acordo com os mesmos autores, madeiras duras produzem cores mais intensas que as resinosas e estas, por seu lado, conduzem a colorações mais escuras que as madeiras duras.

A acção antioxidante exercida pelo fumo nas gorduras é atribuída aos compostos fenólicos existentes na fase dispersa do fumo (Kramlich *et al.*, 1973; Möhler, 1980; Girard, 1991; López e Nieto, 2001), principalmente àqueles que possuem elevado ponto de ebulição, contribuindo estes também para o aroma dos produtos fumados (Gray e Pearson, 1984).

A acção conservante do fumo é exercida pelo efeito combinado do aquecimento, da desidratação e dos compostos químicos com acção antimicrobiana, como os aldeídos, os fenóis e os ácidos (Kramlich *et al.*, 1973; Gray e Pearson, 1984; López e Nieto, 2001). Outros compostos presentes, como a urotropina e os derivados da piridina, reforçam a acção do formol e dos compostos fenólicos. O fumo tem ainda uma acção bacteriostática residual durante o armazenamento dos produtos que vai acelerar a gradual substituição de populações da família *Micrococcaceae*, dominantes no final da fumagem, por bactérias ácido-lácticas, cujo desenvolvimento é favorecido pelos componentes do fumo (Girard e Talon, 1983; Girard, 1991).

Na opinião de Lücke (1986) a fumagem tem um efeito adverso sobre os bolores superficiais e, de entre as bactérias, actua mais sobre as micrococáceas do que sobre os

lactobacilos. Este facto ocorre não somente pelas micrococáceas serem mais sensíveis a determinados componentes do fumo, mas também porque, ao necessitarem de oxigénio para o seu crescimento, se vão desenvolver preferencialmente nas zonas mais externas do enchido, onde a sua exposição ao fumo é maior (Alvarez, 1994).

A acção do fumo sobre a textura dos produtos é resultante da modificação, por curtimenta ou coagulação das fibras musculares da carne ou da tripa natural, pelo formol e vapores creosotados (Girard e Talon, 1983; Girard, 1991), no caso dos produtos submetidos a processos térmicos mais elevados, como os produtos escaldados. O formaldeído produz reticulação irreversível no colagénio das tripas, influenciando a sua solubilidade e conferindo ao enchido maior resistência à subida de temperatura. Por outro lado, a acção demasiado intensa e brusca do fumo pode fazer estalar a tripa, resultando daí consequências negativas. A desidratação e a acção dos ácidos orgânicos, conduzindo à desnaturação proteica superficial, alteram a textura dos produtos, tornando-os mais firmes, e permitem o fabrico de enchidos sem pele, como as salsichas de Frankfurt (Kramlich *et al.*, 1973). A superfície do produto fumado, devido à desidratação e coagulação das proteínas, juntamente com a deposição dos componentes químicos do fumo, constitui uma barreira física e química à penetração e ao crescimento bacteriano (Urbain, 1976). A acção do calor desenvolvido durante a fumagem pode provocar uma fusão parcial da gordura, que absorve e dissolve com maior facilidade os compostos hidrofóbicos do fumo (Rosário, 1989).

Contudo, para além dos efeitos desejados que se pretendem alcançar com a fumagem, ocorrem outros que são prejudiciais, por diminuirem o valor nutritivo dos alimentos, pela degradação de aminoácidos essenciais e de vitaminas, e por veicularm produtos tóxicos (Möhler, 1980; Girard e Talon, 1983; Girard, 1991). Deste modo, teores elevados de fenóis são tóxicos e ao formaldeído é-lhe atribuída uma acção mutagénica, acreditando-se porém que, em relação a este último, o organismo possua um mecanismo de desintoxicação e eliminação. Com base no exposto, Möhler (1980) informa poderem ser admitidos níveis de formaldeído nos alimentos fumados até aos 50 mg/kg. Todavia, de entre os produtos tóxicos veiculados pelo fumo, merecem maior preocupação os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), destacando-se de entre estes o 3,4-benzopireno pela sua acção carcinogénica. Em Portugal, a alta incidência de cancros do trato gastro-intestinal no distrito da Guarda é atribuída à ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos veiculados por vários alimentos que são submetidos à fumagem. Por outro lado Möhler (1980) e Gray e Pearson (1984) informam que a incidência do cancro do trato digestivo da população da Islândia está relacionada com o consumo de peixe fumado com teores elevados de HPA; situação idêntica ocorre com a população marítima da Letónia (Girard e Talon, 1983; Girard, 1991). Daun (1975) atribui um teor mais elevado de HPA à carne grelhada na brasa; outros autores levantam a hipótese da ingestão de HPA pelo consumo de vegetais contaminados pela poluição atmosférica e pela inalação do fumo do tabaco (Möhler, 1980; Girard e Talon, 1983; Girard, 1991). Contudo, Möhler (1980) refere a existência de sistemas enzimáticos no fígado inactivadores do benzopireno.

5 - Alterações físicas, bioquímicas e microbiológicas associadas à cura dos enchidos

A alargada vida útil dos enchidos curados é devida, principalmente, à inibição dos microrganismos putrefactivos, como consequência da acção conjunta do pH ácido, da reduzida actividade da água (resultante da adição de sais às carnes, da produção durante a maturação de substâncias de baixo peso molecular com actividade osmótica e também devido à desidratação) e, nos casos em que se submetem os produtos à fumagem, aos agentes antimicrobianos presentes no fumo.

Para a grande maioria dos consumidores, a qualidade do produto final é determinada pelo aspecto geral, pela cor, pela ligação e consistência da massa, pelo aroma e sabor. Estas características evoluem no decurso do processo de produção, em especial durante as fases mais adiantadas da cura, e são devidas a um conjunto de alterações físicas, bioquímicas e microbiológicas, em que intervêm enzimas tissulares e microbianas (Burgos, 1981; Incze, 1992).

Com efeito, de uma forma resumida poderemos dizer que durante o processo de fabrico de enchidos ocorre desidratação das massas e, consequentemente, perda de peso que, dependendo do tipo de produto e da tecnologia adoptada, pode variar entre 15% e 50% no final da cura. Ocorre também a redução de nitratos a nitritos e de estes a óxido nitroso, que reage com o grupo heme da mioglobina da carne para dar lugar ao pigmento nitrosomioglobina e posteriormente ao nitrosoheme, pigmento responsável pela cor estável dos enchidos curados. No decurso da cura resulta uma solubilização e gelificação das proteínas miofibriliares e sarcoplasmáticas como consequência do aumento da concentração de sal, o que influencia notavelmente a consistência e a textura do produto final (Demeyer *et al.*, 1987). Desenrolam-se fenómenos proteolíticos que ocasionam a fragmentação parcial das proteínas e conduzem à libertação de compostos azotados não proteicos com interferência no pH, no aroma e no sabor (Demeyer *et al.*, 1979). Desencadeiam-se fenómenos lipolíticos com libertação de ácidos gordos e compostos com grupos carbonilo que influenciam igualmente os valores de pH, o aroma e o sabor (Nielsen e Kemner, 1989; Nieto *et al.*, 1989). Verifica-se também uma redução dos valores de pH para níveis próximos do ponto isoeléctrico das proteínas da carne, como resultado da fermentação microbiana dos açúcares. Inevitavelmente, ocorrem alterações na microbiota inicial das massas, passando a predominar os géneros *Lactobacillus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* como consequência, principalmente, das alterações verificadas na actividade da água (a_w) e no pH.

5.1 - Alterações físicas

A alteração física mais importante que ocorre durante a cura dos enchidos é a desidratação, com a consequente perda de peso. Com efeito, a água migra desde as zonas mais internas até à periferia dos enchidos e evapora-se a partir da superfície. Este facto determina uma perda de peso praticamente idêntica à perda de água, uma vez que outro tipo de perdas, como por exemplo por gotejamento da gordura, é insignificante em processos de elaboração correctos (Nagy *et al.*, 1989). Aproximadamente 2/3 das perdas totais de peso correspondem a perdas de água periférica, proporção que se mantém

praticamente constante durante todo o processo. Contudo, nos primeiros dias de maturação produz-se uma diminuição do conteúdo em água da zona central que se vai acentuando à medida que aumenta a perda total de peso (Stiebing e Rödel, 1988).

Neste contexto, torna-se óbvia a relação entre a redução do teor em água e o decréscimo da a_w e, consequentemente, a influência que este facto tem sobre a população microbiana dos enchidos. Com efeito, no início do fabrico, e como consequência da adição de sais de cura às massas, os valores da a_w situam-se próximos de 0,95-0,96 (Lötzsch e Rödel, 1974; Moreno, 1979; Stiebing e Rödel, 1988; Lago, 1997), atingindo valores finais que rondam os 0,90, valor este considerado como comum para a maioria dos enchidos curados (Burgos, 1981; Pereda e Perales, 2001). Não obstante, em salsichões espanhóis, salames húngaros, italianos e gregos e em paio e chouriços portugueses de porco Alentejano têm sido encontrados valores entre 0,78 e 0,82 (Crespo *et al.*, 1978; Lücke, 1984; Samelis *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 2003). O decréscimo dos valores de a_w da carne fresca (0,97-0,98) para os citados 0,95-0,96 no início do fabrico, devido à adição de sais de cura, tem uma importância crucial. Na realidade, estes valores de a_w vão inibir a multiplicação das bactérias de alteração da carne fresca refrigerada, bactérias aeróbias Gram-negativas, fundamentalmente *Pseudomonas* spp. (Troller, 1987), permitindo o desenvolvimento das bactérias lácticas e das micrococáceas, mais resistentes à descida da a_w .

Parece-nos pertinente referir que o grau de desidratação do enchido e a velocidade com que esta desidratação ocorre vão repercutir-se na retracção do volume e na ligação da massa (Burgos, 1981; Pereda e Perales, 2001) e dependem de um conjunto de factores. A temperatura e humidade relativa ambientais, muito relacionadas entre si, devem permitir um gradiente de humidade entre o interior do enchido e o ar circundante de modo a permitir que se produza a desidratação. Contudo, se esse gradiente for exagerado, ocorrerá uma secagem periférica muito intensa e formar-se-á uma crosta superficial impermeável que impedirá que a desidratação das camadas mais internas prossiga, favorecendo-se deste modo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. A composição da massa é outro dos factores a considerar. Segundo Klettner e Rödel (1980), uma maior quantidade de toucinho na massa proporciona um menor teor de humidade e uma actividade de água inicial mais baixa, pelo que a desidratação é menor. De acordo com os mesmos autores, o calibre e o tamanho das porções de carne e gordura que constituem a massa do enchido vão igualmente condicionar a perda de água. Os enchidos de pequeno calibre desidratam-se com maior rapidez, uma vez que a superfície específica é maior; naqueles em que a carne e a gordura foram sujeitas a uma maior fragmentação, é maior a capacidade de retenção de água sendo, por consequência, a secagem mais lenta (Stiebing e Rödel, 1988). O pH, condicionando a capacidade de retenção de água das proteínas da carne, influí também de forma importante na desidratação dos enchidos. Deste modo, a velocidade de desidratação será tanto maior quanto mais baixo for o pH, até valores de 4,5-5,0 na ausência de sal e de 4,0 na presença das concentrações habitualmente utilizadas (Alvarez, 1994). Contudo, a acção do cloreto de sódio é controversa, na medida em que para alguns autores aumenta a perda de água (Rozier, 1969) enquanto que para outros não exerce nenhuma influência (Palumbo *et al.*, 1976). Em todo o caso, a análise do efeito do cloreto de sódio na capacidade de retenção de água em combinação com o pH sugere que a velocidade de desidratação será maior para valores de pH inferiores a 5,0 e menor para valores de pH mais elevados (Alvarez, 1994).

5. 2 – Alterações bioquímicas

Os principais fenómenos bioquímicos que afectam os componentes dos enchidos crus curados durante a maturação são a fermentação dos hidratos de carbono, a acção dos nitritos, quando usados nas formulações, e as degradações que afectam os lípidos (lipólise e oxidação lipídica) e as proteínas (proteólise).

5.2.1 - Fermentação de carbohidratos e produção de ácido láctico

A actividade bioquímica decorrente da fermentação láctica, levada a cabo mediante a acção sequencial sobre os açúcares por diversas enzimas de origem microbiana, é a actividade metabólica mais importante no fabrico de enchidos fermentados (Carrascosa, 2001).

A fermentação dos carbohidratos é produzida com maior intensidade nos primeiros dias de maturação e deve-se, fundamentalmente, às bactérias lácticas presentes nos enchidos, de forma natural ou adicionadas intencionalmente, originando, principalmente, ácido láctico. A acumulação deste ácido provoca um decréscimo do pH que inibe o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, acelera o processo de desidratação ao diminuir a capacidade de retenção de água das proteínas musculares (o que favorece o desenvolvimento da textura típica), desencadeia reacções enzimáticas (proteolíticas e lipolíticas, que contribuem para o desenvolvimento do aroma e do sabor) e influi na formação da cor e na sua estabilidade (Rubio, 1994; López, 1997; Fernández, 2000; Bover-Cid *et al.*, 2001a,b). Na opinião de Lücke (1998) a contribuição do ácido láctico para o aroma e sabor dos enchidos é ainda mais determinante nos de maturação curta.

Os hidratos de carbono presentes na carne mais os eventualmente adicionados no processo de elaboração servem como fonte de energia para o crescimento das bactérias lácticas que os metabolizam através de duas vias: a homoláctica (de Embden-Meyerhof), que transforma 1 mole de hexose em 2 moles de ácido láctico, e a heteroláctica (via das pentoses fosfato ou de Warburg-Dickens), que a partir de 1 mole de hexose dá lugar a 1 mole de ácido láctico, 1 mole de CO₂ e 1 mole de etanol ou de ácido acético (Fernández, 2000). Segundo DeKeteleare *et al.* (1974), por esta via podem ainda ser produzidas pequenas quantidades de ácidos propiónico e butírico. A presença de ácido pirúvico foi constatada por Pezacki e Szostak (1962). Para além destas duas vias, os açúcares podem ser degradados aerobicamente (pelos micrococos ou, se presentes em taxas elevadas, pelas bactérias Gram-negativas) sempre que exista uma alta concentração de oxigénio nas massas para enchidos, resultando como produtos finais CO₂ e H₂O (DeKeteleare *et al.*, 1974; Demeyer *et al.*, 1986; Lizaso *et al.*, 1999).

Nos enchidos, a microbiota láctica homofermentativa é a predominante pelo que o principal produto resultante da degradação dos açúcares é o ácido láctico (Coppola *et al.*, 2000). No entanto, em certas ocasiões o metabolismo do piruvato pode originar outros compostos que não o lactato. A lactato-desidrogenase (LDH) é uma enzima alostérica que é activada pela concentração de certos metabolitos como a frutose-1,6-difosfato (Thomas, 1976). Quando a concentração de glucose no meio é baixa, diminui o conteúdo intracelular

de frutose-1,6-difosfato e das trioses fosfato, o que resulta numa menor transformação de piruvato em lactato, desviando-se o metabolismo do piruvato para a produção de formato, acetato e etanol (Fordyce *et al.*, 1984). Um efeito semelhante foi descrito quando existe uma deficiência de LDH ou quando existe inibição desta enzima pela acção de ácidos gordos presentes no meio (Anders e Jago, 1970). Em outras ocasiões, a deficiência de NADH (necessário para reduzir o piruvato a lactato) faz com que o metabolismo do piruvato resulte na produção de diacetilo, butanodiol e acetoína (Goupry *et al.*, 2000), originados pelo metabolismo de lactobacilos e micrococáceas (Pyrcz e Pezacki, 1975).

Apesar de serem os lactobacilos homofermentativos os que se empregam no fabrico de enchidos, algumas espécies de lactobacilos são heterofermentativas facultativas (Kandler e Weiss, 1986). Estes microrganismos, para além de possuirem aldolase, necessária para a glicose homoláctica, elaboram fosfocetolase, que decompõe as pentoses e conduz à formação de lactato, acetato e CO₂. Os lactobacilos heterofermentativos facultativos geralmente metabolizam as hexoses pela via homoláctica, no entanto, em certas circunstâncias é activada a via heterofermentativa. Deste modo, algumas espécies do género *Lactobacillus* podem alterar o seu metabolismo de homofermentativo a heterofermentativo, dependendo da quantidade de glucose disponível (Borch *et al.*, 1991).

A lactose é um dissacárido que é adicionado com frequência à massa dos enchidos e os lactobacilos podem introduzi-la no interior das suas células graças às permeases. Uma vez no interior da célula microbiana, a lactose é fragmentada pela β-galactosidase para formar galactose e glucose. No entanto, alguns lactobacilos incorporam lactose e galactose através do sistema fosfoenolpirúvico-fosfotransferase. Mediante este sistema a lactose entra na célula fosforilada e, por acção da β-fosfogalactosidase, hidroliza-se em glucose e galactose-6-fosfato. A glucose é degradada pela via glicolítica e a glucose-6-fosfato segue a via da tagatose-6-fosfato, dando como produtos finais gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato, que se incorpora no processo de glicólise para formar finalmente lactato (Fernández, 2000).

A oxidação do lactato pode ser muito mais activa, tal como ocorre em muitos queijos, na zona superficial dos enchidos, uma vez que aí é frequente a instalação de uma microbiota variada, principalmente bolores e leveduras, que rapidamente metabolizam o lactato em CO₂ e H₂O (Fox *et al.*, 1990). Nestes casos, poderá ocorrer uma diminuição da acidez na superfície, formando-se um gradiente de pH entre a superfície e o centro dos enchidos, o que ocasiona uma difusão do lactato até ao exterior. Este mecanismo poderia explicar, pelo menos parcialmente, a subida de pH que se verifica no final da maturação dos enchidos (Grazia *et al.*, 1986; Lücke, 1986; Ordóñez *et al.*, 1995; Toledo *et al.*, 1997).

Em condições de aerobiose, as bactérias do género *Micrococcus* metabolizam a glucose pela via de Embden-Meyerhof e o piruvato originado ingressa no ciclo de Krebs (Kocur, 1986). Segundo os estudos de DeKeteleare *et al.*, (1974) os micrococos podem contribuir para a oxidação completa dos hidratos de carbono durante os primeiros dias da fase de maturação, resultando como produtos finais CO₂ e H₂O. Por outro lado, a maioria das espécies do género *Staphylococcus*, em anaerobiose, geram ácido láctico como produto principal da fermentação da glucose, enquanto que em condições de aerobiose são o ácido acético e o CO₂ os compostos predominantes (Kloos e Schleifer, 1986). Como consequência do exposto, nos enchidos existem, para além do ácido láctico, pequenas quantidades de ácido acético e mais pequenas ainda dos ácidos fórmico, butírico e propiónico (Halvarson, 1973; DeKeteleare *et al.*, 1974; Hierro *et al.*, 1997), ainda que, provavelmente, estes dois últimos ácidos procedam da lipólise da gordura do enchido e não da fermentação dos hidratos de carbono (Hierro *et al.*, 1997; Selgas *et al.*, 1999). Estes compostos também se podem formar a partir da oxidação dos ácidos gordos de cadeia

longa, principalmente dos polinsaturados (Dainty e Hibbard, 1980; Ordóñez *et al.*, 1989; Berdagué *et al.*, 1993).

Pezacki e Szostak (1962) detectaram também a presença de ácido pirúvico em enchidos, contudo outros autores (Andersen e Tem-Cate, 1965; Fiszer, 1970; Rubio, 1994; López, 1997; Fernández, 2000) defendem que o ácido pirúvico é apenas um intermediário do metabolismo dos hidratos de carbono e raramente se acumula como produto final das fermentações bacterianas. Outros produtos do metabolismo dos hidratos de carbono que se podem encontrar nos enchidos são a acetoína, o diacetilo (Goupy *et al.*, 2000) e o 2,3-butanodiol, resultantes da actividade de lactobacilos e de micrococáceas (Reuter, 1970; Fernández, 2000).

5.2.1.1 - Importância tecnológica da fermentação dos hidratos de carbono

Como resultado da acumulação do ácido láctico formado pela oxidação dos hidratos de carbono é produzido um decréscimo do pH da massa desde níveis iniciais de 5,8 – 6,2 até valores próximos de 5,3, ou mesmo inferiores (Incze, 1992; Lücke, 1998) em enchidos muito ácidos, e 5,5 – 6,0 em enchidos pouco ácidos (López-Bote *et al.*, 1990; Radovanovic *et al.*, 1990). Na opinião de Demeyer *et al.* (1979) estima-se que para produzir um decréscimo de uma unidade de pH são requeridas 2,67 g de ácido láctico por cada 100 g de proteína existente na carne fresca. No final da cura pode produzir-se um aumento do pH como consequência da acumulação de compostos azotados não proteicos, resultantes da actividade proteolítica microbiana e das enzimas da carne, contribuindo também para esta subida o consumo de ácido láctico por parte dos bolores superficiais (Demeyer *et al.*, 1979; Verplaetse *et al.*, 1989).

O decréscimo do pH até valores próximos do ponto isoeléctrico das proteínas miofibriliares e sarcoplasmáticas (5,3), em sinergia com a acção do cloreto de sódio, possibilitam a solubilização destas proteínas (Klement *et al.*, 1973; Demeyer *et al.*, 1987; Pereda e Perales, 2001), que deste modo formam uma malha envolvendo as partículas de gordura e de proteína. Este facto contribui para o aumento da consistência do produto (Klettner e Rödel, 1978; Fernández, 2000). A descida do pH e a alteração da estrutura proteica, reduzem o potencial redox e, com isso, a capacidade de retenção de água. Esta, que antes estava fortemente associada às proteínas, liberta-se e circula livremente pela carne crua. Desta maneira é formada uma estrutura alveolar em que os espaços interiores actuam como capilares. Se se mantém uma humidade relativa do ar ambiente entre 75-80% (valor ligeiramente inferior ao da a_w do produto) cria-se um gradiente de humidade que provoca a saída de água até ao exterior, evitando-se o risco da formação de crostas superficiais (Schiffner *et al.*, 1996). Os enchidos que apresentam valores de pH finais elevados, como o salame (5,6-5,8), necessitam de períodos de maturação mais longos que os enchidos com valores de pH final mais baixos, uma vez que nos primeiros são a perda de água e, consequentemente, a redução da a_w os dois factores que maior influência exercem sobre a textura final do produto. Por essa razão, o grau de secagem dos enchidos de pH mais elevado deverá ser maior, resultando daí produtos mais duros e menos elásticos (Incze, 2000).

São vários os factores intervenientes no decréscimo do pH das massas:

i - A carga microbiana inicial das massas e a sua composição vão condicionar a actividade fermentativa. Os lactobacilos são, universalmente, os microrganismos mais

implicados na fermentação dos açúcares (Burgos, 1981). Contudo, em alguns tipos de enchidos, como os norte americanos, intervêm maioritariamente os pediococos (Liepe, 1985).

ii - Tanto a temperatura como a a_w têm um efeito directo sobre o crescimento microbiano, de tal modo que este é maior quando a temperatura e a a_w são elevadas (Stiebing e Rödel, 1990; Landvogt e Fischer, 1991).

iii - O calibre do enchido e a quantidade de oxigénio retida no seu interior vão determinar, também, o valor do pH das massas. Com efeito, nos enchidos de pequeno calibre a difusão de oxigénio para o interior da massa é favorecida o que, dado o carácter microaerófilo das bactérias lácticas, determina uma redução da actividade fermentativa (Demeyer e Verplaetse, 1985; Demeyer *et al.*, 1987). Este efeito será ainda mais acentuado sempre que a operação de enchimento não se realizar sob vácuo (Fernández, 2000).

iv - O pH inicial da massa é outro dos factores intervenientes. Se aquele parâmetro for inferior a 5,4 a acidificação será excessiva, enquanto que se, pelo contrário, o pH for elevado (igual ou superior a 6,0), a acidificação será deficiente. Ambas as situações são indesejáveis, com interferências na desidratação e na qualidade higio-sanitária do produto. Neste sentido, também é importante considerar que o toucinho exibe um pH superior ao da carne magra, pelo que as massas com teores elevados de gordura apresentam um pH inicial mais elevado e uma acidificação final menos intensa (Frey, 1995).

v - O tipo e a quantidade de hidratos de carbono serão outros factores a considerar. De um modo geral pode dizer-se que açúcares como a glucose, sacarose ou maltose dão lugar a uma maior quantidade de ácido láctico e de forma mais rápida do que se forem usados lactose, xaropes de amido ou dextrinas (Klettner e List, 1980). Por outro lado, se a quantidade inicial de açúcares fermentescíveis nas massas é elevada, as bactérias lácticas diminuem o pH o bastante para inibir outras bactérias. Convirá esclarecer que o teor residual de glucose na carne fresca, na opinião de Dalrymple e Hamm (1975) e de Fischer e Agustini (1977) será insuficiente para que ocorra uma redução significativa do pH pelo que se constitui objectivo atingir um pH inferior a 5,5 devem ser adicionados hidratos de carbono fermentescíveis (Nychas e Arkoudelos, 1990), cuja quantidade e tipo são importantes enquanto condicionadores da velocidade do decréscimo do pH, bem como da composição da microbiota do enchido.

vi - A utilização de acidulantes químicos, como ácidos orgânicos ou glucona- δ -lactona terão, obviamente, repercussões directas sobre o decréscimo do pH das massas. Este tipo de compostos possibilita um decréscimo rápido do pH num curto período de tempo. No entanto, na opinião de Incze (1992) a capacidade de conservação e as propriedades sensoriais dos enchidos acidificados deste modo, apesar de aceitáveis, são piores que as conseguidas com o recurso a culturas de arranque. De realçar ainda o problema do deficiente crescimento das micrococáceas quando a acidificação das massas é muito rápida, o que, consequentemente, resulta em deficiências na cor dos produtos.

vii - Outros ingredientes que integrem a fórmula do enchido podem também ter influência sobre a evolução do pH. Neste sentido, actuam algumas especiarias que têm um efeito estimulante sobre o crescimento da microbiota láctica (Vandenriessche *et al.*, 1980; Farkas *et al.*, 1988), o mesmo acontecendo com a proteína de soja (Demeyer *et al.*, 1987). Pelo contrário, os nitritos podem inibir os processos fermentativos (Zaika *et al.*, 1976; Alley *et al.*, 1992).

5.2.1.2 - Influência da fermentação dos hidratos de carbono sobre o aroma e o sabor dos enchidos

Os açúcares adicionados às massas cárneas actuam sobre o sabor dos enchidos sobretudo pela formação de ácido láctico (Montel *et al.*, 1998), ajudando também a dissimular o sabor salgado (Towsend e Olson, 1994). Com efeito, o ácido láctico, juntamente com as especiarias e o cloreto de sódio, é o principal responsável pelo sabor de um grande número de enchidos (Montel *et al.*, 1998). A acidez é mais marcada nos enchidos produzidos no norte da Europa, comparativamente aos produzidos no Sul (Montel *et al.*, 1998), estando aquela acidez relacionada, principalmente, com o teor dos enchidos em ácido D-láctico (Burcharles *et al.*, 1984; Ramihone *et al.*, 1988). A este propósito Fernandez (2000) informa que os enchidos que se consideram demasiado ácidos apresentam até 4 vezes mais D-lactato que os enchidos considerados normais.

Por outro lado, o ácido acético também pode ser responsável pelo sabor ácido dos enchidos, embora a sua concentração nestes produtos seja muito menor (10 a 20 vezes) do que a do ácido láctico (Dainty e Blom, 1995). Na opinião de Weber (1994) quantidades excessivas deste ácido tornam-se desagradáveis uma vez que tornam o produto adstringente.

Até há bem pouco tempo os compostos voláteis procedentes da fermentação dos hidratos de carbono não eram considerados importantes para o aroma final dos enchidos. Contudo, Bergdagué *et al.* (1993) e Meynier *et al.* (1999) puseram em evidência que, embora não sendo os compostos maioritários (aproximadamente 5% do conjunto de todos os voláteis dos enchidos condimentados com especiarias e 27% em enchidos produzidos sem elas), desenvolvem uma importante função, juntamente com os produtos da oxidação dos lípidos.

Na opinião de Burcharles *et al.* (1984) e de Fernández (2000) o sabor ácido que apresentam alguns enchidos não se correlaciona directamente com as quantidades de lactato e de ácido acético. Contudo, Stahnke (1995) determinou, recorrendo a provas sensoriais, que o ácido acético poderia transmitir um sabor ácido a enchidos do tipo salame. De acordo com Dainty e Blom (1995), os ácidos acético e láctico apresentam limiares de detecção muito baixos, da ordem das ppm. Em todo o caso, o ácido acético não tem como única origem a fermentação dos hidratos de carbono, podendo também proceder da oxidação dos ácidos gordos e do catabolismo da alanina (Montel *et al.*, 1998). Alguns bolores, como *Penicillium aurantiogriseum*, também podem sintetizá-lo (Börjesson *et al.*, 1990).

Na fermentação dos hidratos de carbono também se podem formar pequenas quantidades dos ácidos fórmico, propiónico e butírico. Estes dois últimos proporcionam ao produto um aroma ácido descrito por Stahnke (1994) como "a nós" para o caso do ácido propiónico, e como "a suor de pés" ou "a vómito", para o caso do ácido butírico.

Outros compostos que podem resultar daquela fermentação são acetoina, diacetilo (Stahnke, 1995a, 1999; Goupy *et al.*, 2000), 1,3-butanodiol e 2,3-butanodiol, responsáveis pelo aroma "a manteiga" e "a queijo" que apresentam alguns enchidos (Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1995b). O diacetilo (2,3-butadiona), para além de estar associado ao aroma "a queijo" proporciona aromas doces ao enchido e, segundo Stahnke (1995a), é de grande importância no aroma final. Este composto pode também ser sintetizado pelos bolores e leveduras que crescem na superfície dos enchidos (Jacobsen e Hinrichsen, 1996). Todas estas moléculas apresentam limiares de detecção muito baixos (Dainty e Blom, 1995).

O acetaldeído e o etanol podem originar no produto aromas “a erva” e a “dissolvente orgânico”, respectivamente (Stahnke, 1995b). Finalmente, Meynier *et al.* (1999) descreveram a presença de alguns ésteres (propilacetato, etilpropanoato, etilbutanoato, etil-2-metilbutanoato, etil-3-metilbutanoato e etilhexanoato) que podem provir da fermentação dos hidratos de carbono ou de processos de esterificação de origem microbiana. Os etil-ésteres têm limiares de detecção muito baixos e transmitem aos enchidos aromas florais e frutados, para além de mascararem aromas relacionados com o ranço (Careri *et al.*, 1993; Stahnke, 1994). Alguns bolores e leveduras, como *Penicillium camemberti*, *P. commune*, *P. roqueforti* (Larsen e Frisvad, 1995), *Debaryomyces hansenii* e *Candida utilis* (Olesen e Stahnke, 2000) também são capazes de produzir estes compostos. Em todo o caso, estes ésteres nem sempre estão presentes nos enchidos (Berger *et al.*, 1990; Stahke e Zeuten, 1992, Fernández, 2000), o que pode ser explicado pela pequena capacidade da microbiota para produzir estas substâncias (Stahnke, 1994, 1995a).

5.2.2 - Efeito dos nitratos e nitritos

De entre os aditivos utilizados na transformação das carnes o nitrato de sódio ou potássio e o nitrito de sódio, juntamente com o cloreto de sódio na forma de sais de cura e com outros aditivos como o ácido ascórbico e os glúcidos, assumem um papel determinante como agentes melhorantes da cor, do aroma, do sabor, contribuindo também para o aumento do poder de conservação dos produtos curados (Rosário, 1989).

Hoje em dia, é assumido que a utilidade dos nitratos e nitritos foi descoberta accidentalmente, resultado da sua presença como impurezas do sal empregue na cura das carnes (Towsend e Olson, 1994). A sua acção sobre a cor, o aroma e o sabor dos produtos curados é reconhecida desde 1800. Em 1891 foi demonstrada por Polenski a redução do nitrato a nitrito, segundo aquele autor provocada por bactérias (Hotchkiss e Cassens, 1987). Em 1899 Lehman e Kisskalt demonstraram que a cor rosada das carnes curadas resultava da acção do nitrito e não do nitrato. Haldane, em 1901 assumiu que aquela coloração era consequência da reacção do óxido nítrico com os pigmentos da carne (Cassens *et al.*, 1979; Möhler, 1984; Hotchkiss e Cassens, 1987).

Os principais efeitos bioquímicos dos nitritos sobre os produtos curados são a transformação e a estabilização pigmentar (Eakes *et al.*, 1975; Giddings, 1977; DeMasi *et al.*, 1989; López, 1997), a contribuição para o aroma e sabor (Cross e Ziegler, 1965; Bailey e Swain, 1973; Brown *et al.*, 1974; Rubin e Shahidi, 1988; Stahnke, 1995a; Sanz *et al.*, 1997), o efeito conservador (Hauschild *et al.*, 1982; Pierson e Smooth, 1982; Vösgen, 1993; Wirth, 1993; Sanz *et al.*, 1997) e o efeito antioxidante (Younathan e Watts, 1959; Greene e Price, 1975; Mac Donald *et al.*, 1980).

5.2.2.1 - Transformação e estabilização pigmentar

Um dos aspectos importantes da cura dos enchidos é a modificação e a estabilização dos pigmentos da carne. Neste contexto, o agente determinante nas reacções da transformação pigmentar das carnes é o nitrito. Este pode ser adicionado às carnes ou

resultar da redução bacteriana do nitrato. Os principais microrganismos implicados neste processo são os da família *Micrococcaceae*, produtores de nitrato e nitrito-redutases (Liepe, 1985). No entanto, a actividade nitrato-redutora das micrococáceas pode ocorrer sem que os microrganismos se multipliquem massivamente e vários autores registaram concentrações de micrococáceas na fase de fermentação entre 10^5 - 10^6 u.f.c./g (Selgas et al., 1988; Sanz et al., 1997; Dias, 2000; Patarata, 2002). A multiplicação destes microrganismos e, portanto, o aumento da sua actividade, é favorecida a temperaturas relativamente baixas (22-25°C) e com elevadas concentrações iniciais de cloreto de sódio e é inibida quando os valores de pH são inferiores a 5,0 (Palumbo et al., 1976; Fernández, 2000) ou na presença de concentrações de ácido láctico da ordem de 1% (Burgos, 1981). As condições mais favoráveis para o desenvolvimento daqueles microrganismos correspondem ao início da fermentação dos enchidos, período crucial para o desenvolvimento da cor. Uma vez formados, os nitritos devem continuar a reduzir-se e nesta transformação intervêm agentes redutores químicos, assim como microrganismos; de entre eles, para além das micrococáceas, há autores que indicam também a participação de alguns lactobacilos (Collins-Thompson e Rodríguez-López, 1981). Todavia, estudos realizados com um método asséptico de fabrico de enchidos (Ordóñez et al., 1989) põem em evidência que quando uma cultura microbiana sem a presença de micrococáceas fermenta uma massa de carne, a cor não evolui de forma adequada (Garcia et al., 1992).

Habitualmente, a microbiota natural dos enchidos possui suficiente actividade nitrato-redutora, sempre e quando seja controlada a taxa de produção de ácido láctico (Fernández, 2000). Por esta razão, no fabrico tradicional de muitos enchidos artesanais não são incorporados açúcares às massas, o que conduz a um decréscimo de pH menos acentuado. Os valores de pH alcançados deste modo, facilitam a actividade de microrganismos nitrato-redutores. Contudo, correm-se os riscos sanitários associados a meios com valores de pH relativamente elevados (Braathen, 1998). Quando são utilizadas culturas de arranque na produção de enchidos torna-se necessário encontrar uma solução de compromisso por forma a que as condições ambientais, sobretudo a temperatura, sejam adequadas à multiplicação precoce das micrococáceas sem que se desenvolva rapidamente a microbiota láctica. Deste modo, obtém-se uma evolução rápida da cor e uma acidificação lenta e gradual.

Abordando agora a faceta bioquímica da transformação pigmentar situemo-nos no papel do nitrito, adicionado às massas sob a forma de sal nitritado ou nitratado, neste último caso resultando o nitrito da redução do nitrato pela acção bacteriana, transformando-se aquele em ácido nitroso (HNO_2) em meio ácido. Este reage em parte com aminoácidos, lípidos, compostos fenólicos, compostos sulfurados e com outros compostos existentes na carne, sendo estas reacções responsáveis pela perda de parte do nitrito adicionado às massas (Cassens et al., 1979). Deste modo, o composto que efectivamente contribui para as reacções de pigmentação é o ácido nitroso (HNO_2), designado, tal como o anião NO_2^- , genericamente por nitrito (Sebranek e Fox, 1985). Dependendo das condições do meio, principalmente dos valores de pH e do potencial redox, o ácido nitroso pode dar origem a vários compostos. O anidrido do ácido nitroso, ou trióxido de diazoto (N_2O_3) é um dos principais que por esta via são formados na carne (Möhler, 1984; Sebranek e Fox, 1985). No entanto, devido à instabilidade do ácido nitroso, é possível obter óxido nítrico (NO) numa reacção que ocorre em meio fortemente ácido (Bard e Townsend, 1976; Möhler, 1984; Sebranek e Fox, 1985; Demeyer et al., 1987; Nychas e Arkoudelos, 1990). Na carne, que apresenta valores de pH normalmente compreendidos entre 5,0 e 6,0, aquela reacção ocorre lentamente (Rosário, 1989). Para vários autores (Grau, 1965; Sebranek e Fox, 1985; Nychas e Arcoudelos, 1990), a formação do óxido nítrico, tão necessário à posterior modificação pigmentar, ocorrerá a partir do trióxido de diazoto. Esta reacção que continua a

ser relativamente lenta na carne, com a presença de redutores endógenos (coenzimas redutores, grupos sulfidrilo, hidroquinonas) ou exógenos (ácido ascórbico ou isoascorbato), pode representar a maior fonte de óxido nítrico. Este ir-se-á combinar com os pigmentos heme da carne (hemoglobina e mioglobina) constituindo, após uma série de transformações, os pigmentos da carne curada, nitrosilmioglobina - rosa vivo - e nitrosil-hemocromogénio. Este último é o pigmento rosa estável das carnes curadas, uma vez que o óxido nítrico é menos dissociável do grupo heme neste composto do que na nitrosilmioglobina (Bard e Townsend, 1976; Demeyer *et al.*, 1987; Lücke, 1998).

Quando se junta sal nitritado à carne a sua cor vermelha clara (promovida pelos pigmentos mioglobina e oximioglobina) vai mudando lentamente para castanho claro, sendo esta mudança mais rápida com adição de água ou elevação da temperatura e mais lenta com carne recém-obtida. A cor castanha é devida aos metacompostos da mioglobina ou da hemoglobina, dependendo a sua intensidade do teor em pigmentos da carne (Möhler, 1982). Segundo este autor, a primeira etapa da acção do nitrito sobre o pigmento muscular consiste numa oxidação. Algum tempo após a adição do nitrito, mais rapidamente se em presença de aditivos como o ácido ascórbico, a gluconona- δ -lactona, ou por acção do aquecimento, a cor castanha do pigmento muscular oxidado desaparece, formando-se cor entre rosa e vermelho claro, característica dos produtos curados (Möhler, 1982). Ainda de acordo com o mesmo autor, ao aquecer a carne sem adição de nitrito, opera-se a mudança da cor vermelha para castanha devido à oxidação do ferro bivalente a trivalente. Quando na presença de nitrito, o ferro trivalente é reduzido à forma bivalente pelo aquecimento ou pela acção de agentes redutores. Lawrie (1977) refere que o óxido nítrico pode reagir directamente com a metamioglobina formando um complexo que pode ser seguidamente reduzido a nitrosilmioglobina.

De acordo com Burgos (1981), a estabilidade dos pigmentos dos enchidos é tanto menor quanto mais abaixo de 6,0 for o seu pH. A este propósito Kuchling (1965) assinala que com valores de pH e potenciais redox baixos o nitrosil-hemocromogénio pode ser oxidado e transformado em colemioglobina por acção de peróxidos, procedentes tanto da oxidação das gorduras como da actividade oxidativa das bactérias lácticas sobre o lactato (Nychas e Arkoudelos, 1990), adquirindo então o produto uma coloração acinzentada ou castanho esverdeado, quando em presença de oxigénio (Burgos, 1981; Bacus, 1986; Lücke, 1998). Destes conceitos se depreende a importância da utilização de gorduras frescas e firmes para formar as massas e extrair das mesmas a maior quantidade possível de oxigénio durante a operação de enchimento (Lücke, 1998).

Se forem utilizados apenas nitratos na cura das carnes, o processo de desenvolvimento da cor será mais lento, na medida em que estes terão de ser previamente reduzidos a nitritos. Não obstante, considerando que nos enchidos crus curados existe a possibilidade da formação de nitrosaminas, de comprovado poder carcinogénico (Magee, 1996), por reacções que ocorrem entre os nitritos e aminas secundárias e terciárias, nos últimos anos tem-se tentado reduzir o mais possível a quantidade destes sais nas massas. Neste contexto, a utilização, na cura das carnes, de microrganismos redutores de nitratos apresenta-se vantajosa uma vez que as suas vias metabólicas determinam concentrações residuais de nitratos e nitritos escassas e, por conseguinte, uma menor formação de nitrosaminas (Bover-Cid *et al.*, 2001; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2003).

Com o propósito de reduzir os riscos inerentes à formação de nitrosaminas, alguns autores (Shahidi, 1991; O'Boyle *et al.*, 1992; Shahidi e Pegg, 1992) estudaram processos de cura de carnes sem usar nitratos ou nitritos. Nestes processos, geralmente, o pigmento cárneo pré-formado era adicionado isoladamente ou combinado com antioxidantes, quelantes e agentes antimicrobianos. De um modo geral, estes trabalhos foram desenvolvidos em produtos submetidos a tratamentos térmicos, contudo O'Boyle *et al.*

(1992) obtiveram bons resultados em presuntos curados utilizando dinitrosil ferrohemocromo.

5.2.2.2 - Produção de aroma e sabor

O aroma característico dos produtos curados tem constituido argumento para a utilização dos nitritos na cura das carnes, contudo o conhecimento sobre as substâncias responsáveis por estes fenómenos ainda se encontra pouco definido.

Existem vários trabalhos que, recorrendo a provas sensoriais, demonstram a preferência dos consumidores por produtos curados com nitritos relativamente aos não curados com aqueles sais, desconhecendo-se todavia a razão dessa preferência (Simon *et al.*, 1973; Bousset e Fournaud, 1976; Gray e Pearson, 1984; Sanz *et al.*, 1997). Alguns autores (Fooladi *et al.*, 1979; Igene *et al.*, 1979b) atribuem a melhoria do aroma e do sabor ao efeito antioxidante que os nitritos têm sobre os lípidos. Outros autores (Cho e Bratzler, 1970; Toth, 1983; Gray e Pearson, 1984) mencionam que os nitritos poderiam interagir com outros compostos tissulares para originar o aroma e o sabor característicos, e atribuem esse efeito à reacção dos nitritos com distintos aminoácidos, como a lisina, a tirosina ou o triptofano. Por outro lado, o aroma e o sabor dos produtos curados com nitritos variam com a concentração destes, desconhecendo-se a concentração óptima para produzir esse efeito (Bousset e Fournaud, 1976; Gray e Pearson, 1984), na medida em que ele depende de factores como o tipo de produto, tipo de carne, conteúdo de cloreto de sódio, especiarias utilizadas, intensidade da fumagem, entre outros (Fernández, 2000).

O efeito antioxidante dos nitritos tem uma importante influência na produção do aroma e sabor das carnes curadas. Com efeito, carnes salgadas unicamente com cloreto de sódio ou com sal e nitritos apresentam aromas e sabores diferentes, indicando que a nitrosação tem implicações nas características sensoriais. O sal, ao actuar como pró-oxidante, pode acelerar a autoxidação dos lípidos, enquanto o nitrito, como antioxidante, pode também influenciar o aroma e o sabor (Sebranek e Fox, 1985).

A inibição da oxidação lipídica realizada pelos nitritos parece exercer-se por diversas vias. Westemberg (1973) sugeriu que os nitritos poderiam actuar como antioxidantes ao converter o hemocromogénio férrico, composto cataliticamente activo, no correspondente óxido nítrico hemocromogénio ferroso, muito menos activo. Segundo esta hipótese, a presença de nitrito impediria a oxidação dos lípidos, pelo que não se originariam carbonilos, os responsáveis por aromas e sabores indesejáveis e característicos das carnes curadas sem nitrito. No entanto, trabalhos posteriores (Gray e Pearson, 1987) indicam que este fenómeno deve ser mais complexo. Aqueles autores sugerem que a formação de um complexo entre os pigmentos heme e o nitrito evitaria a libertação de ferro na forma ferrosa que tem efeito catalítico sobre a oxidação lipídica. Outras possíveis vias seriam a formação da nitrosilmioglobina, que tem propriedades antioxidantas: pelo nitrosil-hemocromogénio, bloqueador da actividade catalítica do ferro (Kanner *et al.*, 1980; Love, 1983; Igene *et al.*, 1985; Morrissey e Tichivangana, 1985), pela estabilização dos lípidos insaturados no interior das membranas (Pearson *et al.*, 1977; Igene *et al.*, 1985), pela complexação do ferro não hémico na forma de quelatos (Mac Donald *et al.*, 1980) e, provavelmente, pela formação de complexos estáveis do nitrito com o cobre e com o cobalto, inibidores da actividade catalítica (Morrissey e Tichivangana, 1985).

Na opinião de Rubin e Shahidi (1988) é provável que a influência dos nitritos sobre os compostos voláteis dos enchidos esteja directamente relacionada com a menor oxidação dos lípidos, sendo este fenómeno mais evidente quando as carnes são submetidas a tratamentos térmicos. Nestes casos a influência dos nitritos parece ser um dos principais mecanismos para o desenvolvimento do aroma e do sabor. Stahnke (1995a), em trabalhos realizados com enchidos crus curados, descreveu a presença de diferentes compostos azotados, como nitrilos e nitroalcanos, sem que tivesse referido a sua contribuição para o aroma e sabor finais do produto. No entanto, o mesmo autor descreve o aroma do nitrohexano (composto disponível no comércio) como “a amêndoa” e refere que os nitrilos formados podem hidrolisar-se para dar lugar às amidas correspondentes, que possuem um aroma forte descrito como a “bolor”, a “jaula de macaco” e a “pelo de cão molhado” (Stahnke, 1994). Neste último trabalho o autor encontrou relação entre a quantidade de nitrato adicionada e o aumento dos teores de alguns compostos provenientes da oxidação dos lípidos, como o butanal, pentanal, hexanal (que conferem ao produto um aroma a “ranço”) e decanal (que confere aroma a “citrino”) e atribuiu estes resultados ao elevado poder oxidante do nitrato em meio ácido. Trabalhando com modelos assépticos, Stahnke (1999b) descreve o aumento de determinados compostos voláteis pela acção do nitrato, como o caso de alguns compostos aromáticos (benzaldeído, acetofenona e fenol), nitrilos (benzonitrilo), nitrometano, ácidos com cadeias laterais com grupos metilo e alcoóis, e observa a diminuição dos teores de compostos sulfurados.

Para finalizar este tema, citamos os trabalhos referidos por Gray e Pearson (1987), sobre fiambre e presunto, que demonstram que o sal desempenha um papel muito importante nas curas longas, podendo, neste caso, os níveis de nitrato e nitrito ser substancialmente reduzidos, sem efeitos negativos para o aroma e sabor. Nas curas rápidas, o nitrito revelou-se importante, assim como o sal, para o sabor do produto.

5.2.2.3 - Efeito antimicrobiano

O carácter conservante ou antimicrobiano do nitrito é conhecido desde longa data e constituiu um importante contributo para a salubridade das carnes salgadas. Esta acção é exercida sobre a microbiota responsável pela alteração dos produtos, designadamente a proteolítica e a causadora de toxinfecções alimentares (Bousset e Fournaud, 1976; Jouve et al., 1980; Gibson e Roberts, 1986; Leistner, 1986a; Wirth, 1993). Porém, existem microrganismos que são resistentes à acção do nitrito, destacando-se neste grupo as bactérias produtoras de ácido láctico (Jouve et al., 1980; Leistner, 1986a; Carrascosa, 1989; Abuja, 1993). Esta acção traduz-se num efeito selectivo sobre os agentes microbianos com interesse tecnológico (Rosário, 1989). O nitrato possui acção antibacteriana indirecta na medida em que para tal carece de prévia redução a nitrito, realizada por enterobactérias, micrococos, estafilococos, pseudomonas, vibriões, entre outros (Bousset e Fournaud, 1976). Estudos realizados por Leistner (1986a) demonstraram que o nitrato pode estimular o crescimento de *Salmonella* em enchidos fermentados, no entanto, concentrações de nitrito de 146 ppm são inibitórias para aquele género. A acção do nitrito na prevenção da ocorrência de toxinfecções alimentares, nomeadamente a provocada por *Clostridium botulinum*, constitui a mais forte razão da utilização do nitrito nas carnes (Rosário, 1989). Buchanan e Solberg (1972) informaram que a presença de nitrito em combinação com valores de pH ácidos (6,3) e com baixas tensões de oxigénio favorecem a inibição de

Staphylococcus aureus. No entanto, em aerobiose este microrganismo não foi inibido com concentrações de nitrito de 2000 ppm.

Nordin *et al.* (1975) estudaram o efeito do nitrito sobre microrganismos anaeróbios putrefactivos, considerando diferentes valores de pH e concentrações em cloreto de sódio. Concluiram que o decréscimo do pH e o aumento da concentração em sal têm um efeito aditivo.

Alguns autores consideram haver a opinião generalizada de que as concentrações habituais de nitrato e de nitrito usadas na cura das carnes são fracos inibidores do crescimento microbiano (I.C.M.S.F., 1983; Leistner, 1986c). Por esta razão é aceite que o papel do nitrito como agente antimicrobiano nos produtos cárneos somente é efectivo quando em combinação com outros agentes e factores inibidores: sal, secagem, pH, processos térmicos (Roberts, 1975; I.C.M.S.F., 1983; Briozzo *et al.*, 1986; Vösgen, 1993).

5.2.3 - Lipólise

Os lípidos, juntamente com a carne, constituem os componentes maioritários nos enchidos crus curados e são precursores de muitas substâncias aromáticas mediante fenómenos hidrolíticos e oxidativos que ocorrem durante o processo de maturação e que incidem directamente na qualidade organoléptica destes produtos (Cantoni *et al.*, 1966; Demeyer *et al.*, 1974; Melgar *et al.*, 1990; Ordoñez *et al.*, 1999). As enzimas microbianas e endógenas da carne, associadas às condições ambientais, são os factores desencadeadores daquelas alterações (Coretti, 1965; Cantoni *et al.*, 1967ab; Melgar *et al.*, 1990), sendo o período em que ocorre a fermentação um dos mais decisivos (Rozier, 1969; Mendoza *et al.*, 1983; Fernández, 2000).

A composição em ácidos gordos da massa cárnea inicial, em especial a relação entre ácidos gordos saturados e insaturados, desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do aroma e do sabor dos enchidos. A gordura intramuscular dos porcos de raças precoces, os mais industrializados, é constituída basicamente por triacilglicéridos (62-80%) e fosfolípidos (16-34%), enquanto o toucinho é constituído quase na totalidade por triacilglicéridos (Alvarez, 1994; López, 1997; Fernández, 2000). Na opinião dos mesmos autores, tanto no caso dos fosfolípidos como no dos triglicéridos, 40% dos ácidos gordos são saturados (representando o ácido esteárico a terça parte destes), 50% são monoinsaturados (sendo este grupo constituído fundamentalmente por ácido oleico) e 10% são polinsaturados. Cerca de 25% dos ácidos gordos dos fosfolípidos possuem 2 a 3 duplas ligações e 19%, aproximadamente, têm 4 ou mais duplas ligações. Os ácidos gordos polinsaturados que fazem parte dos triglicéridos (fundamentalmente ácido linoleico), representam 3 - 4% do total de ácidos gordos (Fernández, 2000).

A composição dos lípidos do porco da raça Alentejana já foi apresentada no capítulo 2.

5.2.3.1 - Fenómenos hidrolíticos

Os processos hidrolíticos implicam, principalmente, a rotura da ligação éster dos triacilglicéridos que constituem a matéria gorda dos enchidos por acção de lipases, com a consequente acumulação de ácidos gordos livres, diacilglicéridos, monoacilglicéridos e glicerol.

Os ácidos gordos libertados são importantes para o aroma e sabor dos enchidos, tanto pela sua acção directa como por serem precursores de outras substâncias, principalmente as resultantes dos processos de autoxidação. Destes últimos processos obtém-se compostos aromáticos e sápidos, como é o caso das substâncias com grupos carbonilo (Selke *et al.*, 1980; Morrissey *et al.*, 1998). No entanto, os ácidos gordos também podem ser libertados a partir dos fosfolípidos das membranas mediante a actividade das fosfolipases presentes nas mitocondrias e nos lisossomas das células musculares (Currie e Wolfe, 1977; Cheah *et al.*, 1986; Chizzolini *et al.*, 1998). Contudo, o contributo dos fosfolípidos para a acumulação de ácidos gordos livres nos enchidos é menor que o dos triacilglicéridos (Demeyer *et al.*, 1974; Rubio, 1994).

As lipases que actuam nos enchidos são caracterizadas, na sua maior parte, pela sua especificidade pelas posições de esterificação externas da molécula de triacilglicérido, isto é, as posições sn-1 e sn-3. A acumulação de diacilglicéridos juntamente com ácidos gordos livres sugere que uma das referidas posições é preferencialmente atacada em relação à outra (Fernández, 2000). É sabido que os triacilglicéridos da gordura de porco mostram uma distribuição característica dos ácidos gordos, tal como se referiu no capítulo 2. Neste contexto, a maior parte do ácido esteárico (cerca de 60%) encontra-se na posição sn-1 do glicerol, o ácido palmítico está esterificado na sua maior parte (60 – 80%) na posição sn-2 e cerca de 50 – 60% dos ácidos octadecenoicos (C18:0, C18:1, C18:2, C18:3) encontra-se na posição sn-3 (Fernández, 2000). Deste modo, o grau mais intenso de lipólise nos enchidos deveria observar-se para os ácidos esteárico e octadecenoicos.

Cerise *et al.* (1973) e López (1997) opinam que a lipólise se inicia durante o período de fermentação. No decurso da cura, a taxa de ácidos gordos livres aumenta (Lu e Townsend, 1973), sobretudo nas zonas mais externas, principalmente em enchidos com bolores superficiais e em etapas tardias da cura (López, 1997). É produzida uma maior libertação de ácidos gordos insaturados, como o oleico (35 – 55%) e linoleico (6 – 18%), relativamente aos saturados, como palmítico (18 – 30%) e esteárico (8 -12%) (Cerise *et al.*, 1973; Demeyer *et al.*, 1974; Melgar *et al.*, 1990). Demeyer *et al.* (1974) indicaram que a velocidade de libertação dos ácidos gordos cumpria a seguinte ordem: linoleico > oleico > esteárico > palmítico. Por outro lado, Hierro *et al.* (1997) observaram a seguinte sequência: oleico > palmítico > esteárico > linoleico. Resultados semelhantes foram descritos por Domínguez e Zumalacárregui (1991), Astiasarán *et al.* (1993) e Beriain *et al.* (1993) em diferentes tipos de enchidos curados. Em todo o caso, a quantidade gerada de ácidos gordos livres não parece relacionar-se directamente com a duração do período de cura, estando mais relacionada com o tipo de microbiota que se desenvolve no enchido durante o período de fermentação e o início da secagem (primeira etapa da fase de cura) (López, 1997).

Ainda que a lipólise tenha uma contribuição importante sobre o aroma e sabor dos enchidos, não se conhecem bem as possíveis consequências sensoriais resultantes da acumulação de ácidos gordos, já que os ácidos maioritários, oleico e linoleico, carecem de aroma (López, 1997). No entanto, os ácidos gordos de baixo peso molecular, que também podem ser libertos por hidrólise, têm um aroma muito intenso (López, 1997; Chizzolini *et al.*, 1998).

Alguns autores (Cantoni *et al.*, 1967c; Palumbo e Smith, 1977; Paleari-Bianchi *et al.*, 1985; Nielsen e Kemner, 1989; Nieto *et al.*, 1989; Papon e Talon, 1989; Demeyer *et al.*, 1992) indicam que as alterações hidrolíticas na gordura dos enchidos são devidas, principalmente, à acção das lipases microbianas. Porém, no início da fermentação, a gordura pode ser degradada pela actividade das lipases endógenas (Dobbertin *et al.*, 1975; Lücke, 1984; Ferrer e Arboix, 1986), incidindo sobre a sua actividade factores como a concentração salina ou a temperatura (Motilva *et al.*, 1993). No entanto, García *et al.* (1992) observaram em enchidos experimentais produzidos com massas assépticas que a libertação de ácidos gordos foi semelhante, tanto em lotes inoculados anteriormente com lactobacilos e micrococos como em lotes não inoculados. A este propósito Montel *et al.* (1993) referem que as lipases endógenas da carne mantêm um elevado nível de actividade ao longo de todo o processo de maturação dos enchidos. Mais recentemente, Hierro *et al.* (1997) e Toldrá e Flores (1998) vêm defender que a lipólise é fundamentalmente devida a enzimas endógenas, sobretudo nas primeiras fases da cura.

A lipólise dos enchidos conduz a uma acumulação significativa de ácidos gordos livres, sem que sejam notados sinais de ranço hidrolítico (Cavoski *et al.*, 1988). No final do processo de fabrico dos enchidos podem-se alcançar taxas de ácidos gordos livres que oscilam entre 1 e 7%, dependendo do produto. Deste modo, podem encontrar-se níveis elevados de ácidos gordos tanto em enchidos muito secos, obtidos através de períodos de cura prolongados (Ferrer e Arboix, 1986), como em produtos de maturação mais curta (Fernández, 2000).

5.2.3.1.1 - Lipólise endógena

Os ácidos gordos desempenham um papel de extrema importância nos animais superiores como fonte de energia, uma vez que estes podem ser armazenados nas células em grandes quantidades, sob a forma de triacilglicéridos. Por esta razão, os tecidos muscular e adiposo dos mamíferos contêm várias enzimas que intervêm no metabolismo lipídico (Molly *et al.*, 1997; Flores *et al.*, 1998).

Ainda que a hidrólise dos lípidos, nos enchidos, se atribua fundamentalmente à actividade das lipases microbianas (Palumbo e Smith, 1977; Paleari-Bianchi *et al.*, 1985; Papon e Talon, 1988; Demeyer *et al.*, 1992) há autores que defendem que pode haver actividade das lipases endógenas, tanto nas primeiras fases do processo de cura (García *et al.*, 1992) como em fases mais adiantadas (Montel *et al.*, 1993). No entanto, as condições ambientais em que decorre a cura podem limitar a actividade das lipases tissulares passando a ser bastante mais relevante o papel das lipases microbianas (López, 1997).

A informação disponível sobre o tema indica que a actividade das enzimas endógenas é máxima nos primeiros estádios do processo de maturação do enchido (Ferrer e Arboix, 1986; Hierro *et al.*, 1997; López, 1997; Fernández, 2000). García *et al.* (1992) observaram um conteúdo semelhante em ácidos gordos em enchidos fabricados assepticamente e em outros inoculados com lactobacilos, com micrococos e com uma mistura dos dois. Sugeriram estes autores que a libertação de ácidos gordos poderia dever-se, pelo menos em parte, às lipases endógenas da carne. Montel *et al.* (1993), para conhecer o efeito de diferentes culturas de arranque nos processos bioquímicos dos enchidos fabricaram distintos lotes, inoculados e sem inocular. Ao estudar a lipólise, comprovaram que os enchidos inoculados mostravam ao longo da maturação níveis de ácidos gordos

ligeiramente inferiores aos dos lotes não inoculados, pelo que atribuíram um papel mais activo às lipases endógenas. Hierro *et al.* (1997) fabricaram enchidos assépticos e outros inoculados com lactobacilos e/ou micrococos para determinar a influência das lipases endógenas e concluiram que mais de 60% dos ácidos gordos libertados procediam da acção destas enzimas. Ainda no âmbito deste último trabalho, os autores informam que nos enchidos assépticos ocorria uma maior libertação dos ácidos oleico e linoleico do que nos lotes inoculados com culturas de arranque. Kenneally *et al.* (1998) fabricaram lotes de enchidos com diferentes culturas de arranque, utilizando como testemunha um lote que continha glucona- δ -lactona e vários antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina) para evitar o crescimento de microrganismos. Os resultados mostraram não haver diferenças significativas para os níveis de ácidos gordos livres entre os lotes fabricados com e sem culturas de arranque, pelo que concluiram também que a lipólise era devida, principalmente, a enzimas endógenas.

5.2.3.1.2 - Lipólise exógena

As micrococáceas são considerados os principais microrganismos responsáveis pela degradação dos lípidos nos enchidos (Cantoni *et al.*, 1967b; Demeyer *et al.*, 1974; Selgas *et al.*, 1986; Lücke e Hechelman, 1987; Selgas *et al.*, 1988; Talon *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1992; Montel *et al.*, 1993; Montel *et al.*, 1998; Garcia-Varona *et al.*, 2000). A sua actividade parece centrar-se nos triglicéridos com ácidos gordos de cadeia longa. Aqueles microrganismos são produtores de lipases extracelulares que permanecem no meio mesmo depois de desaparecerem os microrganismos que lhes deram origem (Selgas *et al.*, 1986; Selgas *et al.*, 1988; Stahnke, 1995a; Zanardi *et al.*, 2004).

As estirpes de micrococos que têm sido isoladas de enchidos curados apresentam actividade lipolítica muito variada. Selgas *et al.* (1993) estudaram a actividade lipolítica *in vitro*, tanto extracelular como intracelular, de seis estirpes de micrococos isoladas de enchidos espanhóis e apenas três delas se revelaram lipolíticas. De um modo geral, a actividade lipolítica extracelular foi superior à intracelular. Este facto é importante se considerarmos que, nos enchidos, a população de micrococos diminui progressivamente a partir dos 15-20 dias de cura (Palumbo *et al.*, 1976; Selgas *et al.*, 1988; Alvarez, 1994; Samelis *et al.*, 1998) e, por conseguinte, as enzimas extracelulares permanecem no meio podendo catalizar a hidrólise dos triacilglicéridos com ácidos gordos de cadeia longa, até 16-18 átomos de carbono (Selgas *et al.*, 1986; Alvarez, 1994).

Outros trabalhos (Talon *et al.*, 1992) realizados com meios enriquecidos em substratos gordos indicaram que *Micrococcus varians* (actualmente designado por *Kocuria varians*), espécie utilizada como cultura de arranque (Jessen, 1998), degradava a trioleína e a gordura de porco. Contudo, quando este microrganismo era sujeito a um período de incubação longo (30 dias) somente produzia lipases quando submetido a agitação. Como consequência, os autores concluíram que este microrganismo não participava activamente no processo de lipólise que ocorre durante a cura dos enchidos.

Coppola *et al.* (1997) isolaram 58 estirpes de *Micrococcus* de enchidos crus curados italianos e determinaram a sua actividade lipolítica *in vitro*. Assinalaram que a referida actividade dependia do substrato utilizado para a realização da prova. Deste modo, 41% dos micrococos isolados hidrolizou gordura de porco, enquanto que apenas 2% foi capaz de hidrolisar o tween 80 e nenhum foi capaz de hidrolisar a tributirina.

No que respeita ao género *Staphylococcus*, parece ser menos evidente a sua actividade lipolítica, comparativamente ao género *Micrococcus*, contudo alguns daqueles microrganismos (*S. xylosus*, *S. carnosus*) hidrolizam perfeitamente os triacilglicéridos com ácidos gordos de cadeia curta (Nielsen e Kemner, 1989; Nieto et al., 1989). Talon et al. (1992) estudaram a actividade lipolítica *in vitro* de diversas espécies microbianas, entre elas *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. carnosus*; microrganismos que habitualmente integram culturas de arranque em enchidos franceses. Observaram uma intensa actividade lipolítica para os dois primeiros microrganismos, superior em *S. warneri*, hidrolisando a tributirina, a trioleína e a gordura de porco, pelo que poderiam estar relacionados com a libertação de ácidos gordos durante a cura. Esta actividade lipolítica foi contrastada por Montel et al. (1993), que produziram enchidos inoculados com aquelas duas espécies microbianas. Neste caso, ao contrário do que sucedeu nos trabalhos anteriores, *S. carnosus* foi a única das três espécies a apresentar actividade lipolítica. Ainda no âmbito destes últimos trabalhos, outra espécie, *S. xylosus*, revelou-se lipolítica frente à tributirina, no entanto a sua actividade foi débil frente à trioleína e à gordura de porco. Hugas e Roca (1997) isolaram 10 estirpes de *S. xylosus* a partir de enchidos catalães. De entre eles apenas dois manifestaram actividade lipolítica e, por essa razão, foram seleccionados como culturas de arranque. Coppola et al. (1997) isolaram 80 estirpes do género *Staphylococcus* de enchidos crus curados italianos e destes apenas 16% foram capazes de hidrolizar gordura de porco e nenhuma foi capaz de hidrolizar o tween 80 ou a trioleína. Hierro et al. (1997) demonstraram que a actividade lipolítica dos estafilococos em enchidos vai sendo inibida pelo aumento da acidez provocada pelo desenvolvimento dos lactobacilos.

A capacidade lipolítica das bactérias lácticas, inicialmente, foi estudada em lactobacilos isolados de produtos lácteos (Stadhouders e Veringa, 1973; Stadhouders, 1974), tendo sido provada a capacidade daqueles microrganismos para a hidrólise de triacilglicéridos com ácidos gordos de cadeia longa. Resultados concordantes foram obtidos por Sanz et al. (1988), que utilizaram lactobacilos isolados de enchidos espanhóis. Na opinião destes autores as lipases extracelulares hidrolizam os mono, di e triacilglicéridos com ácidos gordos de cadeia curta, enquanto as lipases intracelulares são pouco activas frente aos triacilglicéridos. A máxima actividade lipolítica ocorreu frente à tributirina e esta actividade ia diminuindo à medida que aumentava o comprimento da cadeia dos ácidos gordos. Estes resultados foram corroborados por Kröckel (1995). Embora Sanz et al. (1988) tenham detectado uma evidente acção lipolítica extracelular, Papon e Talon (1988), utilizando estirpes de diferentes espécies de lactobacilos, comprovaram que a actividade lipolítica está associada à célula, sem que tenha sido possível detectar esta actividade de modo significativo nos sobrenadantes do meio de cultura. Num estudo posterior realizado com *Lactobacillus curvatus*, Papon e Talon (1989) concentraram as lipases numa fracção obtida após ruptura celular por ultrasons, seguida de centrifugação a 3000 G (fracção solúvel da célula) e não a partir da membrana nem da parede celular, como chegaram a equacionar.

No entanto, Nordal e Slinde (1980) não observaram um comportamento lipolítico apreciável em bactérias lácticas que integraram culturas de arranque usadas no fabrico de salame. Samelis e Metaxopoulos (1997) a partir de enchidos curados gregos isolaram 21 estirpes de lactobacilos, todas elas capazes de hidrolisar a tributirina mas nenhuma delas foi capaz de hidrolisar diacilglicéridos ou triacilglicéridos esterificados com ácidos gordos com mais de 16 átomos de carbono nem de hidrolisar a gordura de porco. Com base nos resultados obtidos, aqueles autores concluíram que aquelas estirpes, apesar de produzirem lipases extracelulares, não desempenham um papel relevante na lipólises de enchidos curados. Outros autores (Coppola et al., 1998) isolaram 183 estirpes de bactérias lácticas

de enchidos italianos crus e curados, nenhuma delas apresentou actividade lipolítica na presença da gordura de porco.

Também foi detectada actividade lipolítica em bolores e leveduras isolados de enchidos e de presunto curado (Kilara, 1985; Molina *et al.*, 1991; Elias, 1993). *Penicillium* e *Aspergillus* (Eitenmiller *et al.*, 1970; El-Gazzar e Marth, 1986; Alhir *et al.*, 1990; Trigueros *et al.*, 1995) e *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Debaryomyces* (Larpent-Gourgaud *et al.*, 1993; Boissonnet *et al.*, 1994) são alguns dos géneros relacionados com esta actividade e tem-se postulado sobre a influência daqueles microrganismos sobre o aroma e o sabor de enchidos e presuntos (Kilara, 1985), apesar da sua localização superficial.

Trigueros *et al.* (1995) isolaram de enchidos crus espanhóis 9 estirpes de *Penicillium* sp. e uma de *Mucor* sp. e determinaram a sua actividade lipolítica *in vitro*. Duas das estirpes de *Penicillium* sp. e a estirpe de *Mucor* sp. mostraram forte actividade lipolítica, especialmente frente a β-naftilésteres de ácidos gordos de cadeia curta. Posteriormente, todas aquelas 10 estirpes foram inoculadas na superfície de salsichão curado e aí apenas outras duas estirpes de *Penicillium* sp. evidenciaram actividade lipolítica (Selgas *et al.*, 1999). Provas sensoriais realizadas ao cabo de 35 dias de maturação mostraram que a qualidade global dos enchidos onde tinha ocorrido a referida actividade lipolítica foi significativamente superior. Garcia *et al.* (2001) atribuiram estes resultados à actividade lipolítica desenvolvida por aqueles bolores.

Miteva *et al.* (1986) isolaram de enchidos crus várias estirpes de leveduras; de entre estas seleccionaram uma estirpe de *Candida utilis* para cultura de arranque para actuar à superfície em enchidos fumados e em outros não fumados. Esta estirpe mostrou uma grande capacidade lipolítica, principalmente nos enchidos não fumados, contribuindo esta actividade para uma melhoria substancial do aroma e sabor dos produtos. Boissonnet *et al.* (1994) isolaram 140 estirpes de leveduras de enchidos curados e seleccionaram 10 delas com possibilidade de virem a integrar culturas de arranque, considerando a sua grande capacidade lipolítica frente aos triacilglicéridos gordura de porco, à tributirina e à trioleína.

Na opinião de Shahani (1975) e de López (1997) as lipases microbianas têm um pH óptimo que varia entre 5,6 e 8,5 e uma actividade máxima a temperaturas compreendidas entre os 30 e os 40°C. No entanto, microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Penicillium roqueforti* e outras estirpes de *Penicillium* spp., produzem lipases que são activas a temperaturas de refrigeração ou mesmo de congelação (Andersson, 1980; López, 1997). As lipases microbianas apresentam uma ampla diversidade de propriedades enzimáticas e de especificidade de substrato, o que as torna atractivas para aplicação industrial. Deste modo, um grande número de lipases é utilizado como aditivos alimentares (enzimas modificadoras do sabor), catalizadores industriais para hidrólise de acilglicéridos, aditivos de detergentes, sendo também utilizadas com fins terapêuticos (digestivos, enzimas de diagnóstico). Crê-se que a amplitude da cadeia de ácidos gordos implicados exerce efeito na velocidade de lipólise, sendo esta tanto mais rápida quanto mais curtas forem as referidas cadeias (Kilara, 1985; Montel *et al.*, 1998; Zanardi *et al.*, 2004).

5.2.3.1.3 - Influência da lipólise sobre o aroma e sabor

Apesar da lipólise contribuir de modo importante para o desenvolvimento do aroma e do sabor dos enchidos, não são ainda bem conhecidas as consequências, do ponto de vista sensorial, da acumulação de ácidos gordos. Os ácidos gordos maioritários da gordura do

porco (oleico e linoleico) carecem de aroma, pelo que não terão efeito algum sobre o aroma dos enchidos (Lücke, 1998).

Os ácidos gordos de baixo peso molecular, que também são libertados por hidrólise, transmitem ao enchido um sabor ácido e um aroma muito intenso, sendo estas características sensoriais atenuadas à medida que aumenta o comprimento da cadeia carbonada dos ácidos gordos. Em todo o caso, os ácidos gordos de cadeia curta não se encontram em grandes quantidades na carne dada a ausência de um substrato adequado (acilglicéridos esterificados com ácidos gordos de cadeia curta) para a sua libertação, uma vez que os acilglicéridos e fosfolípidos da carne são compostos, na sua maioria, por ácidos gordos de cadeia longa. Alguns autores indicaram teores de ácidos gordos de cadeia curta em enchidos que haviam previamente recebido lipases (Fernández *et al.*, 1995; Zalacain *et al.*, 1997a,b; Ansorena *et al.*, 1998a,c). No entanto, este procedimento não melhorou de forma significativa as propriedades sensoriais dos enchidos.

Por conseguinte, o contributo da lipólise para a melhoria das características sensoriais das carnes curadas não se deve à simples libertação de ácidos gordos mas sim ao papel destes enquanto precursores, principalmente os insaturados, de uma grande quantidade de compostos de baixo peso molecular, principalmente compostos carbonílicos, resultantes das reacções de autoxidação (Cerise *et al.*, 1973; Dainty e Blom, 1995; Toldrá e Flores, 1998; Zanardi *et al.*, 2004). Desta modo, durante o fabrico dos enchidos poderão ser consideradas duas fases na degradação dos lípidos: uma primeira durante a fermentação, em que reacções lipolíticas libertam ácidos gordos; estes, numa segunda fase, que ocorre durante a cura dos enchidos, são oxidados gerando uma grande quantidade de compostos voláteis que são os que verdadeiramente participam no aroma e sabor dos enchidos.

5.2.3.2 - A autoxidação nos enchidos

Os fenómenos de oxidação lipídica são importantes enquanto geradores de numerosas substâncias, umas desejáveis e outras não, voláteis e não voláteis, que afectam o aroma e o sabor dos alimentos.

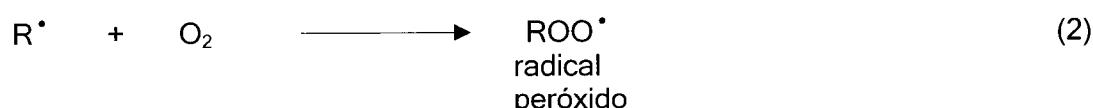
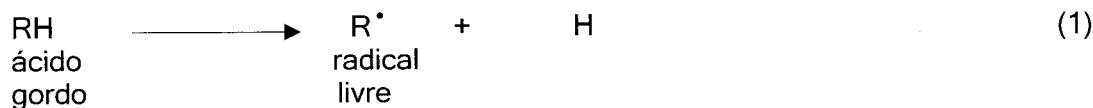
Com efeito, uma das causas mais importantes de alteração dos alimentos, em geral, e da carne e seus produtos, em particular, é a oxidação dos lípidos. Os substratos destas reacções são, principalmente, os ácidos gordos insaturados. Estes, de um modo geral, oxidam-se com maior rapidez quando estão livres. O grau de oxidação dos lípidos depende da sua composição em ácidos gordos, sendo a velocidade de oxidação tanto maior quanto maior for o grau de insaturação daqueles ácidos. Nesta ordem de ideias, os ácidos gordos poli-insaturados são mais susceptíveis à oxidação que os mono-insaturados e podem oxidar, inclusivamente, a temperaturas de congelação. Pelo contrário, os ácidos gordos saturados só se oxidam a temperaturas superiores a 60°C (Cheftel e Cheftel, 1984; Morrissey *et al.*, 1998). A susceptibilidade dos ácidos gordos à oxidação depende ainda da presença, natural ou não, de substâncias antioxidantes ou oxidantes. O calor, a luz, as radiações ionizantes e os iões metálicos são exemplos de agentes oxidantes, enquanto algumas especiarias têm propriedades antioxidantes. No caso das carnes processadas, para além destes factores, influi também o grau de redução de tamanho produzido no músculo e no tecido adiposo, através da migração ou da emulsão, que origina uma maior exposição dos ácidos gordos insaturados ao oxigénio (Samelis *et al.*, 1993). Não obstante,

um certo grau de oxidação pode contribuir decisivamente para o aroma e sabor característicos de certos alimentos, onde se incluem os enchidos curados.

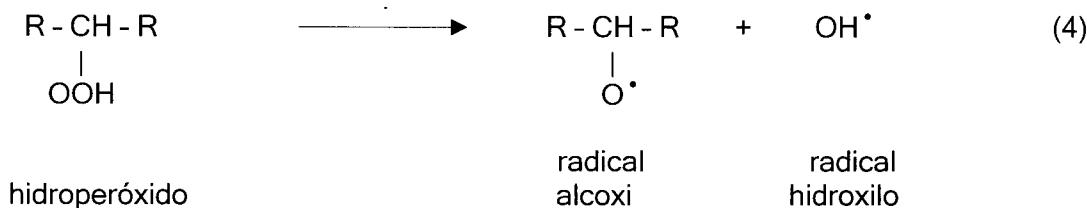
A oxidação lipídica gera uma grande variedade de produtos finais como compostos carbonílicos, ésteres, hidrocarbonetos, furanos, álcoois, epóxidos, entre outros. De entre estes, os compostos carbonílicos são os mais numerosos da fracção volátil e os mais decisivos para o aroma e sabor dos enchidos (McDougall *et al.*, 1975; Mottram *et al.*, 1984; Berdagué *et al.*, 1993; Hierro *et al.*, 1997; Chizzolini *et al.*, 1998). Os compostos carbonílicos acumulam-se tanto durante o período de fermentação como na fase final da cura dos enchidos, embora com origens diferentes em cada uma destas etapas. Na primeira etapa referida, os compostos carbonílicos procedem da fermentação dos hidratos de carbono, enquanto na segunda têm origem na oxidação dos ácidos gordos (Cerise *et al.*, 1973; Demeyer *et al.*, 1974; López, 1997). Contudo, outros autores apontam uma terceira possibilidade que é a formação de carbonilos a partir de aminoácidos através da degradação de Strecker (Halvarson, 1973; Lücke, 1986).

Na oxidação dos lípidos podem ser distinguidos três grupos de reacções (Nawar, 2000): ⁱ⁾ **reacções de iniciação**, que dão lugar à formação de radicais livres a partir de ácidos gordos insaturados ou de peróxidos lipídicos; ⁱⁱ⁾ **reacções de propagação**, caracterizadas por uma certa acumulação de peróxidos lipídicos, necessitando estas reacções de radicais livres; ⁱⁱⁱ⁾ **reacções de terminação**, em que os radicais livres se associam para formar compostos não radicais, entre eles aldeídos e cetonas de baixo peso molecular, responsáveis pelo aroma "a ranço". Alguns destes compostos procedem directamente da decomposição dos peróxidos lipídicos, substâncias muito instáveis e reactivas. Dos peróxidos também procedem, em grande parte, os radicais livres.

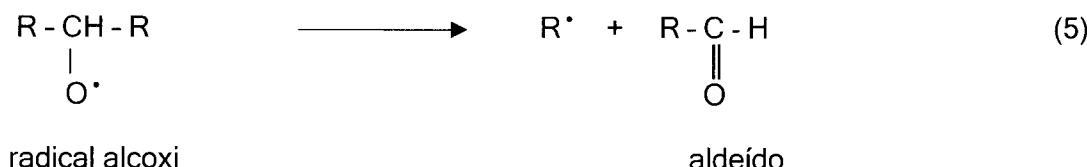
O processo oxidativo começa quando um ácido gordo (RH) perde um átomo de hidrogénio, originando-se um radical livre (R^{\cdot}) (reacção 1). Este processo ocorre muito mais rapidamente à medida que aumenta o número de duplas ligações no ácido gordo, razão porque os ácidos gordos polinsaturados são muito mais susceptíveis à oxidação (Morrissey *et al.*, 1998). Esta reação é catalizada pelas temperaturas elevadas e, sobretudo, pela luz e pela presença de certos metais, como o ferro, por exemplo. Uma vez formado o radical livre, este combina-se com o oxigénio molecular (O_2) para formar um radical peróxido (ROO^{\cdot}) (reacção 2), que é capaz de captar um átomo de hidrogénio de um outro ácido gordo insaturado para formar um hidroperóxido ($ROOH$) e um novo radical livre (reacção 3). Desta forma, a reacção é propagada muito rapidamente, decompondo-se os hidroperóxidos e originando novos radicais livres muito reactivos. Nesta fase de propagação (reacção 4) o consumo de oxigénio é muito elevado e pode ocorrer a oxidação de todos os ácidos gordos insaturados.



A decomposição dos peróxidos pode seguir vários caminhos (Nawar, 2000). Em primeiro lugar produz-se uma cisão homolítica rápida que dá lugar à formação de dois radicais livres muito activos, radical alquoxi e radical hidroxilo (reacção 4).

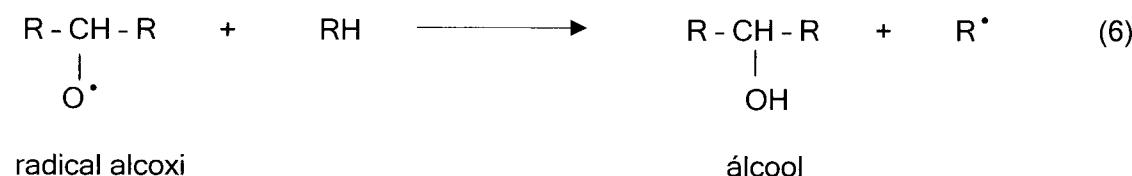


O radical alcoxi formado deste modo pode sofrer transformações distintas para dar lugar a uma ampla variedade de compostos. Assim, aquele radical pode perder uma das cadeias hidrocarbonadas para dar lugar a um aldeído (reacção 5):



Esta reacção implica a rotura da cadeia, que pode ocorrer em qualquer ponto do radical. O aldeído que se forma por este processo pode ser um composto volátil de cadeia curta ou pode encontrar-se ligado a uma molécula de glicerol, tratando-se, neste caso, de um composto não volátil. Os aldeídos são compostos que participam de maneira importante no desenvolvimento do aroma e do sabor de muitos alimentos, além de que possuem limiares de detecção muito baixos, pelo que podem ser percebidos mesmo que existam em concentrações muito baixas (Stahl, 1973; Molimard e Spinnler, 1996). A presença de uma dupla ligação na molécula do aldeído diminui consideravelmente o referido limiar. (Fernández, 2000).

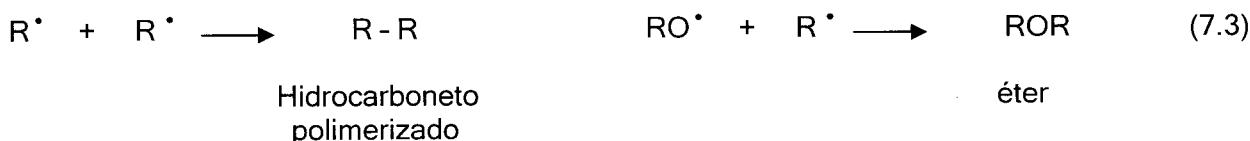
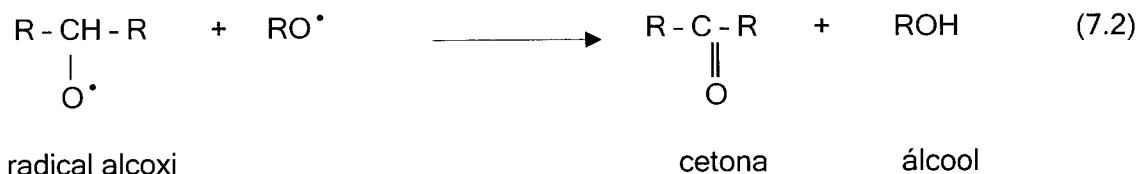
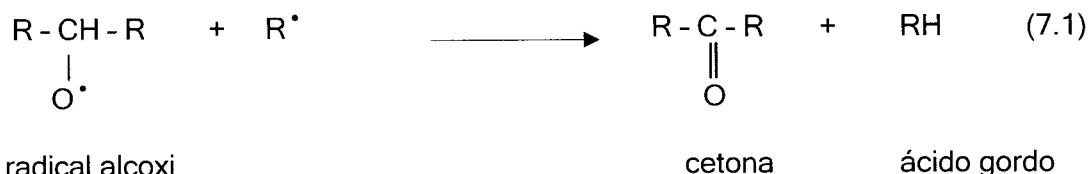
Por outro lado, o radical alcoxi pode, também, captar um átomo de hidrogénio de um outro ácido gordo para formar um álcool e um novo radical livre (reacção 6):



Os álcoois contribuem também para o aroma e sabor dos alimentos, ainda que o façam de forma menos intensa que os aldeídos (Fernández, 2000).

Em simultâneo com as reacções de iniciação e propagação podem produzir-se reacções de terminação, que têm lugar quando os radicais livres reagem entre si originando compostos não activos.

Podem ainda ocorrer várias reacções de terminação que dão lugar a compostos vários (reacções 7.1, 7.2 e 7.3):



Os produtos finais gerados pela oxidação lipídica (aldeídos, álcoois, cetonas, furanos, entre outros) são substâncias muito voláteis, com um baixo limiar de detecção olfativa, pelo que adquirem um papel fundamental no desenvolvimento do aroma e do sabor dos alimentos em que se encontram. O seu espectro e a sua concentração são determinantes na definição de aromas e sabores desejáveis ou não e, consequentemente, no grau de aceitação pelo consumidor.

Os peróxidos lipídicos (também designados por hidroperóxidos) formados durante a fase de propagação são os produtos primários da oxidação. Estes compostos não têm uma repercussão directa no aroma e no sabor dos alimentos, por serem inodoros e insípidos, contudo, por serem instáveis, decompõem-se rapidamente em produtos secundários, fundamentalmente compostos carboxílicos (aldeídos e cetonas) que são os principais responsáveis pelas alterações organolépticas induzidas pela autoxidação (DeMan, 1992). Cada ácido gordo insaturado origina hidroperóxidos específicos, que por sua vez se decompõem para gerar aldeídos específicos, disso damos exemplo no Quadro 4.

Quadro 4 – Hidroperóxidos e aldeídos resultantes da autoxidação dos ácidos oleico, linoleico e linolénico.

Ácido Gordo	Grupo metilo atacado	Hidroperóxidos isómeros	Aldeídos correspondentes
Oleico	11	11-hidroperoxi-9-eno	Octanal
		9-hidroperoxi-10-eno	2-decanal
	8	8-hidroperoxi-9-eno	2-undecenal
		10-hidroperoxi-8-eno	Nonanal
Linoleico	11	13-hidroperoxi-9,11-dieno	Hexanal
		11-hidroperoxi-9,11-dieno	2-octanal
		9-hidroperoxi-10,12-dieno	2,4-decadienal
Linolénico	14	16-hidroperoxi-9,12,14-trieno	Propanal
		14-hidroperoxi-9,12,15-trieno	2-pentanal
		12-hidroperoxi-9,13,15-trieno	2,4-heptadienal
	11	13-hidroperoxi-9,11,15-trieno	3-hexanal
		11-hidroperoxi-9,12,15-trieno	2,5-octadienal
		9-hidroperoxi-10,12,15-trieno	2,4,7-decatrienal

Nota: Neste quadro apenas foram considerados os grupos metilo mais activos.

Fonte: DeMan (1992).

O ácido linoleico, o mais abundante dos PUFA (“Poli Unsaturated Fatty Acids”, em português: Ácidos Gordos Polinsaturados) na maioria dos alimentos, origina o 13-hidroperoxi-9,11-dieno, maioritário de entre os que se formam durante a oxidação, sendo o hexanal o principal aldeído resultante da sua oxidação.

Uma vez que o ácido linoleico é oxidado 10 a 15 vezes mais rapidamente que o ácido oleico, o teor de hexanal pode ser um bom indicador do grau de rancificação (Labuza, 1971; Shahidi *et al.*, 1987; López, 1997). De facto, o hexanal, composto típico da oxidação das gorduras, proporciona às carnes um aroma desagradável e pungente a ranço (Shahidi *et al.*, 1987). Os 2-alcenos e os 2,4-alcadienos, presentes na gordura oxidada de suíno e de bovino e também em alguns enchidos fermentados, possuem um forte aroma “metálico” e “a gordura”, que contribuem para a formação de sabores estranhos que surgem como consequência da oxidação. Em todo o caso, a autoxidação dos lípidos tem um desenvolvimento dispar nos diferentes tipos de enchidos, consequência provável da intervenção da fumagem, da presença de determinadas especiarias, de nitritos e do grau de anaerobiose, entre outros (López, 1997).

Concretamente no que respeita à carne, o grau e a extensão das reacções autoxidativas dependem de numerosos factores, sendo o mais importante a quantidade de ácidos gordos polinsaturados. Ainda que na carne o conteúdo de fosfolípidos seja relativamente pequeno, por comparação com a fracção de triacilglicéridos, aqueles são particularmente importantes por serem muito sensíveis à oxidação. Este facto deve-se ao seu elevado teor em ácidos gordos insaturados (especialmente ácido linoleico e araquidónico) e ao contacto intenso com catalizadores tissulares da oxidação, como os metais e as metaloporfirinas. Neste sentido, os fosfolípidos, por serem constituintes das

membranas celulares e intracelulares, apresentam uma superfície de ataque relativamente ampla, enquanto que os triacilglicéridos, por se situarem no interior dos adipócitos, possuem uma superfície de exposição mais pequena.

De um modo geral, na carne crua a oxidação dos lípidos não constitui um factor limitante para a sua conservação pelo frio. Pelo contrário, a carne cozida e refrigerada ou congelada posteriormente é mais sensível à oxidação, uma vez que o efeito catalizador das hemoproteínas aumenta substancialmente quando a globina é desnaturada pela accção do calor, com libertação de ferro (Cheftel e Cheftel, 1984; Morrissey *et al.*, 1998). Por outro lado, a maior susceptibilidade da carne cozida à oxidação lipídica pode dever-se também à rotura tissular, que provoca um maior contacto entre os lípidos e os catalizadores pró-oxidantes (Rhee, 1988).

Nos enchidos crús curados há que considerar as diferentes operações do processo de fabrico, bem como os fenómenos fisico-químicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorrem durante as etapas do fabrico e que afectam a integridade e as propriedades dos compostos lipídicos. Deste modo, são vários os factores e os agentes que interferem na oxidação lipídica dos enchidos: a composição da massa, a redução de tamanho (miga) a que a carne é sujeita, o pH, a adição de ingredientes como sal, nitritos, especiarias, condimentos, antioxidantes, entre outros.

No que diz respeito à composição da massa, para além de um teor elevado de triacilglicéridos, procedentes fundamentalmente do toucinho, a carne de porco fornece uma quantidade significativa de fosfolípidos, que representam entre 16 e 34% da gordura do tecido muscular (Rhee, 1992; Chizzolini *et al.*, 1998). Por outro lado, o maior teor de ácidos gordos insaturados comparativamente aos saturados, tanto na carne de bovino (55% aproximadamente) como na de suíno (cerca de 60%), é outro factor que favorece a oxidação.

A redução de tamanho da carne produz a rotura das membranas celulares, pelo que os fosfolípidos e os triacilglicéridos ficam ainda mais expostos ao oxigénio, às enzimas, aos hemopigmentos e aos iões metálicos, agentes que aceleram a ocorrência das reacções de oxidação (Pearson *et al.*, 1977; Igene e Pearson, 1979b; Khayat e Schwall, 1983; Asghar *et al.*, 1988). Por outro lado, esta operação pode acelerar a perda de compostos intermediários redutores, como o NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) (Newbold e Scopes, 1971; Alvarez, 1994; Toldrá e Flores, 1998).

Outro parâmetro que interfere na oxidação da gordura durante o processo de fabrico de enchidos é o pH. Com efeito, quanto menor o seu valor, abaixo de 7,0, maior é a velocidade de oxidação (Owen *et al.*, 1975; Yasosky *et al.*, 1984; Tichivangana e Morrissey, 1985). Na carne crua, quando o pH é elevado a oxidação lipídica é inibida pelos sistemas enzimáticos redutores das mitocôndrias (Kwoh, 1971). Estes sistemas eliminam o oxigénio e determinam a formação de substâncias redutoras, como o NAD, possibilitando manter os pigmentos da carne na sua forma reduzida (Saleh e Watts, 1968; López, 1997). A valores de pH inferiores a 5,5, valores comuns em enchidos curados, estes sistemas enzimáticos mitocondriais têm escassa ou nenhuma actividade (Hultin, 1980; Rhee *et al.*, 1984a,b; Ansorena e Astiasarán, 2004a). No entanto, a oxidação lipídica catalizada pelo ferro, tanto hémico como não hémico, é igualmente afectada pelo pH. Todavia, o ferro não hémico possui uma maior actividade catalítica a pH 5,5 enquanto que para o ferro hémico são os valores de pH alcalinos que favorecem a oxidação (Fernández, 2000).

O aumento da concentração de cloreto de sódio com o decurso da cura, como consequência da desidratação, também contribui para a oxidação lipídica. O efeito pró-oxidante do cloreto de sódio é atribuído, em parte, à sua capacidade para deslocar os iões de ferro das macromoléculas que por sua vez vão participar, os referidos iões, em reacções

de oxidação. Esta hipótese é apoiada por diversos autores (Govindarajan *et al.*, 1977; Harel, 1994; Fernández, 2000) que se fundamentam no facto da acção pró-oxidante do cloreto de sódio ser inibida pelo EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético). De acordo com Rhee *et al.* (1983a,b) e Wettasinghe e Shahidi (1997), a utilização de cloreto de potássio reduz os fenómenos de oxidação; contudo aquele sal deve ser utilizado em pequenas quantidades por possuir sabor amargo (Rhee *et al.*, 1983a; Breslin e Beauchamp, 1995; Van der Klaauw e Smith, 1995).

A adição de nitritos às massas também interfere nas reacções de oxidação uma vez que estes compostos têm uma acção antioxidant, como foi referido no capítulo 5.2.2. Outros ingredientes com propriedades antioxidantes são algumas especiarias, tocoferóis e ascorbatos. No caso dos enchidos fumados é pertinente sublinhar que no fumo existem compostos que exercem acção antioxidant (vide capítulo 4.7), como é o caso de certos derivados fenólicos (Giese, 1996).

O aumento da concentração de peróxidos com o decurso da cura, como consequência do metabolismo microbiano, é outra variável que contribui para a oxidação dos ácidos gordos (Demeyer *et al.*, 1974; Fernández, 2000). Numa primeira fase do processo fermentativo os peróxidos aumentam consideravelmente, decrescendo posteriormente, à medida que são formados os grupos carbonilo, que continuam a aumentar, mesmo quando os peróxidos começam a desaparecer (Burgos, 1981). Tanto lactobacilos e pediococos como micrococos são capazes de acelerar a decomposição dos peróxidos para dar lugar a monocarbonilos. Contudo, só alguns micrococos, como *Micrococcus freudenrichii*, podem produzir peróxidos de ácidos gordos a partir de toucinho fresco (Wood *et al.*, 2004).

Neste sentido, é importante destacar a actividade antioxidant que exerce a microbiota fúngica que se desenvolve na superfície de alguns produtos de salsicharia, como enchidos curados e presunto. Em primeiro lugar, o micélio actua como barreira contra a entrada de luz ao interior do produto e, portanto, evita a sua acção pró-oxidante (Bacus, 1986; Cook, 1995). Em segundo lugar, como são microrganismos aeróbios reduzem a tensão de oxigénio na superfície dos enchidos. Por último, algumas estirpes de bolores são capazes de produzir catalase e peroxidase, minimizando deste modo o poder oxidante dos peróxidos (Bacus, 1986; Cook, 1995; Pradham *et al.*, 2000). Alguns microrganismos, como *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus* e *Geotrichum candidum* não só são capazes de destruir os peróxidos na gordura fresca (Smith e Alford, 1969) como também podem diminuir os níveis de peróxidos e reduzir os níveis de monocarbonilos que se encontram na gordura já rancificada (Nuñez *et al.*, 1998). Por esta razão, a gordura superficial de presuntos cobertos com bolores apresenta-se debilmente oxidada, mesmo após longos períodos de cura, enquanto que em presuntos com o mesmo tempo de cura e sem crescimento superficial de bolores a gordura está fortemente rancificada (Leistner *et al.*, 1965; Fernández 2000).

Os ácidos gordos são mais susceptíveis à oxidação lipídica quando se libertam por acção das lipases e fosfolipases (López, 1997), embora existam autores (Alford *et al.*, 1971) que não tenham encontrado correlação entre a produção de lipases e a actividade oxidativa microbiana. Outros autores (Cerise *et al.*, 1973) sugeriram que os peróxidos e carbonilos dos enchidos são formados a partir dos ácidos gordos livres, pelo que a hidrólise selectiva dos ácidos gordos insaturados poderia ser um factor importante nos fenómenos oxidativos e, consequentemente, no aroma e no sabor dos enchidos.

Foram realizados estudos com lipases microbianas, tendo sido assinalada uma maior actividade em relação a triacilglicéridos esterificados com ácidos gordos de cadeia curta (Whitaker, 1972). Kilara (1985) concluiu que aquelas enzimas apresentavam pouca ou

nenhuma especificidade para os ácidos gordos quando se utilizavam gorduras e óleos naturais como substratos, excepto quando se tratava de óleos marinhos e manteiga.

Na opinião de Berdagué *et al.* (1992), nos produtos curados em que os microrganismos não têm um papel muito determinante, como no presunto, por exemplo, a oxidação ocorre, principalmente, por acção dos sistemas enzimáticos endógenos. Demeyer *et al.* (1974), Burgos (1981), Alvarez (1994) defendem que a principal causa da oxidação dos lípidos nos enchidos é o metabolismo bacteriano, e muito especialmente os peróxidos resultantes da actividade de lactobacilos e micrococáceas. Estes peróxidos oxidam os ácidos gordos e desta actividade resulta uma acumulação significativa de peróxidos lipídicos e compostos carbonilo (Alford *et al.*, 1971; Alvarez, 1994). Os peróxidos lipídicos resultantes de fenómenos não enzimáticos podem ser posteriormente metabolizados pelas bactérias e transformados em compostos carbonílicos e ácidos gordos (Cerise *et al.*, 1973; Alvarez, 1994).

Nas primeiras etapas da fermentação dos enchidos, os peróxidos sofrem um aumento acentuado, mais precoce que a acumulação de ácidos gordos livres, decrescendo depois à medida que aparecem os carbonilos livres. Estes continuam a aumentar mesmo quando os peróxidos desaparecem (Burgos, 1981; López, 1997). Esta situação não ocorre nos enchidos em que a taxa de micrococáceas é muito reduzida comparativamente à de lactobacilos (Alvarez, 1994).

5.2.4 - Proteólise e alterações nos compostos azotados no decurso da cura dos enchidos

Durante a cura dos enchidos, as proteínas e outros compostos azotados sofrem um conjunto de transformações devidas à acção microbiana e a factores intrínsecos à carne, assim como à tecnologia utilizada para o fabrico do enchido. Estas transformações produzem um aumento do azoto não proteico da ordem dos 20%, ou mesmo superior (Niinivaara *et al.*, 1964; Langner, 1972; DeMasi *et al.*, 1990; Garcia de Fernando e Fox, 1991b; Diaz *et al.*, 1993; Beriain *et al.*, 2000a). Estas modificações determinam as características sensoriais dos enchidos, designadamente, a textura, o aroma e o sabor típicos do produto curado.

Durante a redução de tamanho das carnes, na operação de miga, as fibras musculares rompem-se, ficando as miofibrilhas expostas à acção do sal (Offer, 1984; Pereda e Perales, 2001), cuja presença facilita os processos electrostáticos durante a formação da película proteica que rodeia os glóbulos de gordura e favorece o estabelecimento de interacções proteína-gordura e proteína-proteína. Os iões reagem com os grupos polares das proteínas e reduzem a atracção electrostática entre as cargas opostas de grupos próximos, deste modo facilita-se a perda das estruturas terciária e quaternária das proteínas, surgem condições para formar uma rede tridimensional que contribui para a estabilidade da textura dos enchidos (Katsaras e Budras, 1992).

No decurso do processo de fermentação dos enchidos, como consequência do aumento da temperatura, da presença de NaCl e da diminuição do pH, ocorre a insolubilização das proteínas miofibrilares e sarcoplásmicas, que continua durante o processo de cura (López, 1997). Ainda que o pH não continue a descer com o decurso da cura, podendo mesmo aumentar ligeiramente (Lücke, 1984; 1998), a temperatura possa diminuir (por vezes para valores de 11 - 15°C), a desidratação continua pelo efeito da baixa

humidade relativa ambiental. Esta conjuntura faz com que a interacção proteína-água seja menor, o que dificulta a solubilização proteica (Kenney e Hunt, 1990). Como consequência desta perda de água, aumenta a concentração salina que, devido à sua elevada força iônica, contribui para a desnaturação proteica da carne, o que se traduz em alterações estruturais profundas (Knight e Parsons, 1988). A interacção entre as proteínas dissolvidas por acção da migração das carnes e o sal adicionado origina uma lenta gelificação que conduz à ligação da massa de carne (López, 1997).

As alterações que ocorrem nos compostos azotados durante a cura dos enchidos devem-se, sobretudo, à actividade das proteases (endopeptidases e exopeptidases) endógenas e microbianas. As primeiras cindem as ligações peptídicas localizadas no interior da cadeia aminoacídica, gerando polipeptídos de cadeia longa. Estas proteases endógenas são responsáveis por uma modificação favorável na textura, promovendo o aumento da tenrura que ocorre com a evolução da cura. São activas, principalmente, durante a fase inicial da fermentação, afectando a proteólise da actina e da miosina (Verplaetse *et al.*, 1989; García de Fernando e Fox, 1991a,b, López, 1997). As proteases microbianas libertam só aminoácidos dos extremos da cadeia, ou pequenos péptidos, qualquer deles precursores de moléculas responsáveis pelo sabor; são mais importantes na fase final da cura (Verplaetse *et al.*, 1992). Existe uma grande quantidade de microrganismos que têm a capacidade de produzir proteases extra e intracelulares. Geralmente, as proteínas sofrem uma hidrólise prévia, originando péptidos e aminoácidos, moléculas que podem ser transportadas ao interior da célula microbiana. Num passo seguinte, as peptidases intracelulares degradam os péptidos originando aminoácidos livres (Law, 1980; Bacus, 1986).

Como reacção enzimática que é, a proteólise depende fortemente de diversos factores, de entre eles a temperatura e o pH são os mais destacáveis (López, 1997; Fernández, 2000). Dentro de determinados limites, que variam com o tipo de enzima, todas elas aumentam a sua actividade com a subida da temperatura. Deste modo, as temperaturas mais elevadas que normalmente ocorrem nas fases finais da cura dos enchidos, contribuem para um maior grau de proteólise. Por outro lado, o efeito do pH sobre a proteólise é algo mais complexo, ainda que se diga com frequência que existe uma relação inversa entre o pH e a proteólise, isto é, quanto mais baixo for o pH mais intensa é a proteólise. Um factor importante para os processos proteolíticos das carnes é a redução de tamanho a que elas são sujeitas. A este propósito, Astiasarán *et al.* (1990) registaram aumentos superiores do azoto não proteico em enchidos elaborados com massa picada fina comparativamente aos fabricados com massa com porções de carne de maiores dimensões. Atribuíram estes resultados à maior liberação de enzimas proteolíticas endógenas, nos enchidos cujas massas se submeteram a uma maior redução de tamanho, embora estas tivessem apresentado também maior decréscimo do pH. Ao longo do processo de cura, as proteínas sofrem uma lenta gelificação, responsável pela ligação das massas que constituem os enchidos. Este processo, lento e desejável, é causado pelo aumento da concentração de solutos, associado à secagem, e é favorecido pela descida do pH (Roncalés, 1995).

A proteólise promove um decréscimo de proteínas de elevado peso molecular e, consequentemente, conduz a um aumento das fracções azotadas de tamanho inferior. A este propósito, Verplaetse *et al.* (1989) referem um aumento, durante a cura, de 75,9% na concentração de polipeptídos com peso molecular inferior a 36 000, enquanto a cadeia pesada da miosina diminuiu em 49% e a actina e troponina T diminuem em 30%. Resultados concordantes foram obtidos por Garriga *et al.* (1988) em trabalhos que estudaram diferentes proteínas durante a cura de enchidos.

Quanto às diferentes fracções azotadas que constituem o azoto não proteico, no princípio da cura dos enchidos os péptidos representam, de um modo geral, a principal fracção, enquanto os aminoácidos livres predominam no final do processo (Dierick *et al.*, 1974; García de Fernando e Fox, 1991a; Díaz *et al.*, 1997; Toldrá e Flores, 1998).

5.2.4.1 - Proteólise endógena

As proteases endógenas induzem alterações estruturais e transformações bioquímicas nas proteínas da carne fresca, originando modificações nas características sensoriais, principalmente o aumento da tenrura (Asghar e Bhatti, 1987). No entanto Verplaetse *et al.* (1989) mencionam que os enchidos constituem um meio adequado para a actividade das catepsinas, devido ao seu baixo pH e às temperaturas a que ocorrem os processos de cura.

A carne, na fase *post-mortem*, está sujeita a uma série de alterações subsequentes até ao momento do seu consumo. Neste processo estão implicados três tipos de agentes: bioquímicos, químicos e microbiológicos. Para além dos sistemas enzimáticos requeridos para a glicólise anaeróbia e a respiração, os músculos contêm, pelo menos, dois grupos de enzimas proteolíticas, as catepsinas e as calpaínas, ambos os grupos operam antes que a glicólise *post-mortem* tenha cessado. Estes grupos enzimáticos promovem o aumento da tenrura e o desenvolvimento do sabor (López, 1997).

As catepsinas localizam-se principalmente nos lisossomas das células musculares, onde se identificaram seis classes diferentes: A, B, C, D, H e L. As catepsinas A e B₂ são carboxipeptidases, a C é uma dipeptidilaminopeptidase, e pertencem todas elas ao grupo das exopeptidases (Goll *et al.*, 1982; López, 1997; Fernández, 2000). As catepsinas B₁, H e L são tiol-proteinases e a D é uma aspartil-proteinase; todas elas estão englobadas no grupo das endoproteinases (López, 1997; Toldrá e Flores, 1998; Fernández, 2000). Todas estas enzimas participam na transformação do músculo em carne. De todas as catepsinas presentes nos lisossomas das células musculares, as catepsinas B, D, H e L foram as mais estudadas (Fernández, 2000).

Todas as catepsinas apresentam valores óptimos de pH entre 3,0 e 6,5, pelo que se deduz que estas enzimas poderão desempenhar um papel importante na actividade proteolítica dos enchidos. Toldrá *et al.* (1992) estudaram a actividade das catepsinas B, D, H e L em sistemas modelo que simulavam as que ocorrem no fabrico de enchidos. Concluíram que as catepsinas B, L e D são activas, principalmente, nas primeiras fases do processo de fabrico (miga, mistura e maturação das massas), enquanto somente a catepsina L poderia apresentar uma actividade significativa durante as fases mais adiantadas da cura. Contrariamente, a catepsina H foi intensamente inibida devido à acidez.

Verplaetse *et al.* (1992) estudaram também a actividade proteolítica em enchidos curados a que se adicionaram inibidores, tanto do crescimento microbiano (antibióticos) como da actividade das proteinases (pepsatina e leupeptina). Observaram que a pepsatina e a leupeptina inibiram a degradação da actina e da miosina em maior extensão quando o crescimento microbiano é impedido pela acção de antibióticos. Este facto sugere uma maior relevância das proteases endógenas frente às bacterianas no desenvolvimento dos fenómenos proteolíticos. Para Demeyer *et al.* (1992), as proteinases musculares (endopeptidases) do tipo da catepsina D são activas principalmente durante o período de fermentação das massas, enquanto que as exopeptidases bacterianas são-no nas fases mais adiantadas da cura.

Em trabalhos posteriores realizados por Toldrá *et al.* (1993), com presuntos, foi observada a existência de actividade das catepsinas B, H e L no final do processo de fabrico (decorridos 15 meses), embora sem grande intensidade. Pelo contário, a participação da catepsina D foi restringida fundamentalmente aos 5 primeiros meses. Estes autores indicaram as catepsinas B e L como as mais importantes no fabrico de presunto curado.

As calpaínas são cisteína proteinases que carecem de activação pelo ião cálcio bivalente (Ca^{2+}) (Kang *et al.*, 1981; Fernández 2000), razão pela qual são designadas, algumas vezes, por cálcio-dependentes. Estão localizadas no interior das células musculares, na região do disco Z das miofibrilhas. Existem dois tipos de calpaínas, a calpaína I (calpaína μM), que é activada na presença de concentrações micromolares de cálcio, da ordem dos 50 a 100 μM , e a calpaína II (calpaína mM), que requer concentrações milimolares, da ordem de 1 a 2 mM (Penny *et al.*, 1984). Ambas são bastante sensíveis à acidez, de tal modo que a calpaína I perde 82% da sua actividade máxima a pH 5,5 e a calpaína II ainda é mais sensível (Dransfield, 1993).

Sárraga *et al.* (1993), em estudos realizados com presunto, apenas detectaram actividade de calpaínas nas pernas frescas, no decurso do período de salga e pouco tempo após esta operação, sendo neste último caso a actividade notavelmente inferior. Durante as fases posteriores não foi observada qualquer actividade das calpaínas. O rápido desaparecimento desta actividade enzimática, considerando o processo de produção do presunto, poderá dever-se ao facto de serem enzimas bastante instáveis, principalmente a calpaína I (Dransfield *et al.*, 1992). Se a este facto associarmos os longos períodos de maturação a que os presuntos normalmente se submetem e a adição de sais de cura, torna-se bastante improvável a participação das calpaínas nestes processos (Sárraga *et al.*, 1989; López, 1997; Fernández, 2000). Pela mesma ordem de ideias e considerando os valores de pH nas fases iniciais do processo de fabrico dos enchidos, a adição de sais, designadamente NaCl e nitrificante, e os longos períodos de cura usados para os enchidos mais tradicionais (que podem variar, consoante os produtos, entre 30 e 100 dias, ou mesmo mais), será de prever também uma reduzida participação das calpaínas nestes produtos.

Existem todavia outros tipos de enzimas endógenas, designadas algumas vezes por oligopeptidases. Neste grupo estão incluídas as carboxipeptidases, que englobam as catepsinas A e B₂, e libertam aminoácidos a partir do grupo C-terminal. Também se encontram neste grupo as aminopeptidases, que cindem aminoácidos a partir da extremidade N-terminal. As dipeptidases hidrolisam ligações peptídicas entre os grupos NH₂ e COOH. As dipeptidilpeptidases hidrolisam dipéptidos a partir da extremidade N-terminal não substituída. Contudo, no que respeita ao grupo das enzimas referidas neste parágrafo, a informação que há disponível não evidencia uma acção de relevo destas enzimas durante a maturação dos enchidos.

5.2.4.2 - Proteólise exógena

Durante vários anos acreditou-se que a hidrólise proteica nos enchidos ocorria, maioritariamente, por intervenção das proteases microbianas (Lücke, 1998), mais concretamente as produzidas pelas bactérias lácticas (Guo e Chen, 1991). Todavia, na actualidade não se conhece com rigor em que medida as bactérias lácticas e as

micrococáceas participam nas alterações proteolíticas durante a cura de enchidos e presuntos (Kröckel, 1995; Fernández, 2000).

As bactérias lácticas não podem sintetizar muitos dos aminoácidos requeridos para a síntese proteica, o que torna necessária a existência de um sistema proteolítico activo nos meios em que aquelas bactérias se desenvolvem e em que as proteínas constituem a sua principal fonte de azoto. Os estudos sobre os sistemas proteolíticos de diversas bactérias, em especial as lácticas, foram desenvolvidos nos últimos anos devido à utilização destes microrganismos na transformação de alimentos, como a elaboração de queijo (Broome *et al.*, 1990) e produtos de salsicharia (Hammes *et al.*, 1990). Deste modo, Reuter (1971, 1975), a partir de enchidos fermentados, isolou estirpes de lactobacilos com capacidade para hidrolisar péptidos. Cantoni *et al.* (1975) assinalaram que os lactobacilos contribuem de modo importante para a proteólise. Martin (1975) atribuiu aos lactobacilos uma actividade proteolítica superior à dos micrococos e defendeu que aqueles microrganismos eram responsáveis, em grande medida, pela formação de aminoácidos. Em coerência com estas opiniões estão os trabalhos de Montel *et al.* (1992) que, em experiências *in vitro* realizadas com espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, concluíram que estes microrganismos podem contribuir para o aumento de aminoácidos livres devido à actividade das suas peptidases intracelulares. Em enchidos fabricados com a adição de estirpes de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei*, subespécie *tolerans*, previamente isoladas de produtos do mesmo tipo, foi observada uma actividade proteolítica máxima à temperatura de 40°C, dependendo esta actividade enzimática da concentração em sal (Vignolo *et al.*, 1989). Deste modo, e segundo os mesmos autores, a 30°C, temperatura utilizada para a fermentação de alguns tipos de enchidos, a actividade proteolítica é reduzida de 80% ao aumentar a concentração de NaCl de 3 para 5%. Fadda *et al.* (1998) também encontraram actividade proteolítica em estirpes de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei* isolados de enchidos comerciais.

Apesar da provável existência de proteinases ligadas à parede celular dos lactobacilos, considera-se que estes microrganismos são debilmente proteolíticos em comparação com outros grupos bacterianos, como *Bacillus*, *Proteus* e *Pseudomonas* (Kröckel, 1995). Law e Kolstad (1983) afirmaram não existir uma evidência directa de que os lactobacilos contribuam de modo significativo para o aroma e sabor dos enchidos fermentados, e que é incerta a participação das suas enzimas na proteólise das massas. Neste sentido, vários autores (Nordal e Slinde, 1980; Lücke e Hechelmann, 1988) indicaram que diversas espécies de bactérias lácticas utilizadas como culturas de arranque carecem de qualquer actividade proteolítica. Bermell *et al.* (1992) chegaram a igual conclusão quando utilizaram *Lactobacillus curvatus* e *Pediococcus pentosaceus* isolados de presunto. Hierro *et al.* (1999) também não encontraram diferenças importantes nas proteínas miofibriliares e no perfil de aminoácidos entre enchidos fabricados de forma asséptica e enchidos que haviam sido inoculados com uma estirpe de *Lactobacillus* previamente isolada de enchidos espanhóis. Para além destes aspectos, Montel *et al.* (1995) indicaram que as proteases libertadas pelos microrganismos referidos perdem grande parte da sua actividade a pH ácido, de modo que a sua acção em enchidos fermentados será mínima.

Quanto ao género *Micrococcus*, os estudos têm incidido, fundamentalmente, em micrococos isolados de queijos. Em algumas estirpes destes microrganismos foi comprovada a presença de proteinases extracelulares com actividade óptima a pH alcalino, que se perde a pH ácido, bem como proteinases intracelulares, endopeptidases, aminopeptidases e dipeptidases (Bhowmik e Marth, 1989). Em relação às micrococáceas presentes nos enchidos, não se sabe com segurança até que ponto intervêm na proteólise. Diversos autores (Bacus, 1986; Selgas *et al.*, 1993; Garcia-Varona *et al.*, 2000) consideram que os micrococos participam activamente nos fenómenos proteolíticos, provocando um

importante aumento do teor de aminoácidos livres. Selgas *et al.* (1993) demonstraram a actividade proteolítica intra e, principalmente, extracelular, de micrococos que haviam sido isolados de enchidos espanhóis. No entanto, os estudos de Montel *et al.* (1992), usando espécies do género *Staphylococcus*, indicaram que estas bactérias possuem somente uma ligeira actividade aminopeptidásica e nenhuma capacidade proteinásica. Hammes *et al.* (1995) isolaram estirpes de *Staphylococcus carnosus* com actividade proteolítica muito baixa. Bermell *et al.* (1992) também não detectaram actividade proteolítica em *S. xylosus* isolados de presunto curado. Hierro *et al.* (1999) também não encontraram diferenças nas proteínas miofibrilares e no perfil de aminoácidos quando inocularam uma estirpe de *Staphylococcus* isolada de enchidos espanhóis.

Muitas espécies de bolores e de leveduras podem desenvolver actividade proteolítica. Este tema tem sido objecto de trabalhos com queijo (Fox e Law, 1991; Dines-Larsen *et al.*, 1998). Tal como acontece com as bactérias lácticas e com as micrococáceas, é discutível a importância dos bolores e das leveduras nos processos proteolíticos dos produtos de salsicharia. Alguns autores (Leistner, 1990; Geisen *et al.*, 1992) detectaram esta actividade, sem contudo quantificá-la. Grazia *et al.* (1986) mediram a evolução do azoto solúvel e a produção de amoníaco em salames curados com bolores e concluíram que a actividade proteolítica foi bastante escassa. No entanto, Nuñez (1995) e Rodríguez *et al.* (1998) demonstraram a capacidade dos géneros *Eurotium* e *Penicillium* presentes em presunto curado para hidrolisar a mioglobina. Para além disso, estes microrganismos possuem aminopeptidases capazes de libertar aminoácidos a partir de proteínas e de péptidos (Nuñez, 1995). Trigueros *et al.* (1995) isolaram estirpes de bolores, dos géneros *Penicillium* e *Mucor*, da superfície de enchidos curados espanhóis e avaliaram a sua actividade proteolítica *in vitro*, usando como substrato proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas. Todas as estirpes evidenciaram actividade proteolítica, especialmente em meios com pH próximo da neutralidade. Posteriormente, as mesmas estirpes foram inoculadas na superfície de enchidos curados (Toledo *et al.*, 1997) para testar a sua actividade proteolítica nestes produtos. Tal como havia acontecido nos estudos *in vitro*, todas as estirpes mostraram actividade proteolítica, mais marcada quando se utilizaram tripas naturais do que quando se usaram tripas artificiais de colagénio.

As leveduras, presentes tanto no interior das massas como na superfície dos enchidos, também manifestam actividade proteolítica (Woods e Kinsella, 1980; Lücke, 1986; Elias, 1993; Selgas *et al.*, 2000), ainda que alguns autores (Comi e Cantoni, 1980; Huerta *et al.*, 1988b) assegurem que aquela actividade não é muito marcada. Rodríguez *et al.* (1998) isolaram duas estirpes de leveduras (das espécies *Debaryomyces hansenii* e *Candida zeylanoides*) de presunto curado que mostraram uma importante actividade proteolítica e uma ligeira actividade aminopeptidásica.

5.2.4.3 - Degradação dos aminoácidos

A degradação dos aminoácidos livres, mediante reacções de desaminação e descarboxilação, origina diferentes compostos, como cetoácidos, ácidos gordos, amoníaco, aminas, aldeídos, entre outros, que afectam as características sensoriais dos alimentos, favoravelmente ou, por vezes, de forma indesejável. A Figura 1 esquematiza as reacções através das quais os aminoácidos podem ser convertidos nos compostos anteriormente mencionados.

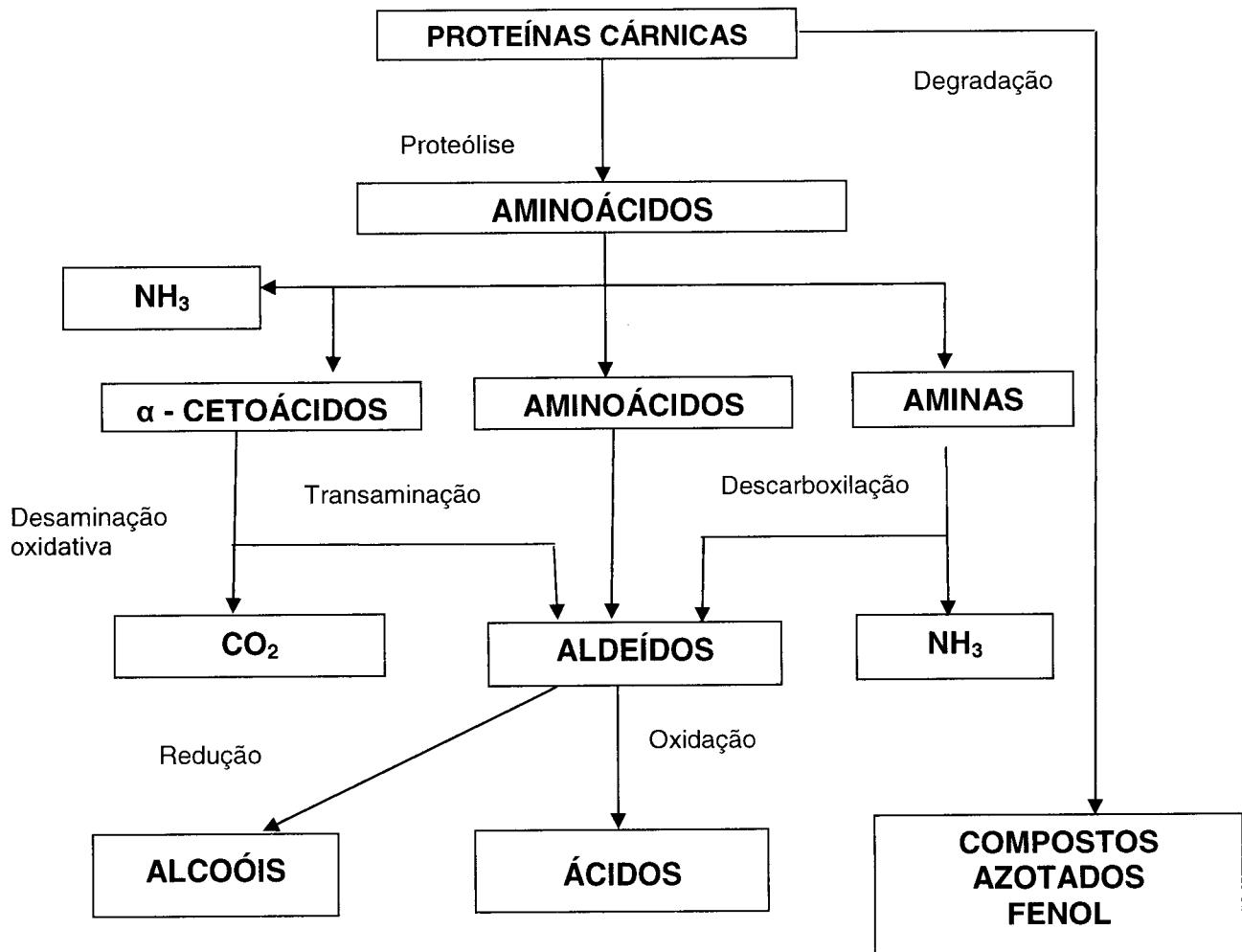


Figura 1 – Reacções de transformação dos aminoácidos durante a cura dos enchidos

Adaptado de Molimard e Spinnler (1996) e Fernández (2000).

A desaminação pode desenvolver-se por duas vias diferentes, a desaminação oxidativa e a não oxidativa. Na desaminação oxidativa intervêm aminoácido-oxidases flavina-dependentes. São enzimas que desempenham um papel relativamente secundário e não se consideram constituintes do metabolismo principal dos grupos amina. Estas enzimas são relativamente inespecíficas, de tal modo que uma oxidase pode atacar até 10 aminoácidos diferentes; como resultado são gerados os cetoácidos correspondentes e amoníaco (Gottschalk, 1986; Moat e Foster, 1988; Pereda e Perales, 2001). A desaminação não oxidativa ocorre por acção das desaminases e é facilitada pela presença de substituintes no átomo de carbono β . Por essa razão, os aminoácidos como a serina, a treonina, o ácido aspártico e a histidina são objecto desta desaminação (Fernández, 2000).

Os aminoácidos também podem sofrer reacções de transaminação, catalizadas por aminotransferases, ou transaminases. Nestas reacções, o grupo α -amina é transferido para o átomo de carbono de um α -cetoácido, que na maior parte dos casos é o α -cetoglutarato e

produz-se a aminação deste, que por esta via (via de Ehrlich) se transforma em L-glutamato. Entre as bactérias que possuem um elevado teor destas enzimas estão *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecalis*. O L-glutamato pode ser transformado de novo em α -cetoglutarato e NH₃, através de uma reacção de desaminação oxidativa catalizada por uma glutamato-desidrogenase. Por conseguinte, a partir de um aminoácido sujeito a uma reacção de transaminação, seguida de outra de desaminação oxidativa, pode obter-se um α -cetoácido, α -cetoglutarato e NH₃. Este processo é designado por transdesaminação (Lehninguer *et al.*, 1993). O α -cetoácido formado deste modo pode sofrer uma descarboxilação posterior para dar lugar ao aldeído ramificado correspondente (Olesen e Stahnke, 2000).

Na fracção volátil de muitos dos produtos de salsicharia curados foram encontrados aldeídos ramificados, como no bacon (Andersen e Hinrichsen, 1995), presunto curado (Hinrichsen e Pedersen, 1995; Ruiz *et al.*, 1998) e enchidos (Stahnke e Zeuten, 1992; Berdagué *et al.*, 1993). Estes compostos podem ter uma origem microbiana, uma vez que existem microrganismos capazes de os produzir a partir de certos aminoácidos (Hinrichsen e Pedersen, 1995; Møller *et al.*, 1998; Masson *et al.*, 1999).

A quantidade de aldeídos ramificados pode ser influenciada pela microbiota que se inocula em determinado produto de salsicharia. Deste modo, as bactérias do género *Staphylococcus* mostraram ser mais eficazes na libertação daqueles compostos que *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* ou *Pediococcus pentosaceous* (Berdagué *et al.*, 1993). Enchidos inoculados com *Staphylococcus carnosus* apresentaram também teores de aldeídos superiores aos inoculados com *S. warneri* e *S. saprophyticus* (Berdagué *et al.*, 1993; Montel *et al.*, 1996). Contudo, o baixo pH dos produtos acabados de referir pode limitar a produção daqueles aldeídos, uma vez que as reacções associadas à sua produção ocorrem melhor a pH 8,0 do que a pH 5,8 (Masson, 1998).

O metabolismo fúngico pode também originar a produção de aldeídos através da transaminação; é originada uma imida que por descarboxilação forma o aldeído correspondente (Molimard e Spinnler, 1996). Estes compostos têm sido detectados tanto em meios de cultura (Börjesson *et al.*, 1990, 1993; Larsen e Frisvad, 1995; Jacobsen e Hinrichsen, 1996) como em produtos vegetais (Jelén e Wasdowicz, 1998), queijos (Molimard e Spinnler, 1996; Kubícková e Grosch, 1998a,b; Larsen, 1999) e produtos de salsicharia curados (Martín, 1999), inoculados ou contaminados por bolores.

A informação disponível leva a formular a opinião de que as reacções de degradação dos aminoácidos são independentes das reacções que afectam os lípidos, uma vez que os compostos originados nas primeiras (aldeídos ramificados, cetonas, álcoois e dimetildisulfureto) são diferentes dos originados nas segundas reacções (aldeídos não ramificados, alcanos, cetonas, álcoois, lactonas e furanos). Esta independência nas reacções de degradação sugere a possibilidade de influir ou modificar o aroma dos produtos de salsicharia curados, favorecendo um ou outro tipo de reacções mediante a selecção da matéria-prima adequada e um processo de adaptação tecnológica adequado (Berdagué *et al.*, 1993; Buscaillón *et al.*, 1993).

Outro grupo de compostos que se podem formar a partir dos aminoácidos é o das aminas. São bases orgânicas de baixo peso molecular que apresentam actividade biológica. Formam-se como resultado de processos metabólicos normais que ocorrem nos organismos vivos e, portanto, estarão também presentes nos alimentos. Para a formação de aminas são necessários aminoácidos precursores disponíveis, a presença de microrganismos, ou de enzimas capazes de descarboxilar aminoácidos e, finalmente, condições favoráveis para o crescimento destes microrganismos ou para a actuação das enzimas descarboxilantes (Rice *et al.*, 1976).

Na opinião de López (1997), as vias mais prováveis para a formação de aminas nos enchidos crus curados são a da descarboxilação de aminoácidos e a da aminação de aldeídos. Na primeira formam-se fundamentalmente poliaminas e, em muito menor proporção, monoaminas (Smith e Palumbo, 1983). As condições de a_w e pH baixo que prevalecem em muitos dos produtos de salsicharia, juntamente com a presença de aminoácidos, potenciam a formação de aminas (Straub *et al.*, 1991). A aminação de aldeídos é a via mais importante de formação de monoaminas em alimentos (Maier, 1970; López, 1997). Mediante esta via o hexanal gera hexilamina e o acetaldeído gera etilamina (Hartmann, 1967). Existem outras vias de formação de aminas, contudo são próprias de outros alimentos distintos dos enchidos (López, 1997).

Nos enchidos e em outros produtos de salsicharia podem formar-se aminas biogénicas, uma vez que ocorrem fenómenos proteolíticos que conduzem ao aparecimento de aminoácidos livres. No decurso da cura, há a possibilidade da microbiota característica destes produtos poder gerar aminas biogénicas ou, inclusivamente, podem desenvolver-se microrganismos contaminantes com actividade aminoácido-descarboxilante. Deste modo, tanto em enchidos como em outros produtos de salsicharia foram detectadas triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina (Dierick *et al.*, 1974; Spinelli *et al.*, 1974; Treviño *et al.*, 1997a,b; Bover-Cid *et al.*, 1999a,b). A presença de concentrações elevadas destas aminas pode afectar o sabor dos produtos. Em todo o caso, o aspecto mais importante é o risco que estes compostos representam para a saúde dos consumidores. A histamina e a tiramina podem dar lugar ao aparecimento de crises de hipertensão em pacientes submetidos a tratamentos com medicamentos inibidores da monoaminoxidase. A feniletilamina (Sandler *et al.*, 1974) e a tiramina (Hanington, 1983) foram relacionadas com o aparecimento de enxaquecas. As diaminas putrescina e cadaverina não se consideram tóxicas para indivíduos saudáveis, embora possam potenciar a toxicidade da histamina (Bjeldanes *et al.*, 1978). Não obstante, a putrescina e a cadaverina, em presença de nitritos, podem conduzir à formação de nitrosaminas (Hotchkiss *et al.*, 1977; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2003), estas sim com elevada acção cancerígena para os humanos.

As aminas biogénicas formam-se, principalmente, por descarboxilação bacteriana dos aminoácidos (Halász *et al.*, 1994; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2003). A tiramina, triptamina e feniletilamina resultam da descarboxilação enzimática dos aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina, respectivamente (Koehler e Eitenmiler, 1978; Bover-Cid *et al.*, 2001a). Por seu lado, a lisina, histidina e ornitina dão lugar à cadaverina, histamina e putrescina (Dierick *et al.*, 1974; Fernández, 2000). Esta última actua como precursor da espermina e da espermidina (Fernández, 2000).

Muitas enterobactérias e certos lactobacilos, pediococos e enterococos são particularmente activos na formação de aminas biogénicas. A actividade histidina descarboxilase está presente nos géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Lactobacillus* (Voigt e Eitenmiler, 1977; Pereda e Perales, 2001). Contudo, do ponto de vista toxicológico, poucas bactérias isoladas de alimentos evidenciaram ser formadoras de histamina de modo significativo (Fernández, 2000), constituindo o pescado uma excepção. Hammes *et al.* (1995), em trabalhos realizados com estirpes de *Staphylococcus carnosus*, não detectaram a formação de histamina, putrescina ou cadaverina. Martuscelli *et al.* (2000), em trabalhos levados a cabo com *Staphylococcus xylosus* isolados de enchidos curados, observaram produção de espermina, espermidina e, embora em menor concentração, de triptamina e tiramina. Não se detectaram bactérias lácticas produtoras de cadaverina (Dainty *et al.*, 1986; Fernández, 2000) e só em alguns casos formam putrescina, como *Lactobacillus brevis* (Zee *et al.*, 1988), ainda que este tenha um reduzido interesse tecnológico, por apresentar metabolismo heterofermentativo. Em enchidos fermentados

assume-se que as bactérias lácticas são a fonte de tiamina (Dierick *et al.*, 1974; Rice *et al.*, 1975; Santos-Buelga *et al.*, 1986; Bover-Cid *et al.*, 2001a,b), ocorrendo a sua formação, principalmente, durante a fase de fermentação (Fernández, 2000).

Os estudos de Hudson-Arnold e Duane-Brown (1978) demonstraram que o pH óptimo para que se produza a descarboxilação dos aminoácidos situa-se entre 2,5 e 6,5. Pode dizer-se, então, que as condições de pH e a_w baixos que prevalecem nos produtos de salsicharia fermentados, associados à presença de aminoácidos, favorecem a formação de aminas (Hálasz *et al.*, 1994; Straub *et al.*, 1994; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2003).

5.2.4.4 - Acção da proteólise na cor, textura, sabor e aroma dos enchidos

Embora a formação da cor típica dos enchidos crus curados não seja dependente da proteólise, a sua evolução adequada e a sua estabilidade podem ser afectados pela acção de enzimas proteolíticas. Com efeito, o processo de união entre a mioglobina e o óxido nítrico pode ser afectado, entre outros factores, pelo estado em que se encontre a mioglobina. Para se atingir uma cor desejável e estável, esta proteína deverá possuir ferro na forma reduzida e manter a estrutura proteica em estado nativo, sem nenhum tipo de desnaturação que modifique a configuração do grupo heme. Em todo o caso, experiências realizadas com proteases exógenas não evidenciaram alterações significativas na cor de enchidos crus curados, quer tenha sido medida de forma objectiva (CIE Lab), quer através de análise sensorial (Díaz *et al.*, 1997; Zapelena *et al.*, 1997a,b).

A acção das proteases sobre as proteínas musculares produz um amolecimento do produto, devido a alterações na estrutura proteica e nas ligações estabelecidas entre as proteínas e o tecido adiposo (Fernández, 2000; Gimeno *et al.*, 2000; Muguerza *et al.*, 2003). Em algumas ocasiões, quando a proteólise é excessiva, ocorrem defeitos na textura (Parolari *et al.*, 1994; Tabilo *et al.*, 1999) e sobrevém o aparecimento de sabores amargos e metálicos (Virgili, 1994; Virgili *et al.*, 1995). Trabalhos que estudaram o efeito da adição de proteases exógenas às massas de enchidos crus curados mostraram os efeitos negativos da proteólise intensa sobre a textura do produto final (Díaz *et al.*, 1997; Zapelena *et al.*, 1998).

Os aminoácidos e os péptidos formam parte da fracção de compostos não voláteis que contribuem para as propriedades sápidas e tácteis dos enchidos crus curados. Na realidade, a acção destes compostos sobre o sabor dos enchidos não é clara (Toldrá e Flores, 1998; Fernández, 2000), uma vez que, de um modo geral, apresentam limiares de detecção bastante altos (Kato *et al.*, 1989). Na opinião de Montel *et al.* (1998), os aminoácidos e os péptidos, para além de uma possível acção directa sobre o sabor, também actuam sinergicamente entre si e com outros componentes dos enchidos. Toldrá *et al.* (1992) e Toldrá e Flores (1998) informaram que a melhoria do aroma e do sabor do presunto curado poderia relacionar-se com o aumento dos níveis de aminoácidos livres. Neste sentido, Nishimura e Kato (1988), num estudo sobre o sabor do caldo de carne, indicaram que o aumento de aminoácidos livres e de péptidos estava relacionado com o incremento do sabor a "carne". Num trabalho posterior, Pereira-Lima (1996) assinalou que a intensidade do sabor a "caldo" dos extractos aquosos da carne de bovino está fortemente relacionado com o aumento do conteúdo de substâncias azotadas não proteicas, em especial com os níveis dos aminoácidos livres, lisina, ácido glutâmico, aspargina e metionina e dos dipéptidos carnosina e anserina. No entanto, em enchidos crus curados,

DeMasi *et al.* (1990) não obtiveram diferenças sensoriais entre produtos que tinham diferentes perfis de aminoácidos devido à inoculação de *Pediococcus pentosaceus* ou *P. acidilactici*.

No que concerne ao sabor, tanto em aminoácidos como em péptidos são identificados os quatro sabores primários: doce, salgado, ácido e amargo, para além do sabor designado por "umami" (Kato *et al.*, 1989; MacLeod, 1994; Fischer e Scott, 2000). "Umami" é um termo japonês que, na opinião de MacLeod (1994), significa delicioso e começou a utilizar-se para definir o sabor característico do glutamato monossódico e dos 5'-ribonucleótidos: IMP (inosina-5'-monofosfato) e GMP (guanosina-5'-monofosfato). Para MacLeod (1994), os dipéptidos que possuem ácido glutâmico em posição N-terminal também são responsáveis pelo sabor "umami". De acordo com Maga (1994), o termo "umami" é utilizado para descrever certos sabores que combinam, de modo leve e agradável, o salgado e o doce. Segundo Mega (1994), alguns autores consideram o "umami" como o quinto sabor básico.

Aminoácidos como glicina, alanina, serina, treonina, lisina, cisteína, metionina, aspargina, glutamina, prolina e hidroxiprolina estão associados ao sabor doce; outros, como histidina, arginina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptofano e tirosina são relativamente amargos (Kirimura *et al.*, 1969; MacLeod, 1994; Fernández, 2000). Alguns péptidos também estão relacionados com o sabor amargo, como os dipéptidos carnosina e anserina (MacLeod, 1994; Fernández, 2000). A maioria dos péptidos com L-aminoácidos hidrófobos possuem sabor amargo, o que pressupõe que o amargo estará associado ao carácter hidrófobo dos aminoácidos que constituem as cadeias laterais (Kato *et al.*, 1989). Por outro lado, os sais de sódio dos ácidos glutâmico e aspártico, contribuem para o sabor salgado da carne. A acidez é característica dos ácidos aspártico e glutâmico, da histidina e da aspargina. Os dipéptidos com sabor ácido possuem um ácido aminado ácido e outro neutro ou um ácido e outro aromático (MacLeod, 1994).

Os aldeídos, alcoóis e ácidos referidos no capítulo 5.2.3.2 desempenham um papel importante no aroma dos produtos de salsicharia fermentados, especialmente os aldeídos, por apresentarem limiares de detecção muito baixos (Stahnke, 1994; Molimard e Spinnler, 1996). Nos enchidos, os aldeídos 2- e 3-metilbutanal, em baixas concentrações, são responsáveis por aromas ácidos, a "queijo", a "diluente", a "manteiga", a "caramelo" e a "ranço" (Stahke, 1994; Meynier *et al.*, 1999). A importância dos dois aldeídos referidos deve-se ao facto de, juntamente com algumas cetonas e alguns alcoóis lineares, serem responsáveis pelo aroma e sabor a "maduro" que apresentam os enchidos e os presuntos curados (Careri *et al.*, 1993; Hinrichsen e Pedersen, 1995; Ruiz *et al.*, 1999; Stahnke *et al.*, 2000). Por outro lado, o 3-metilbutanal pode reagir com o sulfureto de amónio, que nos produtos de salsicharia é formado pela reacção entre o amoníaco e o H₂S para formar 3,5-diisobutil-1,2,4-triolato e 5,6-dihidro-2,4,6-triisobutil-4H-1,3,5-ditiazina, que também estão associados ao aroma a "curado" (Hemme *et al.*, 1982; Shu *et al.*, 1985; Gottschalk, 1986). Esta reacção, apesar de ser característica de produtos de salsicharia curados cozidos, como o bacon, por exemplo, também pode ocorrer em enchidos crus curados, uma vez que a reacção pode ocorrer a baixas temperaturas, inclusivamente a -5°C (Shu e Mookherjee, 1985).

Os ácidos 2-metilpropanóico, 2-metilbutanóico e 3-metilbutanóico transmitem aroma a "queijo" (Brennand *et al.*, 1989), para além de poderem transformar-se nos ésteres correspondentes, que produzem aromas frutados (Stahnke, 1994).

Alguns dos compostos formados a partir da degradação de aminoácidos contendo enxofre, como o dissulfureto de carbono e o dimetildissulfureto são responsáveis por aromas a "podre", sendo por essa razão indesejável a sua presença, tanto em carnes frescas como curadas (Dainty e Mackey, 1992; Montel *et al.*, 1998).

Quanto aos compostos resultantes da desaminação dos aminoácidos, o NH₃ apresenta um limiar de detecção muito baixo (5 mmol/kg) e, apesar do seu carácter básico, nos produtos fermentados é responsável por sabores ligeiramente salgados e ácidos (Kubíckova e Grosch, 1998a). Por outro lado, a importância dos α-cetoácidos não é conhecida com clareza (Urbach, 1997), contudo, através de reacções de oxidação e redução, podem originar aldeídos, alcoóis e ácidos de considerável importância, como o 2-metilpropanal, o 2-metilbutanal e o 3-metilbutanal e os respectivos alcoóis e ácidos (Jelén e Wasdowicz, 1998).

5.3 – Alterações microbiológicas

O interior da massa muscular que constitui a carne contém muito poucos microrganismos, ou não os contém em absoluto, embora tenham sido encontrados nos gânglios linfáticos, na medula óssea e, inclusivamente, na própria massa muscular. A partir dos gânglios linfáticos dos animais de carne vermelha já foram isolados estafilococos, estreptococos e outras espécies bacterianas pertencentes aos géneros *Clostridium* e *Salmonella*. Nestas condições, a contaminação importante é devida a causas externas e ocorre durante as operações de abate, de conservação e de desmancha e preparação das carcaças e das carnes (Frazier e Westhoff, 1993).

Ingram (1949), utilizou as designações “microbiota intrínseca” e “extrínseca” da carne para referir, respectivamente, os microrganismos presentes nos tecidos profundos de carcaças de animais sãos recém sacrificados e os que habitam a superfície dos mesmos animais. Este autor situa a origem da microbiota intrínseca, fundamentalmente, no intestino do animal. O aumento da permeabilidade da barreira intestinal durante a sangria e nos momentos que a antecedem, resultaria numa bacteriémia de abate, consequência do acesso à corrente sanguínea de microrganismos que se distribuiriam pelos tecidos profundos. Pelo contrário, a microbiota extrínseca proviria do ambiente onde as carnes eram processadas e contaminaria apenas a sua superfície.

Considerando a microbiota intrínseca, Ayres (1955) vai um pouco mais longe. Afirma que no animal vivo existe um equilíbrio entre contaminação microbiana dos tecidos e defesa dos mesmos. O mesmo autor sugere também que o acesso dos microrganismos aos tecidos profundos ocorre durante a sangria, ou em outras operações que se realizam próximas desta, como por exemplo o escaldão.

Na opinião de Gardner (1982), desde 1941, com Jensen e Hess, foram vários os autores que estudaram a origem da microbiota intrínseca, situando-a na maioria dos casos na invasão agónica intestinal já referida neste capítulo. Este mesmo autor admite que a medula óssea pode também ser fonte de contaminação interna.

Mackey e Derrik (1979) puseram em causa a teoria da invasão agónica intestinal (bacteriémia de abate) ao comprovar que, administrando a porcos e ovelhas, por via oral, estirpes de microrganismos marcados radioactivamente, estes, após o sacrifício, não eram detectados nos músculos. No entanto, se contaminassem intencionalmente com estes microrganismos os equipamentos de abate eles eram detectados nos músculos.

Jones *et al.* (1979a,b, 1988), e também Troeger e Woltersdorf (1986), em trabalhos realizados com porcos, apresentam como hipótese mais provável a ocorrência da invasão

agónica durante o escaldão e a partir da cavidade pulmonar e visceral. Através do sistema sanguíneo ou linfático produzir-se-ia a contaminação dos músculos.

Ainda a propósito da microbiota intrínseca, Jóciles *et al.* (1983) encontraram nas massas musculares profundas de pernas frescas de porco Ibérico destinadas ao fabrico de presunto, valores de microrganismos mesófilos totais de cerca de 10^2 u.f.c./g. Em pernis destinados ao fabrico de presuntos italianos, para microbiota idêntica, foram registadas contagens que variaram entre valores inferiores a 50 até 10^3 u.f.c./g (Giolitti *et al.*, 1971ab; Baldini *et al.*, 1977; Raczyński *et al.*, 1978).

Convém referir que esta contaminação interna poderá resultar da população microbiana de origem externa que migrou através dos vasos sanguíneos e linfáticos durante as operações de preparação das pernas frescas.

A microbiota extrínseca detectada nas massas musculares das pernas destinadas ao fabrico de presunto ibérico foi próxima de 10^5 u.f.c./g (Jóciles *et al.*, 1983). Para o caso do presunto italiano os valores indicados são de, aproximadamente, 10^3 u.f.c./g (Baldini *et al.*, 1977; Raczyński *et al.*, 1978).

Como consequência das distintas procedências dos microrganismos, são muitas as espécies microbianas que potencialmente podem contaminar as carnes. Frazier e Westhoff (1993), indicam como principais géneros bacterianos contaminantes das carnes *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxela*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Salmonella* e *Streptomyces*. Outros autores (Nottingham, 1982; Gardner, 1982; Dainty *et al.*, 1983) consideram ainda como géneros importantes *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Serratia* e *Staphylococcus*. De entre os bolores assumem particular importância as espécies dos géneros *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Geotrichum*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Monilia* (Frazier e Westhoff, 1993). Adiantam ainda estes autores que na carne podem ser encontradas, também, leveduras, principalmente asporogénicas, dos géneros *Candida*, *Torulopsis*, *Debaryomyces* e *Rhodotorula*. Contudo, para além das contaminações referidas no parágrafo anterior, outro tipo de microbiota pode ser encontrado nas carnes, resultado de contaminações ocorridas durante os processos de transporte e comercialização, assim como durante o período de conservação em casa do consumidor final.

A carne constitui um meio nutritivo muito favorável ao desenvolvimento microbiano, consequência do seu elevado teor em água, do seu pH próximo da neutralidade e da sua composição rica em nutrientes (Frazier, 1967; Carrascosa, 1989; Frazier e Westhoff, 1993). A relação existente entre hidratos de carbono e compostos azotados é muito baixa; como consequência, mesmo com a presença de microbiota ácido-láctica, o pH não decresce consideravelmente. Neste contexto, o crescimento e multiplicação dos microrganismos na carne é levado a cabo, fundamentalmente, a expensas dos seus componentes solúveis: carbohidratos, ácido láctico e aminoácidos (Carrascosa, 1989).

É do conhecimento comum que uma lenta refrigeração no período de *post-mortem* associada a períodos de conservação prolongados, sob refrigeração, contribuem para o desenvolvimento microbiano. Porém, parece oportuno citar Rosset (1982) e Santaolalla e Colmenero (2001) a propósito da acção dos ciclos de congelação-descongelação das carnes sobre a microbiota. Para estes autores, aquele ciclo poderá ser melhor tolerado pela microbiota gram-positiva devido à composição da sua parede celular. Considerando que as carnes destinadas ao fabrico de enchidos poderão, algumas vezes, estar sujeitas a ciclos de congelação-descongelação, este será outro dos factores a ter em conta para o entendimento da microbiologia destas matérias-primas.

Os microrganismos que se encontram na massa inicial dos enchidos desempenham um papel fundamental na sua qualidade. Alguns daqueles microrganismos intervêm no desenvolvimento das características sensoriais e no estabelecimento da salubridade dos enchidos, mediante diferentes reacções. Umas conduzidas por bactérias lácticas: fermentação de açúcares e acidificação da massa, outras conduzidas por micrococáceas: redução de nitratos e nitritos e ocorrência de fenómenos proteolíticos e lipolíticos. Em alguns tipos de enchidos também são úteis os bolores e as leveduras, que proporcionam protecção em relação à luz, ao oxigénio e à desidratação excessiva, podendo mesmo participar em reacções que determinam a qualidade organoléptica do produto final (Liepe, 1985; Pereda e Perales, 2001).

5.3.1 - Alterações na microbiota bacteriana

A população microbiana das massas frescas é constituída, fundamentalmente, pela população associada aos ingredientes e pelos microrganismos que lhe são intencionalmente adicionados, nos processos em que se recorre à utilização de culturas de arranque. De acordo com Lücke (1986, 1998), a carne fresca obtida em condições higiénicas contém originalmente uma população total que varia entre 10^3 e 10^4 u.f.c./cm² de superfície. Durante a conservação sob refrigeração e em condições de aerobiose, na sua maioria a microbiota é composta por bacilos Gram-negativos, oxidase-positivos e psicrotróficos, fundamentalmente *Pseudomonas* sp., ainda que também tenha sido descrita a presença de bactérias dos géneros *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Moraxela* e *Aeromonas*, entre outras (McMeekin, 1982; Gill, 1983). Também podem ser encontradas, embora em menor proporção, bactérias anaeróbias facultativas, como *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* e algumas enterobactérias. Os microrganismos Gram-positivos (bactérias lácticas, micrococáceas, *Bacillus* sp., entre outros) apenas se encontram em número reduzido (Lücke, 1984, 1998).

No início do processo de fabrico, a microbiota total nas massas não inoculadas com culturas de arranque situar-se-á entre 10^5 e 10^6 u.f.c./g. Estes valores serão aumentados até alcançarem as 10^8 u.f.c./ no final do período de fermentação. Estes valores são mantidos durante as primeiras semanas de cura, para diminuirem paulatinamente até ao final do processo (Sanz et al., 1988, Selgas et al., 1988; Nychas e Arkoudelos, 1990; Alvarez, 1994; Samelis et al., 1998). Durante os primeiros dias da fase de cura, as alterações na composição qualitativa da microbiota autóctone natural são complexas, uma vez que na massa inicial não há estabilidade tanto do pH como da a_w (Fernández, 2000). Nesta fase inicial do processo, que corresponde ao período da fermentação, ocorrem modificações na microbiota até ao estabelecimento de uma população microbiana favorável (Alvarez, 1994; Fernández, 2000). Contudo, podem desencadear-se processos de alteração quando as condições ambientais não são adequadas (Hechelman e Kasprowiak, 1991).

No fabrico de enchidos crus curados, a partir do momento em que as massas, já temperadas, são colocadas no interior da tripa, ocorrem modificações nas condições microambientais que favorecem a multiplicação de uma microbiota distinta da que predomina nas carnes frescas. A adição de agentes de cura (cloreto de sódio, nitratos, nitritos, açúcares nalguns casos) e de especiarias, a reduzida tensão de oxigénio na massa e a sua desidratação, criam condições de a_w , acidez e anaerobiose que, juntamente com a fumagem (caso se adopte esta operação), favorecem a referida modificação da microbiota (Alvarez, 1994; Pereda e Perales, 2001). A a_w baixa para valores da ordem dos 0,96-0,97 e

o oxigénio existente no interior da massa é rapidamente consumido (Rödel *et al.*, 1993). As pseudomonas, que são aeróbias e normalmente sensíveis ao sal e aos nitritos, são inibidas. Como resultado, cessa a acção destes microrganismos sobre os aminoácidos de que resultam, normalmente, compostos com enxofre responsáveis por aromas desagradáveis na carne. De modo semelhante, as enterobactérias tornam-se menos competitivas devido à redução da tensão de oxigénio, valor do pH e presença de sal. Como consequência das referidas modificações ambientais, a microbiota que se vai desenvolver no interior das massas será composta por microrganismos anaeróbios estrictos ou facultativos, Gram-positivos, mais resistentes ao decréscimo da a_w que a microbiota Gram-negativa (Domínguez *et al.*, 1989). Nestas condições, os microrganismos dominantes serão *Lactobacillus* spp., com destaque para *Lb. sakei*, anteriormente designado por *Lb. sake*, *Lb. plantarum* e *Lb. curvatus*; *Carnobacterium* spp.; *Weisella* spp.; *Staphylococcus* spp., com destaque para *S. xylosus*, *S. carnosus* e *S. saprophyticus*; *Micrococcus* spp.; *Kocuria varians*, anteriormente designada por *Micrococcus varians*; *Pediococcus* spp., destacando-se *P. acidilactici* e *P. pentosaceous*; *Enterococcus* spp.; *Bacillus* spp., destacando-se *B. subtilis*; *Leuconostoc* spp. e, em menor proporção, os géneros *Aerococcus* e *Lactococcus* (Lücke, 1986; Encinas *et al.*, 1996; Gonzalez-Fandos *et al.*, 1996; Coppola *et al.*, 1997; Stackebrandt *et al.*, 1997; Trüper e De Clari, 1997; Hammes e Hertel, 1998; Holzapfel, 1998; Silla-Santos, 1998).

A propósito do chouriço de carne português, Ribeiro (1986) refere que nas massas maturadas à temperatura ambiente a microbiota total pode superar as 10^6 u.f.c./g e é constituída essencialmente por *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, corineformes, *Lactobacillaceae* e por *Bacillaceae* aeróbios, não raramente também *Staphylococcus aureus*.

As condições ambientais verificadas no interior das massas no decurso do processo de cura promovem a inibição da microbiota alterante, como *Pseudomonas* e algumas enterobactérias, entre outras, e também de microrganismos patogénicos, como por exemplo, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp; *Campylobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Yersinia enterocolitica* (Asplund *et al.*, 1993; Bello e Sanchez-Fuertes, 1995; Hugas *et al.*, 1995; Morioka *et al.*, 1996; Little *et al.*, 1998; Nissen e Holck, 1998; Sameshima *et al.*, 1998; Cosansu e Ayhan, 2000; Gimeno *et al.*, 2001b; Castaño *et al.*, 2002; Hugas *et al.*, 2002; Työpponen *et al.*, 2003).

Entre os microrganismos de interesse tecnológico, a tendência geral indica um crescimento precoce das micrococáceas até valores que podem superar as 10^6 u.f.c./g (Selgas *et al.*, 1988; Hammes e Hertel, 1998; Samelis *et al.*, 1998; Roig-Sagués *et al.*, 1999). Posteriormente desenvolvem-se os lactobacilos, que podem atingir as 10^8 u.f.c./g, e cujo desenvolvimento é a principal causa do declínio das micrococáceas, por serem sensíveis à acidez (Burgos, 1981; Leuschner e Hammes, 1998; Sameshima *et al.*, 1998; Fernández, 2000; Erkkilä *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2002). Embora seja difícil generalizar, uma vez que existem diferenças consideráveis mesmo entre estirpes da mesma espécie, é comum a ideia de que a níveis baixos de pH e com baixas tensões de oxigénio os microrganismos predominantes são os pertencentes ao género *Lactobacillus*. Este género inclui mais de 50 espécies e algumas delas podem crescer em condições de refrigeração (Stiles e Holzapfel, 1997). No entanto, tem sido descrito que em certos enchidos franceses, italianos e húngaros, fabricados com nitratos, sem adição de açúcares e sem recurso à fumagem, o número de micrococáceas pode exceder o de lactobacilos (Ayroulet e Fournaud, 1976; Sarra *et al.*, 1982).

Os pediococos não constituem uma fracção importante da microbiota habitual dos enchidos fermentados. No entanto, dada a sua capacidade de sobreviver à liofilização, são

frequentemente utilizados como culturas de arranque, especialmente nos Estados Unidos da América (Hammes *et al.*, 1990; Santos *et al.*, 1998).

Os géneros *Leuconostoc* e *Weisella* parecem ser importantes em algumas variedades de enchidos gregos (Samelis *et al.*, 1994; Carrascosa, 2001).

5.3.2 - Alterações na microbiota fúngica

A carne pode ser contaminada por esporos de bolores procedentes do ar, água, instrumentos usados no abate e na preparação das carnes, da pele, dos conteúdos intestinais dos animais, onde podem alcançar valores de 10^6 u.f.c./g, e também dos ingredientes utilizados no fabrico dos enchidos, especialmente as especiarias (Llewellyn *et al.*, 1992; Refai *et al.*, 1993; Rosemberger e Weber, 1993; Cook, 1995).

Os géneros de bolores geralmente isolados de carnes frescas e de produtos de salsicharia são *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Thamnidium* (Moreau, 1979; Cook, 1995; Jay, 1996). Entre os bolores isolados de carnes cruas alteradas incluem-se *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. cyclopium* e *P. expansum*, não tendo sido detectados membros do género *Aspergillus* nestes produtos (López, 1997). Em 1989 Frisvad considerou como espécies importantes associadas às carnes *Penicillium brevicompactum*, *P. nalgiovense*, *P. verrucosum*, *P. glabrum*, *P. variabile* e *P. roqueforti*, *Aspergillus versicolor*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. restrictus* e *Eurotium* spp. No que se refere às leveduras, os géneros mais relacionados com as carnes são *Candida*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Bullera*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Trichosporon* e *Williopsis* (Jay, 1978; Frazier e Westhoff, 1993; Fernández, 2000).

Tanto os bolores como as leveduras estão presentes em pequenas quantidades nas massas de carne, estando o seu crescimento limitado à superfície do enchido por se tratarem de microrganismos aeróbios (Geisen, 1992). Deste modo, se a humidade ambiental não for demasiado baixa, nos enchidos não sujeitos a fumagem ou nos pouco fumados, pode aparecer uma microbiota superficial composta, essencialmente, por bolores e leveduras que toleram bem valores de pH e de a_w baixos. Na opinião de Andersen (1995), na microbiota superficial as leveduras predominam durante os primeiros tempos da cura dos enchidos, representando mais de 95% das colónias isoladas, para no decurso da segunda semana de cura haver uma relativa igualdade entre colónias de bolores e de leveduras. No final da cura, as leveduras representam menos de 5% em relação aos fungos totais.

Roncalés *et al.* (1991) examinaram o crescimento de fungos na superfície de enchidos durante 28 dias de cura. As contagens iniciais de bolores e leveduras situaram-se entre 10^2 e 10^3 u.f.c./cm², aumentando de forma acentuada nos primeiros 10 dias de cura e aos 25 dias alcançaram valores de 10^6 - 10^7 u.f.c./cm² para o caso dos bolores e de 10^5 - 10^6 u.f.c./cm² no caso das leveduras. Apesar do crescimento destes microrganismos estar associado à superfície dos enchidos, Grazia *et al.* (1986) observaram que os bolores inoculados em massas destinadas à produção de salame poderiam isolar-se do interior do enchido.

Os bolores isolados da superfície dos enchidos, de um modo geral pertencem aos géneros *Penicillium* e *Aspergillus*, embora por vezes também sejam identificados os

géneros *Cladosporium*, *Scopulariopsis*, *Alternaria* e *Rhizopus* (Leistner e Eckart, 1979; Pestka, 1986; Dragoni *et al.*, 1988). Entre as leveduras são destacados os géneros *Debaryomyces*, *Trichosporon*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Yarrowia* e *Torulopsis* (Dillon e Board, 1991; Encinas *et al.*, 2000; Osei Abunyewa *et al.*, 2000).

A presença de fungos na superfície de produtos de salsicharia como enchidos e presuntos apresenta efeitos favoráveis e outros desfavoráveis. Entre os primeiros está o seu efeito antioxidante, o estabelecimento de um microclima superficial, uma influência na aparência de alguns enchidos e as suas capacidades lipolítica e proteolítica. São indicados como efeitos desfavoráveis a sua acção no aumento do pH, a sua actividade antibiótica e a produção de micotoxinas (Lücke, 1986).

Os fungos que actuam na superfície dos enchidos reduzem a tensão de oxigénio, degradam peróxidos e a camada que aqueles microrganismos formam em alguns tipos de enchidos protege estes do efeito pró-oxidante da luz. Estas acções conduzem a uma inibição dos processos oxidativos e a uma estabilização da cor dos enchidos.

Por outro lado, os bolores, através do seu micélio, estabelecem um microclima superficial que controla a perda de água dos enchidos e presuntos, o que evita a formação de uma crosta superficial que impediria a normal desidratação dos produtos e contribui para que esta seja mais uniforme (Grazia *et al.*, 1986; Lücke, 1986; Shehata, 1998). Deste modo, os enchidos com cobertura de bolores secam de forma mais lenta e uniforme, o que contribui para a melhoria da qualidade (López, 1997).

A existência de bolores na superfície dos enchidos tem um efeito considerado positivo em certos países, sobretudo do sul da Europa. Em Portugal não existe a tradição de produzir enchidos com este tipo de microbiota superficial. Contudo, enchidos desta natureza são consumidos no nosso país, com origem, sobretudo, na Alemanha, França, Itália e Espanha.

Os enchidos curados com uma camada superficial de bolores desenvolvem um aroma característico que parece estar relacionado com a actividade enzimática destes microrganismos (López, 1997). O efeito das enzimas lipolíticas e proteolíticas dos bolores parece estar relacionado com o tipo de tripa utilizado. Deste modo, o micélio dos bolores pode atravessar a tripa natural, contactando directamente com a massa do enchido, facilitando-se desta forma a difusão das enzimas para o interior do produto. Pelo contrário, as tripas artificiais não constituirão um meio favorável ao desenvolvimento do micélio e são uma barreira para a difusão das enzimas. Com efeito, a presença de estirpes de bolores proteolíticos e lipolíticos, particularmente quando são utilizadas tripas naturais, poderá contribuir em maior ou menor medida para o desenvolvimento do sabor, aroma, aparência e conservação dos enchidos (Smith e Palumbo, 1983; Leistner, 1987; Roncalés *et al.*, 1991; Geisen, 1993).

Por outro lado, o aumento do pH durante a fase final da cura dos enchidos que apresentam bolores na sua superfície constitui um efeito desfavorável. Durante a fase de fermentação dos enchidos o pH diminui rapidamente de valores iniciais de 5,8-6,2 para valores de 5,2-5,4 decorridos 5 a 10 dias sobre o enchimento (Fernández, 2000). Nos enchidos curados com bolores, o pH aumenta até valores próximos de 7 (Lücke, 1986; Ordóñez *et al.*, 1995), possivelmente devido à utilização do lactato, do acetato e, cumulativamente ou em alternativa, à produção de amoníaco a partir da hidrólise das proteínas (Fernández, 2000).

Roncalés *et al.* (1991) estudaram o efeito das tripas natural e artificial na cura e na qualidade sensorial dos enchidos com cobertura de bolores e observaram que o pH dos enchidos com tripa natural foi significativamente mais elevado 10 dias após o enchimento

(cerca de 5,6) do que o dos enchidos em que se usou a tripa artificial (valores de 5,2-5,3). Grazia *et al.* (1986) estudaram parâmetros físicos e químicos de salames inoculados com 9 estirpes de *Penicillium* e uma estirpe de *Aspergillus*, isolados de algumas fábricas de enchidos. Após 30 dias de cura, os enchidos inoculados superficialmente com os bolores seleccionados, apresentaram valores de pH entre 6,0 e 6,5, enquanto que no produto testemunha, tratado com sorbato de potássio para prevenir o crescimento dos fungos, o pH foi de 5,3. Foi detectado amoníaco em todas as amostras. No entanto, somente 4 das estirpes apresentaram valores deste composto superiores aos da testemunha.

A produção de antibióticos é outro dos efeitos desfavoráveis que podem surgir pelo desenvolvimento de bolores. Com efeito, *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *P. nalgiovense* e outras estirpes deste género associadas a carnes fermentadas produzem penicilina (Glenn *et al.*, 1989; Geisen *et al.*, 1992). A presença de antibióticos nos alimentos é prejudicial para o Homem: provocam alterações na microbiota intestinal, induzem o desenvolvimento de estirpes resistentes, desencadeiam fenómenos alérgicos em indivíduos sensíveis e podem inibir ou destruir microrganismos de interesse tecnológico (Mitchell *et al.*, 1998).

A produção de micotoxinas será, provavelmente, o mais importante aspecto negativo na relação entre bolores e alimentos. As micotoxinas são metabolitos secundários elaborados por alguns bolores no final da fase exponencial de crescimento; constituem um grupo heterogéneo de compostos não polares de baixo peso molecular (50-500 Da), facilmente ionizáveis e por isso muito reactivos. Ao reagir com distintas moléculas das células eucariotas, dão lugar a efeitos tóxicos, mutagénicos e cancerígenos (Martín *et al.*, 1990; Apsimon, 1994; Leal e González de Mejía, 1997). Podem apresentar DL₅₀ similares aos tóxicos fortes, como o anidrido arsenioso (As₂O₃) ou o paratião (Fink-Gremmels *et al.*, 1989). As micotoxinas produzidas na superfície são compostos muito estáveis e podem difundir-se até ao interior do enchido, mesmo depois de eliminada a camada superficial de bolores que lhe deu origem (Leistner, 1984; López, 1997).

No entanto, existem vários estudos, citados por López (1997), que demonstraram que alguns bolores podem produzir micotoxinas *in vitro*, contudo são incapazes de produzi-las em produtos de salsicharia, ou se as produzem são em quantidades tão pequenas que vão desaparecendo ao longo da cura. O desaparecimento destas micotoxinas pode resultar da sua metabolização por alguns microrganismos, ou a processos oxidativos que possam sofrer, ou ainda a reacções que podem estabelecer com aminoácidos, particularmente os sulfurados, dando lugar a produtos não tóxicos (Pestka, 1986).

Alguns autores sugerem a utilidade dos bolores no desenvolvimento do aroma e sabor dos enchidos (Grazia *et al.*, 1986; Lücke, 1987), assim como para controlar o desenvolvimento de bolores toxicogénicos (Liepe, 1987). Nos finais dos anos 80 (século passado) houve tendência para a utilização de culturas de arranque de *Penicillium nalgiovense* (Fink-Gremmels *et al.*, 1987; El-Banna e Leistner, 1990) ou de *P. chrysogenum* (El-Banna *et al.*, 1987) e foi estudada a possibilidade de utilizar a engenharia genética para obter culturas não tóxicas de *Penicillium* spp. para utilização na indústria alimentar (Geisen *et al.*, 1987; Motilva *et al.*, 1991).

6 - Culturas de arranque

As culturas de arranque são culturas individuais ou mistas de estirpes seleccionadas que apresentam uma determinada actividade enzimática e que se adicionam em quantidades definidas para que transformem um substrato num produto alimentar com determinadas características (Liepe, 1985; Hammes e Hertel, 1998). Para García de Fernando *et al.* (1992) as culturas de arranque para enchidos são microrganismos viáveis que, ao multiplicar-se nos enchidos, melhoram a sua conservabilidade, controlam a sua salubridade microbiológica e potenciam a sua aceitabilidade, mantendo ou melhorando a sua qualidade nutritiva.

O início da utilização de culturas de arranque, ou *starters*, na produção de alimentos terá resultado da adição de parte do produto final à matéria-prima destinada ao fabrico de alimentos com características idênticas. As condições ambientais encarregar-se-iam de seleccionar a microbiota capaz de crescer nos diferentes substratos a transformar (Gilliland, 1985).

De acordo com Liepe (1985) a primeira cultura de arranque para a carne terá surgido em 1921, quando Kurk patenteou um processo de cura que utilizava estirpes de *Micrococcus* não putrefactivos, não patogénicos e nitrato-redutores. Ainda segundo o mesmo autor, posteriores patentes baseadas num não especificado bacilo para a cura da carne foram levadas a cabo por Drake, em 1928.

Em 1940, nos Estados Unidos da América, foram propostos *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* e *L. fermentum* para o fabrico de enchidos. Contudo as dificuldades na liofilização destas espécies levaram à redução do interesse sobre as mesmas (Novel, 1993). No mesmo ano e também nos E.U.A., Jensen e Paddock destacaram a acção positiva dos lactobacilos na produção de enchidos, designadamente no encurtamento do tempo de cura e na melhoria das características sensoriais daqueles produtos. Ainda nos E.U.A., em 1947 Castelli e Sisani conseguiram uma cura mais rápida em enchidos que haviam sido inoculados com a microbiota de outros que se encontravam num estado de cura mais avançado (Lücke, 1998).

As dificuldades iniciais na liofilização das espécies do género *Lactobacillus* levaram Deibel *et al.*, em 1961, a propor a utilização de *Pediococcus cerevisiae* como cultura de arranque (Liepe, 1985; Ramón *et al.*, 1992). Estes microrganismos não são correntemente associados a produtos cárneos, contudo possuem os requisitos pretendidos a uma cultura de arranque para enchidos, sem contudo terem capacidade para reduzir os nitratos (Robinson, 1983), apesar de serem nitritotolerantes. Deste modo, *Pediococcus cerevisiae* foi usada com muita frequência na produção de enchidos durante os anos 70 do século passado (Carrascosa, 1989). As estirpes desta espécie, além de exercerem um papel inibidor mediante a produção de ácido láctico, produzem outras substâncias, como ácidos orgânicos, antibióticos e bacteriocinas, que contribuiram para o aumento do interesse do seu uso no fabrico de produtos de salsicharia (Bacus e Brown, 1985a). Estes mesmos autores destacam a actividade antimicrobiana das estirpes do género *Pediococcus* em relação a *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum*.

Contudo, com a introdução no ano de 1968 das culturas de arranque congeladas na produção de enchidos, foi renovado o interesse pelas estirpes do género *Lactobacillus* (Bacus e Brown, 1985b; Bover-Cid *et al.*, 2001a; Hugas *et al.*, 2002). Recordamos que este interesse havia sido perdido pela falta de idoneidade do processo de liofilização na conservação daquelas estirpes microbianas. De acordo com Bacus e Brown (1985a), a

capacidade dos lactobacilos para crescerem a temperaturas inferiores à dos pediococos contribuiu para a expansão do seu uso. Tal como no caso dos pediococos, a adição às massas para enchidos de lactobacilos juntamente com açúcares fermentoscíveis assegura o predomínio destes microrganismos e o desejável decréscimo do pH (Bacus, 1984; Lücke, 1985; Liepe, 1986; Ramón et al., 1992; Hammes e Hertel, 1998).

Enquanto nos Estados Unidos da América os géneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* eram objecto de interesse para a tecnologia das carnes, na Europa a investigação foi dirigida com maior intensidade para o uso de estirpes da família *Micrococcaceae* como culturas de arranque (Liepe, 1985; Hammes e Hertel, 1998). A sua utilização realizou-se tanto na forma de culturas puras como na de culturas mistas, fundamentalmente com microbiota ácido-láctica (Coretti, 1977; Schiffner et al., 1978; Bacus e Brown, 1981; Bacus, 1984; Gökalp e Ockerman, 1985; Liepe, 1985; Lücke e Hechelmann, 1987; Ramón et al., 1992; Björkroth e Korkeala, 1997; Carrascosa, 2001).

Estirpes tanto do género *Micrococcus* como do género *Staphylococcus*, no início pela sua capacidade de produzir catalase e nitrato-redutase, foram paulatinamente assumindo importância no fabrico de enchidos e de outros produtos de salsicharia (Carrascosa, 1989). Posteriormente, para a selecção destes microrganismos foram valorizadas outras propriedades, como a redução de nitritos, a capacidade acidogénica, a capacidade proteolítica e a capacidade lipolítica (Liepe, 1985; Lücke e Hechelmann, 1987).

Na Europa, em 1955, Ninivaara introduziu a primeira cultura de arranque, uma estirpe do género *Micrococcus* (M_{53}), isolada de um enchido finlandês, a qual neste tipo de enchido promoveu uma melhoria na cor e no aroma e inibiu o crescimento de bactérias indesejáveis (Leistner, 1987; Lücke, 1998). De acordo com os mesmos autores, na continuação destes estudos foram encontrados outros géneros da família *Micrococcaceae*, benéficos pela produção de nitrato-redutase e pela formação de catalase. Esta, por decompor os peróxidos, previne a ocorrência de defeitos na cor e no aroma dos produtos de salsicharia fermentados. Entre estes microrganismos encontra-se a espécie *Staphylococcus carnosus*. Nurmi (1966) propôs a utilização de uma cultura de arranque para enchidos composta por *Lactobacillus plantarum* e por uma estirpe do género *Micrococcus* isolada por Pohja em 1960. Esta cultura de arranque mista provocou um decréscimo rápido no pH dos enchidos sem, no entanto, inibir a formação da cor e do aroma (Leistner, 1987).

Em menor escala que os grupos anteriores de microrganismos, embora com êxito assinalável, têm também sido utilizados para os mesmos fins estirpes de bactérias Gram-negativas. De entre estas destacam-se os géneros *Escherichia*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Spirillum* e *Vibrio* (Coretti, 1977; Petäjä, 1977; Carrascosa, 1989). Em Portugal, Ribeiro (1972) utilizou com sucesso estirpes do género *Vibrio* em salmouras destinadas ao fabrico de fiambre.

De um modo geral, a utilização de culturas de arranque na indústria da salsicharia fez-se devido ao interesse que suscitou o poder inibitório daquelas culturas em relação a microrganismos patogénicos ou de alteração (Gänzle et al., 1999; Callewaert et al., 2000; Bover-Cid et al., 2001a; Bredholt et al., 2001). Actualmente, acresce a este o interesse da possibilidade de incidir de forma controlada e constante nas características organolépticas do produto final. Deste modo, a selecção que é feita às estirpes microbianas é realizada considerando também a capacidade que elas têm para promover as referidas alterações sensoriais (Gilliland, 1985; Fink-Gremmels et al., 1988; Lücke, 1998; Montel et al., 1998; Elias et al., 2000).

Actualmente, na indústria da transformação das carnes os microrganismos utilizados como culturas de arranque pertencem a quatro grandes grupos que, por ordem de importância são as bactérias lácticas, as micrococáceas, os bolores e as leveduras

(Carrascosa, 2001). Os primeiros dois grupos referidos são utilizados para inoculação das massas, enquanto os dois últimos são aplicados na inoculação superficial dos enchidos. As espécies microbianas utilizadas como culturas de arranque são apresentadas no Quadro 5.

Quadro 5 – Espécies microbianas utilizadas como culturas de arranque em produtos cárneos.

Grupo microbiano	Espécie microbiana
Bactérias lácticas	<i>Lactobacillus plantarum, L. curvatus, L. sakei, L. casei, L. acidophilus, L. alimentarius, Pediococcus cerevisiae, P. acidilactici, P. pentosaceus</i>
Micrococáceas	<i>M. auranticus, M. conglomeratus, Staphylococcus carnosus, S. xylosus, S. simulans, S. saprophyticus, S. equorum, Kocuria Kristinae, K. varians</i>
Actinobactérias	<i>Streptomyces griseus, Bifidobacterium sp.</i>
Halomonadáceas	<i>Halomonas elongata</i>
Enterobactérias	<i>Aeromonas sp.</i>
Bolores	<i>Penicillium nalgiovense, P. chrysogenum, P. candidum, P. camembertii, P. roquefortii, P. canescens, P. simplicissimum, P. micznski, P. olsonii, P. frequentans, P. expansum, P. verrucosum, P. janthinellum, P. cyclopium</i>
Leveduras	<i>Debaryomyces hansenii, D. kloeckerii, D. cantarellii, D. pfaffii, Candida famata</i>

Fonte: adaptado de Hammes e Hertel (1998), Carrascosa (2001).

Os microrganismos que constituem as culturas de arranque para os produtos cárneos encontram-se habitualmente nas carnes frescas e nos seus transformados, contudo não nas quantidades requeridas para assegurarem as melhorias qualitativas que se pretendem alcançar com o uso daquelas culturas microbianas. Por outro lado, a utilização de culturas de arranque no processamento da carne apresenta, face a outros alimentos, alguns inconvenientes. Com efeito, as matérias-primas utilizadas no fabrico de produtos de salsicharia não são estéreis, pelo que a cultura de arranque, para realizar a sua função, terá de competir com os outros microrganismos presentes no substrato, incluindo alterantes e presumivelmente patogénicos. Um outro inconveniente prende-se com a dificuldade de homogeneizar o inóculo no substrato, problema que não ocorre em alimentos fermentados líquidos como, por exemplo, leite fermentado, vinho ou cerveja (Carrascosa, 2001).

Robinson (1983) resume a acção das culturas de arranque utilizadas na produção de alimentos em quatro pontos fundamentais: melhoria da segurança do processo, redução do tempo de produção, contribuição para a qualidade do produto e aumento do seu tempo de conservação. Bacus e Brown (1981) precisam que a utilização de culturas de arranque contribui para a constância da qualidade do produto final e opinam que a dominância numérica dos microrganismos que constituem a cultura de arranque contribui para o aumento da segurança do processo.

Para Jessen (1998), os microrganismos devem cumprir determinados requisitos para que possam ser utilizados como culturas de arranque, designadamente: ¹⁾ não apresentar qualquer tipo de toxicidade ou patogenia; ²⁾ estar livres de impurezas, tanto as resultantes do metabolismo microbiano como outras, de natureza química, por exemplo, que possam representar risco para a saúde do consumidor ou que possam interferir negativamente no processo de fabrico; ³⁾ ter a faculdade de crescer e desenvolver uma actividade correcta e conhecida no produto e esta propriedade deve ser estável; ⁴⁾ apresentar resistência a fagos; ⁵⁾ serem estirpes estáveis, tanto fenotípica como genotípicamente. Carrascosa (1989, 2001) considera ainda como características que uma boa cultura de arranque deve apresentar a não produção de antibióticos que afectem a saúde humana, a halotolerância (crescimento rápido com concentrações de sal até 6%), a nitritotolerância (80-100ppm), serem psicrotróficos, homofermentativos, devem ter actividades metabólicas com interesse para as características finais do produto e, por conseguinte, não devem alterar de forma indesejável os substratos, isto é, não devem ser pronunciadamente proteolíticos nem lipolíticos nem devem produzir aromas e sabores desagradáveis, como consequência da actividade fermentativa.

Actualmente, as culturas de arranque para produtos cárneos utilizam-se, fundamentalmente, no fabrico de produtos fermentados, como são os enchidos; contudo também são usados como conservantes naturais durante o processamento da carne. Embora numa escala muito menor, estas culturas também são utilizadas no fabrico de presunto, com o objectivo da melhoria da qualidade higio-sanitária das salmouras, tanto as utilizadas para imersão como as destinadas à injecção das pernas (Carrascosa, 2001).

A inoculação das culturas de arranque deve assegurar uma concentração inicial, para cada uma das estirpes utilizadas, de pelo menos 10^6 u.f.c./g. Desta forma é garantida a predominância numérica destas culturas sobre os outros microrganismos que existem no substrato (Sameshima *et al.*, 1998; Bredholt *et al.*, 1999; Bover-Cid *et al.*, 2001a; Hugas *et al.*, 2002).

6.1 – Contribuição das culturas de arranque para a melhoria da qualidade dos produtos de salsicharia

A aplicação de culturas de arranque a produtos de salsicharia visa, fundamentalmente, assegurar e melhorar: ¹⁾ a qualidade higio-sanitária, mediante a inibição de microrganismos patogénicos e de microrganismos de alteração; ²⁾ a qualidade nutricional, mediante a digestão parcial ou total de substâncias alimentícias, ou da contribuição para a melhoria da saúde do consumidor (por exemplo através do efeito probiótico de alguns microrganismos); ³⁾ a qualidade sensorial, contribuindo para a estabilização da cor, o desenvolvimento de aromas e sabores característicos e o estabelecimento de alterações desejáveis na textura; ⁴⁾ a qualidade tecnológica, melhorando a velocidade e a homogeneidade da perda de água.

A manutenção e a melhoria dos factores de qualidade mencionados no parágrafo anterior devem-se às acções bioprotectora (inibição do crescimento de microrganismos patogénicos ou de alteração), probiótica (melhoria da saúde do consumidor mediante a produção de substâncias essenciais) e fermentativa (produção de metabolitos resultantes da transformação do substrato) que as culturas de arranque exercem sobre os substratos. (Daeschel *et al.*, 1990; Lücke, 1998)

O uso cada vez mais frequente de alimentos minimamente processados (por exemplo: pouco ácidos, pouco salgados ou submetidos a tratamentos térmicos moderados) incentivou a aplicação de culturas de arranque como bioprotectores com o objectivo de assegurar e melhorar a qualidade microbiológica da carne e dos seus transformados. Este efeito **bioprotector** contribui para assegurar e melhorar a qualidade higio-sanitária destes alimentos e exercem-no todos os grupos microbianos utilizados como culturas de arranque. Com efeito, estes microrganismos estarão melhor adaptados às condições de processamento e de utilização dos nutrientes do que os outros, ou então podem fazê-lo a uma maior velocidade, do que resulta uma maior taxa de crescimento e um mecanismo de exclusão competitiva. Por outro lado, alguns dos microrganismos que constituem culturas de arranque produzem metabolitos anti-microbianos, como ácido láctico, peróxidos e bacteriocinas (Jessen, 1998; Callewaert *et al.*, 2000; Hugas *et al.*, 2002).

O efeito **probiótico** das culturas de arranque consiste em melhorar a saúde e o bem-estar do consumidor, quer como consequência da produção de determinadas substâncias (vitaminas, por exemplo), quer como consequência da colonização do intestino humano por esta microbiota, equilibrando deste modo a microbiota intestinal. Este efeito contribui para a manutenção e melhoria da qualidade nutritiva da carne e dos seus transformados (Lücke, 1998).

Pelas suas actividades terapêuticas associadas com o equilíbrio da microbiota intestinal, várias espécies de *Lactobacillus* com origem no trato intestinal (estirpes de *L. acidophilus*, por exemplo) têm sido utilizadas com acção probiótica na produção de lacticínios (Hull *et al.*, 1992; Arihara e Luchansky, 1994; Itoh, 1994; Charteris *et al.*, 1997).

Com o objectivo de conseguir produtos cárneos mais saudáveis, várias bactérias ácido lácticas com acção probiótica (*L. gasseri* e *Bifidobacterium* spp.) têm sido aplicadas (Arihara *et al.*, 1996, 1998). Contudo, estas bactérias são relativamente sensíveis aos nitritos e ao cloreto de sódio. Porém, de entre 202 estirpes de *Lactobacilli* intestinais, 3 delas (*L. acidophilus* FERM P-15119, *L. rhamnosus* FERM P-15120 e *L. paracasei* subsp. *paracasei* FERM P-15121) apresentaram tolerância tanto aos nitritos como ao cloreto de sódio (Arihara *et al.*, 1997; Sameshima *et al.*, 1998).

No entanto, é necessária mais investigação para estabelecer com precisão o alcance do efeito probiótico, que tem um emprego ainda incipiente na indústria da transformação das carnes. Até ao momento, este efeito é exercido, fundamentalmente, por certas bactérias lácticas. Alguns dos exemplos documentados sobre o efeito probiótico das bactérias lácticas referidas no parágrafo anterior são: ¹⁾ alívio de sintomas de má digestão da lactose, ²⁾ imunomodulação, ³⁾ redução na duração do efeito do rotavírus diarreico, ⁴⁾ decréscimo da actividade enzimática bacteriana fecal, ⁵⁾ prevenção na ocorrência de certos tipos de câncro (Salminen *et al.*, 1999; Carrascosa, 2001).

O efeito **fermentativo** pode estar associado ao efeito bioprotector, na medida em que aquele efeito conduz à inibição do crescimento e da multiplicação de microrganismos patogénicos e de alteração. O efeito fermentativo assegura e melhora a qualidade sensorial dos produtos de salsicharia como consequência directa das actividades metabólicas das culturas de arranque que, de forma indirecta, asseguram e melhoram a qualidade tecnológica dos processos de fabrico (Hammes e Hertel, 1998).

6.2 - Bactérias lácticas

Sob a designação genérica de “bactérias lácticas” estão agrupados um número de microrganismos cuja principal característica é a produção de ácido láctico a partir de hidratos de carbono fermentiscíveis (Lemay *et al.*, 2000). O termo “*Bacterium acidi lactici*” foi proposto por Weigmann em 1899, contudo as primeiras referências a este tipo de bactérias são devidas a Hueppe (1884), que descreveu uma parte da microbiota responsável pela acidificação do leite e de produtos lácteos, tendo-a designado por “*Milchsauerbacillus*” (Abuja, 1993).

As bactérias lácticas encontram-se nos mais variados *habitats*, entre eles leite e produtos lácteos, carne e produtos cárneos, pescado, produtos vegetais, tracto gastrointestinal e urinário de pessoas e animais e, inclusivamente, águas residuais e esterco. Esta diversidade ecológica também origina uma diversidade morfológica e fisiológica entre as espécies deste grupo, o que se traduz numa grande dificuldade para estabelecer semelhanças que permitam reunir todas as espécies num grupo homogéneo do ponto de vista taxonómico (Frazier e Westhoff, 1993; Messi *et al.*, 2001).

6.2.1 - Características gerais

As bactérias lácticas são, na actualidade, o grupo microbiano mais utilizado como cultura de arranque em salsicharia (Carrascosa, 2001; Messi *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2002). As estirpes isoladas na maior parte dos casos de produtos cárneos fermentados pertencem a espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Hammes e Hertel, 1998; Sameshima *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1998; Bover-Cid *et al.*, 2001a).

A morfologia dos lactobacilos é variável, existindo desde bacilos compridos, rectos ou ligeiramente curvos até cocobacilos. O seu comprimento e curvatura dependem da idade da cultura, da composição do meio e da tensão de oxigénio. Como exemplo da variabilidade na morfologia apresentada por estes microrganismos poderemos citar *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que em meios de cultura líquidos ou em agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe) crescem em formações em espiral, uma vez que as células permanecem unidas após a divisão; no leite, estes microrganismos originam cadeias compridas e filamentosas (Abuja, 1993; Lemay *et al.*, 2000; Messi *et al.*, 2001).

As bactérias lácticas caracterizam-se principalmente por serem Gram-positivas, catalase-negativas, não esporuladas, imóveis, anaeróbias facultativas ou microaerófilas, ácido-tolerantes, não redutoras de nitrato e produtoras de ácido láctico, produto final da fermentação dos hidratos de carbono (Carrascosa, 2001). Contudo, Dodds e Collins-Thompson (1984) informam que para além da produção de ácido láctico, os lactobacilos têm a capacidade de eliminar nitritos do produto de salsicharia como consequência tanto da produção de ácido láctico como da elaboração de enzimas nitrito-redutoras, propriedades favoráveis ao fabrico de produtos de salsicharia curados. Para Rogosa (1961) e Abuja (1993) a redução de nitratos a nitritos só é detectada em meios com concentrações de glucose entre 0,1 e 1%. Com concentrações de glucose superiores, 2% por exemplo, a elevada produção de ácido láctico, com o consequente decréscimo do pH, inibe a redução. Abuja (1993) e Carrascosa (2001) informam que as bactérias lácticas crescem com valores de a_w compreendidos entre 0,93 e 0,98. No entanto, a coloração de Gram é a única característica que define este grupo com precisão, sendo excluídos do grupo todos os

microrganismos Gram-negativos (Carrascosa, 2001). As outras características, nem são exclusivas das bactérias lácticas nem são constantes dentro deste grupo de bactérias (Abuja, 1993; Santos *et al.*, 1998). A este propósito e a título de exemplo, apesar de se considerarem as bactérias lácticas catalase-negativas, são conhecidas desde há tempo as reacções catalase-positivas dos *Pediococcus* (Felton *et al.*, 1953) e inclusivamente de outros géneros, incluindo *Lactobacillus* (Whittenbury, 1964).

Do ponto de vista metabólico, os lactobacilos situam-se no limiar entre o metabolismo anaeróbio e aeróbio. Não possuem quinonas isoprenóides (à excepção de *L. yamamashiens* e *L. casei* subsp. *rhamnosus*) nem sistemas de citocromos com que realizar a fosforilação oxidativa típica do metabolismo aeróbio (Collins e Jones, 1981). No entanto, possuem oxidases e peroxidases que oxidam o NADH₂ utilizando o O₂ como receptor final de electrões. Apesar dos lactobacilos não possuirem catalases nem superóxido-dismutases também metabolizam os peróxidos mediante um sistema enzimático catalizado pelo Mg²⁺ (Götz *et al.*, 1980). Na opinião de Hammes e Hertel (1998) o carácter microaerófilo das bactérias lácticas é muito variável, considerando-se que é a tensão de oxigénio, mais que a anaerobiose, que favorece o desenvolvimento das bactérias lácticas.

A síntese de ácido láctico como produto final da fermentação dos hidratos de carbono é um dos principais critérios para a diferenciação fisiológica das bactérias ácido lácticas. Deste modo, estas bactérias são divididas em três grupos fisiológicos distintos de acordo com as suas diferenças enzimáticas (Abuja, 1993; Carrascosa, 2001): heterofermentativas obrigatórias, homofermentativas obrigatórias e homofermentativas facultativas.

Na opinião daqueles autores, as bactérias lácticas heterofermentativas obrigatórias possuem as enzimas glucose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, no entanto, carecem de frutosedifosfatoaldolase, originando como produtos finais da fermentação das hexoses CO₂ e ácido láctico. As bactérias deste grupo apenas podem utilizar as hexoses como fonte de hidratos de carbono.

O grupo das homofermentativas obrigatórias possui frutosedifosfatoaldolase, contudo carece das duas desidrogenases referidas no parágrafo anterior. Tal como as bactérias heterofermentativas obrigatórias, são incapazes de utilizar as pentoses como fonte de hidratos de carbono.

As bactérias homofermentativas facultativas possuem as duas desidrogenases (glucose – 6 – fosfato desidrogenase e 6 – fosfogluconato desidrogenase) mas metabolizam a glucose pela via de Embden-Meyerhof (glicólise). Este grupo utiliza as pentoses e corresponde às *Streptobacteria* de Orla-Jensen.

6.2.2 - Taxonomia

Orla-Jensen (1919), recorrendo a critérios morfológicos e fisiológicos, foi responsável pelas primeiras tentativas de demarcação deste grupo microbiano. Do ponto de vista morfológico o grupo estaria constituído por cocos e bacilos Gram-positivos, não esporulados e imóveis. Do ponto de vista fisiológico seriam microrganismos fermentativos com produção final de ácido láctico, catalase-negativos, microaerófilos ou anaeróbios, mesófilos e com complexas exigências nutritivas. Deste modo, aquele investigador estabeleceu seis géneros dentro do grupo das bactérias lácticas: *Betabacterium*, *Streptobacterium*, *Thermobacterium*, *Betacoccus*, *Streptococcus* e *Tetracoccus*. Aqueles mesmos critérios, todavia, constituem na actualidade as bases da classificação deste grupo microbiano.

A classificação das bactérias lácticas, segundo Kandler e Weiss (1986) é apresentada no Quadro 6. De acordo com esta taxonomia, os Grupos designados por I, II e III substituem as denominações de *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Betabacterium* estabelecidas por Orla-Jensen e passam a integrar o género *Lactobacillus*. No entanto, desde a publicação da última edição do manual de Bergey, em 1986, que contou com a colaboração de Kandler e Weiss, graças à flexibilidade taxonómica e modificações dos critérios de classificação já ocorreram novas alterações na taxonomia deste grupo.

Com efeito, em 1990 Schillinger e Holzapfel propuseram a criação de um novo género denominado *Carnobacterium*. Este novo género é integrado por espécies relacionadas com os lactobacilos embora com peculiaridades distintas, como são a capacidade de crescimento em agar acetato, mesmo com valores de pH elevados (8,5 – 8,9), e sintetizar ácido oleico em lugar de ácido *cis*-vaccénico. Actualmente, os anteriormente designados *Lactobacillus divergens* e *L. piscicola* denominam-se, respectivamente, *Carnobacterium divergens* e *C. piscicola*. *C. mobile* e *C. gallinarum* são os restantes componentes do novo género.

Por outro lado, por sugestão de Schleifer *et al.* (1985), os estreptococos lácticos (tipo N de Lancefield) foram separados dos restantes estreptococos, criando-se com aqueles um novo género denominado *Lactococcus*. Esta sugestão foi adoptada em 1986 com a validação do novo género pela "International Union of Microbiological Societies". Neste caso, os critérios empregues para estabelecer a nova classificação resultaram de tecnologias baseadas na hibridação de ácidos nucleicos, afinidade imunológica, composição lipídica e características químicas da parede celular bacteriana (Sandine, 1988).

Quadro 6 – Taxonomia das bactérias lácticas e número de espécies por género.

Género	Nº de espécies
<i>Lactobacillus</i>	
Grupo I: homofermentativos obrigatórios	16
Grupo II: heterofermentativas facultativas	11
Grupo III: heterofermentativas obrigatórias	18
<i>Streptococcus</i>	
Estreptococos piogénicos	5
Estreptococos orais	9
Enterococos (tipo D de Lancefield)	4
Estreptococos lácticos (tipo N de Lancefield)	2
Estreptococos anaeróbios	4
Outros estreptococos	5
<i>Pediococcus</i>	
	8
<i>Leuconostoc</i>	
	4
Nº total de espécies	86

Fonte: Garvie (1986); Hardie (1986); Kandler e Weiss (1986); Abuja (1993).

As espécies que constituem os géneros *Lactococcus* e *Carnobacterium* são enumeradas no Quadro 7. Actualmente, o grupo das bactérias lácticas é composto por microrganismos pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*.

Quadro 7 – Últimas modificações na taxonomia das bactérias lácticas.

Denominação actual	Denominação antiga
Género <i>Lactococcus</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordinae</i>	<i>Lactobacillus hordinae</i>
<i>Lactococcus garviae</i>	<i>Streptococcus garviae</i>
<i>Lactococcus plantarum</i>	<i>Streptococcus plantarum</i>
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Streptococcus raffinolactis</i>
Género <i>Carnobacterium</i>	
<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Lactobacillus divergens</i>
<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Lactobacillus piscicola</i>
<i>Carnobacterium mobile</i>	—
<i>Carnobacterium gallinarum</i>	—

Fonte: Sandine (1988); Schillinger e Holzapfel (1990); Abuja (1993)

6.2.3 - Contribuição das bactérias lácticas para assegurar e melhorar a qualidade dos enchidos

A tendência da utilização de bactérias lácticas como culturas de arranque no fabrico de enchidos seguiu, fundamentalmente, duas correntes, a aplicação em processos fermentativos rápidos e em processos de fermentação lenta (Lücke, 1998; Carrascosa, 2001).

Segundo os mesmos autores, a fermentação rápida, usada maioritariamente nos E.U.A., utiliza culturas de arranque que participam activamente na fase fermentativa, quando esta decorre entre 28 e 38°C de temperatura, originando enchidos com pH entre 4,6 e 5. Nestas condições a fase de fermentação é encurtada, podendo mesmo tardar apenas 6 a 8 horas. Deste modo, é minimizado o papel dos microrganismos que interferem no aroma e no sabor dos enchidos. Assim sendo, a diferenciação sensorial destes enchidos é feita fundamentalmente pelo sal e pelo tipo e quantidade de especiarias usadas na formulação. Nestes processos é frequente realizar um tratamento térmico posteriormente.

Na Europa, a maior parte das culturas de arranque é usada em processos de fabrico que adoptam a fermentação lenta. Nestes processos são usadas culturas lácticas de arranque, preferencialmente psicrotróficas, que se desenvolvem no período de fermentação, com a duração de 3 a 5 dias, a temperaturas geralmente não superiores a 25°C, e pH final de 5,2 – 5,6. Estas condições ambientais proporcionam o desenvolvimento de outros tipos de microrganismos, entre eles os que também contribuem para a cor, o aroma e o sabor dos enchidos (Hammes e Hertel, 1998; Montel *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 2004).

Em ambos os processos fermentativos referidos, as actividades metabólicas que as bactérias lácticas desenvolvem durante o processo de fabrico dos enchidos contribuem para assegurar e melhorar a sua qualidade, tal como é resumido no Quadro 8.

Quadro 8 – Contribuição das bactérias lácticas usadas como culturas de arranque para a manutenção e melhoria da qualidade dos enchidos.

Factor de qualidade	Efeito	Característica	Actividade metabólica
Higio-sanitário	Bioprotector	- Inibição de microrganismos patogénicos e de alteração	- Fermentação láctica - Produção de bacteriocinas - Produção de peróxidos
Nutricional	Fermentativo	- Melhoria da digestibilidade - Eliminação de nitritos	- Proteólise - Lipólise - Fermentação láctica
	Probiótico	- Melhoria da saúde do consumidor	- Presença ou crescimento dos microrganismos
Sensorial	Fermentativo	- Firmeza ao corte - Aroma e sabor - Cor	- Fermentação láctica - Fermentação láctica - Proteólise - Lipólise - Fermentação láctica - Pseudocatalase
Tecnológico	Fermentativo	- Redução do tempo de cura	- Fermentação láctica

Fonte: Adaptado de Carrascosa (2001).

Um dos aspectos mais importantes relacionados com a actividade das bactérias lácticas nos alimentos é a sua contribuição para assegurar e melhorar a sua qualidade higio-sanitária, mediante o seu efeito bioprotector (Björkroth e Korkeala, 1997; Bromberg *et al.*, 2003a,b). Com efeito, as bactérias lácticas, ao competirem pelos mesmos nutrientes com os microrganismos indesejáveis, inibem o seu crescimento por exclusão competitiva. Por outro lado, o ácido láctico produzido vai inibir o crescimento de microrganismos patogénicos e de alteração, que são maioritariamente ácido-sensíveis. Estas bactérias

também produzem peróxidos que, por serem fortemente oxidantes, têm acção nefasta sobre as bactérias Gram-negativas. Outras bactérias lácticas produzem diacetilo a partir de citrato, sobretudo a pH baixo. Deste modo, é inibido o desenvolvimento de algumas bactérias Gram-negativas por interacção entre o diacetilo e o metabolismo da arginina, impedindo a utilização deste aminoácido (Hugas, 1998).

Algumas estirpes de bactérias lácticas, por exemplo *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus*, produzem também bacteriocinas. Assim, é reforçado o efeito bioprotector do ácido láctico e, consequentemente, a qualidade higio-sanitária dos enchidos. As bacteriocinas são substâncias de natureza proteica, termoestáveis, não tóxicas, não imunogénicas que são hidrolisadas pelas proteases gástricas. Actuam promovendo a lise das células sensíveis, normalmente do mesmo género ou filogeneticamente próximas (Ramón *et al.*, 1992; Carrascosa, 2001). Algumas bacteriocinas são activas sobre microrganismos patogénicos como *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, entre outros (Sameshima *et al.*, 1998; Bredholt *et al.*, 1999; Leroy *et al.*, 2001; Swetwiwathana *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2002; Bromberg, 2003a,b).

Quando as bactérias lácticas são usadas como bioprotector, não têm necessariamente que multiplicar-se e realizar a transformação do substrato mediante o seu efeito fermentativo. É o caso da inoculação superficial destas bactérias, por imersão ou através de aerossol, sobre carcaças e outros produtos não fermentados que se conservam por refrigeração, embalagem sob vácuo ou sob atmosfera modificada. Nestas situações, se falhar o sistema de conservação as bactérias lácticas inoculadas crescerão e, sem realizarem uma fermentação que transforme as características do substrato, impedem, dentro de certos limites, o desenvolvimento de microrganismos patogénicos ou de alteração. Também são usadas estirpes termodúricas que permitem realizar tratamentos térmicos menos drásticos e evitam no produto a germinação de microrganismos esporulados que tenham resistido ao tratamento térmico (Bredholt *et al.*, 1999; Acton *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2001; Bredholt *et al.*, 2001).

Através da sua actividade proteolítica e lipolítica, as bactérias lácticas contribuem para assegurar e melhorar a qualidade nutricional mediante a sua acção fermentativa, embora de forma não muito relevante. Com efeito, a actividade proteolítica e lipolítica melhora escassamente a digestibilidade das proteínas e dos lípidos. Por outro lado, a descida do pH favorece a eliminação do nitrito residual (Lücke, 1998).

O efeito probiótico das bactérias lácticas tem uma acção positiva sobre a saúde e o bem estar dos consumidores. Algumas estirpes podem aumentar a disponibilidade de minerais, produzir aminoácidos essenciais ou vitaminas, eliminar toxinas e pré-digerir biopolímeros. *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* e, recentemente, *Bifidobacterium bifidum* são utilizados como culturas de arranque em produtos cárneos probióticos (Sameshima *et al.*, 1998; Lemay *et al.*, 2000; Hammes *et al.*, 2001).

As bactérias lácticas utilizadas como culturas de arranque para produtos cárneos incidem favoravelmente sobre a qualidade sensorial. O ácido láctico, por si só, além de criar condições de acidez que favorecem as reacções de formação da cor, confere um sabor característico aos produtos (Toldrá e Flores, 1998).

Também como consequência da acidez, é produzida uma certa desnaturação e insolubilização das proteínas que acelera a aquisição de uma textura adequada, conferindo ao produto uma maior e melhor firmeza ao corte. Algumas bactérias lácticas usadas como culturas de arranque possuem pseudocatalase, enzima hemodependente que contribui para o controlo do excesso de peróxidos, evitando fenómenos de rancificação das gorduras e

estabilizando as reacções de formação da cor que o excesso de peróxidos entorpece (Montel *et al.*, 1998; Hammes e Hertel, 1998).

Há estirpes de bactérias lácticas que excepcionalmente reduzem os nitratos, contudo isso só acontece quando os níveis de açúcar são muito baixos e o pH é superior a 6, circunstância difícil de ocorrer durante o fabrico dos enchidos. Muito poucas estirpes têm capacidade para diminuir o teor de nitritos, mediante a oxidação de iões lactato.

A acidificação das massas aproxima o pH do ponto isoeléctrico das proteínas. Como consequência estas retêm menos água e esta é libertada com maior facilidade, melhorando deste modo a qualidade tecnológica dos produtos e, indirectamente, a sua qualidade higio-sanitária, pela concomitante redução da a_w .

As espécies de lactobacilos usadas mais frequentemente como culturas de arranque para produtos de salsicharia são, fundamentalmente, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. sakei*, *L. curvatus* (Coretti, 1977; Robinson, 1983; Bacus, 1984; Liepe, 1985; Hammes, 1986; Carrascosa, 1989).

6.2.4 - Actividade antimicrobiana das bactérias lácticas

A actividade antimicrobiana das bactérias lácticas é conhecida há algum tempo, embora de modo empírico. Actualmente, pensa-se que o primeiro mecanismo antimicrobiano exercido pelas bactérias lácticas poderá ser o da simples competição pelos nutrientes (Hugas *et al.*, 2002). Deste modo, as bactérias lácticas, adaptadas ao substrato e de crescimento rápido, esgotariam os nutrientes críticos presentes no substrato, prejudicando a existência de outros microrganismos. Este sistema não é exclusivo das bactérias lácticas, sendo-o no entanto os que passamos a citar.

6.2.4.1 - Actividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos

Como consequência do seu metabolismo fermentativo, as bactérias lácticas sintetizam ácidos orgânicos, o que resulta numa notável descida do pH do meio. De acordo com Beuchat e Golden (1989) e Gänzle *et al.* (1999), a acção antimicrobiana dos ácidos orgânicos pode dever-se a três factores: ¹⁾o efeito antagonista da descida do pH, que inibe o desenvolvimento de outros microrganismos ácido-sensíveis; ²⁾a actividade antagonista da forma não dissociada do ácido que penetra no interior das células e inibe algumas reacções enzimáticas metabólicas importantes; ³⁾a acção específica dos ácidos orgânicos. Com efeito, os ácidos orgânicos aumentam a sua actividade anti-microbiana à medida que aumenta o comprimento da cadeia. Não obstante, a escassa lipossolubilidade dos ácidos orgânicos com mais de 8 átomos de carbono diminui a sua actividade em relação às bactérias Gram-negativas (Baird-Parker, 1979; Hugas, 1998).

Os ácidos orgânicos de cadeia curta, como o láctico e o acético, são lipofílicos quando não estão dissociados, pelo que podem penetrar no citoplasma bacteriano diminuindo o pH intracelular. Deste modo, os substratos enzimáticos são alterados e, consequentemente, são inibidas funções metabólicas essenciais, como a fosforilação oxidativa (Abuja, 1993).

Na opinião de Baird-Parker (1979) o ácido acético será mais inibidor sobre bolores e leveduras que o láctico. Uma possível explicação para aquela afirmação reside no facto de a pH 4,0-4,6, valores de pH normais nos substratos onde se desenvolvem bactérias lácticas, o ácido acético estar entre 2 e 4 vezes menos dissociado que o ácido láctico (Lindgren e Dobrogosz, 1990). Por outro lado, os ácidos acético e láctico podem actuar sinergicamente inibindo o crescimento de *Salmonella* (Rubin, 1978; Abuja, 1993; Samelis et al., 2003) e leveduras (Moon, 1983; Fernández, 2000), uma vez que o baixo pH resultante da presença de ácido láctico aumenta a concentração de ácido acético não dissociado. Outros ácidos produzidos pelas bactérias lácticas em diversos substratos, caso dos ácidos fórmico, cítrico e málico, têm uma actividade antimicrobiana menor que o acético e o láctico (Abuja, 1993; Hammes e Hertel, 1998; Kang et al., 2001).

6.2.4.2 - Actividade antimicrobiana de componentes inorgânicos

As bactérias lácticas também produzem outros compostos antimicrobianos como CO₂, H₂O₂ e diacetilo (Santos et al., 2001).

O CO₂ produzido como consequência do metabolismo heterofermentativo obrigatório exerce a sua acção antibacteriana criando um ambiente anaeróbio, por substituição do O₂, que impede o desenvolvimento dos microrganismos aeróbios estritos (Eklund, 1984; Abuja, 1993; Lücke, 1998).

Algumas bactérias lácticas sintetizam H₂O₂, em presença de oxigénio, graças à actividade de determinadas flavoproteina-oxidases ou NADH-peroxidases (Kandler e Weiss, 1986). O peróxido de hidrogénio produzido é acumulado no meio exocelular uma vez que as bactérias lácticas carecem de catalase. A produção de H₂O₂ pelas bactérias lácticas depende da estirpe produtora e da quantidade de oxigénio presente (Hugas et al., 2002). O efeito bactericida do H₂O₂ é atribuído à sua potente acção oxidante e à consequente destruição de estruturas moleculares básicas das proteínas celulares (Abuja, 1993; Carrascosa, 2001).

Há bactérias lácticas presentes no leite que activam o sistema antibacteriano da lactoperoxidase (Björck, 1985) devido à síntese, em aerobiose, de H₂O₂ (Carlsson et al., 1983). A actividade antimicrobiana do H₂O₂ é variável, não afectando praticamente as bactérias Gram-positivas; contudo as Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp. são muito sensíveis à sua actividade (Björck, 1985). Crê-se que o efeito antimicrobiano do sistema lactoperoxidase se deve à oxidação dos grupos –SH de algumas enzimas metabólicas vitais, como a hexoquinase, a aldolase e a gliceraldeído-3P desidrogenase (Abuja, 1993).

Algumas espécies de bactérias lácticas produzem diacetilo, a partir do citrato, seguindo a via do piruvato, que é o metabolito intermediário (Jay, 1982; Kandler, 1983). Apesar do metabolismo das hexoses inibir a produção de diacetilo, este é acumulado no meio e vai gerar o aroma que caracteriza certos produtos, como a manteiga. O diacetilo exerce ainda uma actividade inibidora, favorecida quando o pH do meio é baixo, sobre um grande número de microrganismos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos (Jay, 1982). Na opinião de Jay (1996), o diacetilo inibe o desenvolvimento dos microrganismos Gram-negativos ao interferir no metabolismo da arginina, impedindo a utilização deste aminoácido por aqueles microrganismos.

Por outro lado, *Lactobacillus reuterii* é o único lactobacilo, e provavelmente a única bactéria, que produz reuterina, libertando-a no meio exocelular como consequência do metabolismo anaeróbio do glicerol (Abuja, 1993; Lücke, 1998).

A reuterina é uma substância antimicrobiana activa em relação a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras, bolores e protozoários (Axelsson *et al.*, 1989). Quimicamente é uma mistura homogénea de monómeros, monómeros hidratados e dímeros cíclicos do aldeído 3-hidroxipropiónico que procedem do glicerol mediante uma reacção catalizada por uma coenzima da glicerol-desidratase, dependente da vitamina B₁₂ (Talaricco e Dobrogosz, 1990). Desta forma, *L. reuterii* é a única bactéria conhecida capaz de utilizar o glicerol como receptor alternativo de hidrogénio durante a fermentação dos hidratos de carbono. Assim, é produzida uma maior quantidade de aldeído 3-hidroxipropiónico que é libertado no meio extracelular, onde manifesta a sua actividade antimicrobiana (Talaricco *et al.*, 1988). Entre os microrganismos sensíveis a esta substância encontram-se *Salmonella* sp., *Shigella* sp., clostrídeos, estafilococos, listérias, candidas e tripanosomas (Jessen, 1998).

Para além das actividades antimicrobianas dos ácidos orgânicos e dos componentes inorgânicos algumas bactérias lácticas produzem também bacteriocinas, tal como se referiu no capítulo 6.3.3.

6.3 - Micrococáceas

As micrococáceas, na sua grande maioria, são redutoras de nitratos, crescem bem com concentrações de sal de 10% e são produtoras de catalase. Contudo, não crescem bem em anaerobiose, embora os estafilococos sejam anaeróbios facultativos. A temperatura mínima para o desenvolvimento das estirpes de *Micrococcaceae* é próxima dos 10°C, ou ligeiramente abaixo (López, 1997).

Em termos gerais, quando as micrococáceas são inoculadas nas massas para enchidos não se desenvolvem ou fazem-no muito lentamente (Lücke e Hechelman, 1988; Hammes e Hertel, 1998). Por essa razão, para conseguir uma acção destes microrganismos sobre as características finais dos enchidos é necessário adicioná-los em quantidade suficiente para que possam exercer a sua função. Para tal, a concentração de micrococáceas deve situar-se entre 10⁶ e 10⁷ u.f.c./g (Hammes *et al.*, 1985; Garcia-Varona *et al.*, 2000; Bover-Cid *et al.*, 2001a). Contudo, deve ter-se sempre em consideração as actividades enzimáticas específicas das estirpes utilizadas.

Por outro lado, as micrococáceas, por serem produtores de lipases e de proteases endo e exocelulares, parecem ter um papel decisivo na libertação de algumas das substâncias responsáveis pelo aroma e pelo sabor característico dos enchidos. Tem especial interesse a sua especificidade em relação a triacilglicéridos de ácidos gordos de cadeia longa, que são os maioritários na gordura de suínos (Berdagué *et al.*, 1993; Selgas *et al.*, 1993; Montel *et al.*, 1998).

6.3.1 - Características gerais e taxonomia

A família *Micrococcaceae* engloba 4 géneros: *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Todas as espécies desta família podem crescer na presença de 5% de NaCl e a maioria fá-lo a concentrações de 10 a 15%. Apresentam-se com interesse particular na indústria de carnes os géneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*, tendo propriedades tecnológicas e importância semelhante tanto na cura de enchidos como de presuntos (Lücke, 1985; Selgas, 1985; Comi *et al.*, 1992). Lücke (1986) adianta ainda que nos enchidos as condições de anaerobiose parecem favorecer o crescimento de espécies do género *Staphylococcus*. Contudo, verifica-se que nos enchidos fumados as espécies do género *Micrococcus*, por serem aeróbias, encontram-se mais à superfície, apesar de mais expostas aos componentes do fumo. Estes dois últimos géneros referidos possuem diversas características morfológicas e fisiológicas comuns. São cocos, Gram-positivos. São imóveis, isolados, dispostos aos pares, em cadeias curtas ou em cachos. São halotolerantes e psicrotróficas, capazes de crescer em meios com valores de a_w próximos de 0,90 e à temperatura de 10°C, ou mesmo um pouco inferior, não formam peróxido de hidrogénio e são catalase positiva. Esta última característica permite diferenciá-los da família *Streptococcaceae* (Selgas, 1985; Frazier e Westhoff, 1993; Carrascosa, 2001).

Os géneros *Micrococcus* e *Staphylococcus* apresentam uma distinção sumária entre si pelo tipo respiratório e pela sua acção sobre a glucose. Deste modo, o género *Micrococcus* é aeróbio, não tendo acção sobre a glucose ou oxidando-a; por outro lado, o género *Staphylococcus* é anaeróbio facultativo e fermenta a glucose (Rosário, 1989; Hugas e Roca, 1997; Carrascosa, 2001), sem produção de gás (Selgas, 1985). No entanto, Carrascosa (2001) informa que os micrococos, pelo facto de possuirem nitrato-redutase podem realizar metabolismo anaeróbio, pelo que apresentam uma certa capacidade de crescimento no interior de enchidos e presuntos sempre que haja nitratos.

As espécies do género *Staphylococcus* têm metabolismo oxidativo e fermentativo. Podem utilizar um grande número de carboidratos, especialmente em condições de aerobiose, com produção de ácido. Em anaerobiose produzem principalmente ácido láctico, a partir da glucose, e em aerobiose produzem ácido acético e pequenas quantidades de CO₂. São aeróbios facultativos mas crescem muito melhor em condições de aerobiose. A maioria das estirpes cresce na presença de 15% de NaCl. São resistentes à lisozima (100µg/ml) e produzem catalase. Produzem lipases e proteases (Selgas, 1985; Miralles *et al.*, 1996; Hugas e Roca, 1997).

Nas espécies do género *Micrococcus* o metabolismo é estritamente oxidativo. Oxidam a glucose principalmente a acetato ou, finalmente, a CO₂ e água. São produtoras de catalase. São aeróbios estritos, capazes de crescer na presença de mais de 5% de NaCl (Selgas, 1985; Miralles *et al.*, 1996).

A utilização daqueles dois géneros na cura de produtos de salsicharia interfere favoravelmente no desenvolvimento e estabilização da cor pela acção nitrato-redutásica. Apesar da sua grande importância em produtos curados com nitrato, a sua acção não deixou de ser exercida nas curas rápidas, com nitrito, onde ocorre uma certa formação de nitrato (Lücke, 1986; Brankova *et al.*, 1987; García-Varona *et al.*, 2000). Por possuirem actividade catalásica, aqueles microrganismos desdobram o peróxido de hidrogénio formado pela microbiota láctica que a catalase tissular seria incapaz de desdobrar por insuficiência quantitativa ou por inactivação térmica nos produtos cozidos. Esta acção reflecte-se na estabilidade da cor, evitando o esverdeamento, e contribui para melhorar o aroma pela diminuição da rancificação (Lücke, 1986; Barrière *et al.*, 1998).

Em estudos realizados com micrococos isolados de produtos cárneos, Dineva *et al.* (1987) verificaram que a actividade catalásica encontra óptimas condições nos enchidos devido à redução do pH e à presença de cloreto de sódio, ácido ascórbico e glucose. Opinião oposta é apresentada por Lücke (1986), ao referir que a actividade catalásica é exercida por *Micrococcaceae* em enchidos pouco ácidos e no final da cura, fase em que, devido à acção tamponizante dos aminoácidos resultantes da proteólise, ocorre uma subida do pH.

Estirpes do género *Micrococcus* e do género *Staphylococcus*, pela sua capacidade de produzir catalase e nitrato-redutase, foram alcançando importância no fabrico de produtos de salsicharia. Posteriormente, foram valorizadas outras propriedades, como as suas capacidades acidogénica, proteolítica e lipolítica (Liepe, 1985; Lücke, 1985; Lücke e Hechelmann, 1987; Hugas e Roca, 1997; González-Fernández *et al.*, 1998; Zanardi *et al.*, 2004).

A família *Micrococcaceae*, contaminante habitual da carne fresca, é predominante quando se trabalha em boas condições de higiene (Lücke, 1986; 1998).

As espécies de micrococáceas habitualmente utilizadas como culturas de arranque na indústria de transformação de carnes são *Micrococcus varians*, *M. auranticus*, *M. conglomeratus*, *Kocuria Kristinae*, *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. saprophyticus* (Coretti, 1977; Hammes, 1986; Lücke e Hechelmann, 1987; Carrascosa, 1989; Carrascosa, 2001). O seu uso tem sido feito tanto na forma de culturas puras como de culturas mistas, fundamentalmente associada à microbiota ácido-láctica (Schiffner *et al.*, 1978; Bacus e Brown, 1981; Bacus, 1984; Gökalp e Ockerman, 1985; Lücke e Hechelmann, 1987; Carrascosa, 1989; González-Fernández *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 2004; Zanardi *et al.*, 2004).

Depois das bactérias lácticas, as micrococáceas são o grupo microbiano mais utilizado como cultura de arranque na indústria da salsicharia (López, 1997; Lücke, 1998; Carrascosa, 2001). Quando se usam temperaturas de fermentação superiores a 25°C é sempre aconselhável a inoculação de culturas mistas de micrococáceas e bactérias lácticas para reduzir os riscos do desenvolvimento de microrganismos patogénicos ou de alteração, que as micrococáceas, por si só, seriam incapazes de inibir (Carrascosa, 2001).

6.3.2 - Contribuição das micrococáceas para assegurar e melhorar a qualidade dos enchidos

O uso das micrococáceas como culturas de arranque em produtos de salsicharia contribui para melhorar e assegurar a qualidade higio-sanitária destes produtos. O seu crescimento e multiplicação exerce um efeito bioprotector em relação a microrganismos patogénicos e de alteração, mediante mecanismos de exclusão competitiva. Os micrococos formam peróxidos que, tal como os produzidos pelas bactérias lácticas, podem contribuir para a inibição de bactérias Gram-negativas não desejáveis. Além do mais, algumas estirpes de *Micrococcus* e de *Staphylococcus* produzem bacteriocinas, denominadas micrococinas e estafilococinas, com actividade sobre microrganismos patogénicos, tais como *Staphylococcus aureus* e *Listeria* spp. (Hugas e Roca, 1997; González-Fernández *et al.*, 1998; Garcia-Varona *et al.*, 2000; Carrascosa, 2001).

Quanto à melhoria da qualidade nutricional dos produtos de salsicharia, as micrococáceas contribuem, através da sua acção fermentativa, para a proteólise e lipólise, o que poderá melhorar a digestibilidade de proteínas e de lípidos. Por outro lado, a nitrito-redutase elimina os nitritos residuais que, em excesso, podem ser precursores da presença de nitrosaminas. Contudo, é sabido que o intestino humano recebe mais nitrito biogénico como consequência do metabolismo das proteínas que o que se possa relacionar com a ingestão de enchidos fermentados (Arkoudelos *et al.*, 1997; Carrascosa, 2001; Zanardi *et al.*, 2004).

No que respeita à qualidade sensorial, o papel das micrococáceas relaciona-se, principalmente, com a formação da cor dos produtos de salsicharia, em que é fundamental a redução de nitratos a nitritos, reacção catalisada pela nitratoredutase. A adição às massas de carnes de micrococáceas juntamente com nitratos resulta em produtos finais com cor mais intensa, uniforme e semelhante entre diferentes lotes de produção (Barrière *et al.*, 1998).

A actividade proteolítica e, sobretudo, lipolítica das micrococáceas contribui também para a qualidade sensorial dos produtos de salsicharia, uma vez que originam precursores e compostos sápidos e aromáticos. Os micrococos formam peróxidos que, em meio ácido e na presença de cloreto de sódio, favorecem a oxidação dos ácidos gordos e, consequentemente, a formação de compostos carbonílicos. Por outro lado, tanto o género *Micrococcus* como o *Staphylococcus* produzem catalase, enzima importante para o controlo do excesso de peróxidos, que para além do seu efeito negativo sobre a formação da cor poderiam contribuir para o aparecimento prematuro de ranço (Montel *et al.*, 1996; Montel *et al.*, 1998; Stahnke *et al.*, 2000; Zanardi, 2004).

O Quadro 9 resume o papel das micrococáceas utilizadas como culturas de arranque na manutenção e melhoria da qualidade dos enchidos.

Quadro 9 – Contribuição das micrococáceas usadas como culturas de arranque para a manutenção e melhoria da qualidade dos enchidos.

Factor de qualidade	Efeito	Característica	Actividade metabólica
Higio-sanitário	Bioprotector	- Inibição de microrganismos patogénicos e de alteração	- Crescimento - Produção de bacteriocinas
Nutricional	Fermentativo	- Melhoria da digestibilidade - Eliminação de nitritos	- Proteólise - Lipólise - Nitrito-redutase
Sensorial	Fermentativo	- Cor - Aroma e sabor - Prevenção no aparecimento de ranço	- Nitrato-redutase - Catalase - Consumo de oxigénio - Lipólise - Proteólise - Catalase

Fonte: Adaptado de Carrascosa (2001).

6.4 - Bolores

Os bolores constituem um dos principais grupos que integram o reino dos *Micetes*. O termo bolor é muito amplo e pouco concreto e engloba os micromicetas com micélio bem desenvolvido que podem formar grandes massas de esporos. São seres eucariotas que se podem desenvolver de forma espontânea na superfície da carne e dos produtos cárneos, sempre que ocorram as condições ambientais adequadas. Na superfície dos enchidos, o micélio recebe a designação de flor (Infante, 1988; López, 1997).

O principal interesse dos bolores nos alimentos deve-se à ubiquidade daqueles microrganismos e à sua intensa actividade metabólica (Trigo, 1992; López, 1997). A ubiquidade dos bolores está relacionada com o seu modo de reprodução, uma vez que os esporos se dispersam no ar com grande facilidade, mantendo-se em suspensão durante longos períodos de tempo. Deste modo, uma microbiota fúngica implantada em determinado lugar acaba por se tornar persistente e característica, sendo capaz de implantar-se sobre qualquer alimento, às vezes com efeitos deletérios (Fernández, 2000).

Os bolores são seres aeróbios estritos, pelo que não se desenvolvem no interior das carnes e dos produtos cárneos. Em geral, realizam o seu crescimento e multiplicação a uma temperatura entre 25 e 35°C, com valores de pH entre 3,0 e 9,0 e valores de a_w entre 0,85 e 0,61, pelo que são seres mesófilos, ácidosresistentes e halotolerantes (Liepe, 1985; Fink-Gremmels *et al.*, 1988; Trigo, 1992; Jay, 1996). A aplicação de bolores como culturas de arranque não poderá ser feita em enchidos fumados, uma vez que os compostos antimicrobianos do fumo impedem o seu crescimento, ou dificultam-no fortemente (Kunz, 1984; Carrascosa, 2001).

As espécies de bolores mais utilizadas como culturas de arranque pertencem ao género *Penicillium* e são apresentadas no Quadro 10.

A inoculação de bolores realiza-se mediante técnicas de imersão ou pulverização; em ambos os casos utilizam-se suspensões de esporos (López, 1997). Por se tratarem de microrganismos aeróbios, os bolores destinam-se a inocular superfícies de enchidos ou de pernis para fabrico de presunto (Carrascosa, 2001).

Para vários autores a utilização de bolores como culturas de arranque na indústria de transformação das carnes deve-se, fundamentalmente, à possibilidade que estes têm de eliminar estirpes de bolores pertencentes à microbiota ambiental da fábrica e produtoras de micotoxinas (Lücke, 1985; Lücke e Hechelmann, 1987; Carrascosa, 1989; Fernández, 2000).

Quadro 10 – Espécies de bolores utilizados como culturas de arranque em produtos de salsicharia.

<i>Penicillium nalgiovense</i>	<i>Penicillium micznski</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium olsonii</i>
<i>Penicillium candidum</i>	<i>Penicillium frequentans</i>
<i>Penicillium camembertii</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Penicillium roquefortii</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
<i>Penicillium canescens</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>
<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>

Fonte: Carrascosa (2001)

6.4.1 - Contribuição dos bolores para assegurar e melhorar a qualidade dos enchidos

No que respeita à qualidade higio-sanitária dos enchidos, os bolores utilizados como culturas de arranque têm uma acção benéfica fundamentalmente através do seu efeito bioprotector. Mediante exclusão competitiva, propiciada pela predominância numérica que resulta da sua inoculação, impedem o crescimento de outros bolores espontâneos produtores de micotoxinas, assim como de outros microrganismos que podem propiciar o aparecimento de limosidade superficial (Carrascosa, 2001).

Huerta *et al.* (1988a) determinaram a actividade antimicrobiana de diferentes estirpes de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas de presunto curado frente a 11 espécies microbianas, incluindo *Staphylococcus aureus*. As estirpes de *Penicillium* inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e mostraram uma grande actividade antagonista relativamente à estirpe de *Staphylococcus aureus* usada por aqueles autores.

Por outro lado, Färber e Geisen (1994) utilizaram *Micrococcus luteus* DSM 348 como organismo indicador para determinar a actividade inibitória de *Penicillium nalgiovense*, *P. camemberti* e *P. roqueforti*. Não detectaram qualquer efeito antimicrobiano por parte de *P. camemberti* e *P. roqueforti* mas sim por *P. nalgiovense*. Este bolor excretou uma substância antagonista termoestável com peso molecular próximo de 1 000.

Andersen e Frisvad (1994) trabalharam com estirpes de *P. nalgiovense* e *P. chrysogenum*, taxonomicamente muito próximos e comumente utilizados como culturas de arranque em produtos de salsicharia. Mostraram que aquelas estirpes foram produtoras de penicilina, contudo opinaram que muito provavelmente aquele antibiótico não seria produzido em enchidos.

A actividade proteolítica e lipolítica dos bolores aumenta a digestibilidade de proteínas e lípidos, o que poderá contribuir para uma melhoria na qualidade nutricional dos produtos (Carrascosa, 2001).

Em todo o caso, as actividades metabólicas dos bolores têm grande incidência sobre a qualidade sensorial dos enchidos. Através daquelas actividades, a acção fermentativa dos bolores contribui para a formação da cor estável, mediante o desenvolvimento da cobertura superficial ("flor") que reduz a tensão superficial de oxigénio, tem acção protectora do efeito pró-oxidante da luz e dos nitratos sobre a gordura. A produção de catalase pelos bolores, ao eliminar o excesso de peróxidos, evita a rancificação precoce das gorduras (López, 1997; Carrascosa, 2001).

Por outro lado, a actividade proteolítica e lipolítica dos bolores sobre os enchidos, origina precursores sápidos e aromáticos (Smith e Palumbo, 1983; Geisen *et al.*, 1992; Geisen, 1993; Fernández, 2000). O efeito do metabolismo activo daqueles microrganismos sobre proteínas e lípidos será tanto mais evidente no interior das peças quanto menor for o seu diâmetro (Leistner, 1987). Como consequência da proteólise e do metabolismo do lactato, nos enchidos com bolores o pH nas zonas mais superficiais pode subir até 7, depois de ocorrida a fermentação láctica (Lücke, 1986; Ordóñez *et al.*, 1995).

López (1997), em trabalhos realizados com um tipo de salsichão espanhol, procedeu à imersão de salsichões recém fabricados (imediatamente após a colocação da massa na tripa) numa suspensão de esporos de três estirpes do género *Penicillium* e uma do género *Mucor*. Em todos os atributos analisados (aparência externa, cor, aroma, textura, sabor e

aceitabilidade geral) o lote testemunha teve pontuações mais baixas que a maioria dos lotes inoculados. Neste trabalho foi demonstrada uma acção muito favorável do género *Mucor* sobre a textura do salsichão. Foi também o lote inoculado com a estirpe de *Mucor* o que obteve pontuações mais elevadas na aceitabilidade geral.

No que respeita à incidência directa sobre a qualidade tecnológica dos enchidos, comprovou-se que com a inoculação de bolores a humidade no interior do enchido é mais uniforme, porque a cobertura de bolor controla a velocidade de perda de água, impedindo assim a excessiva perda de peso e o estabelecimento de fenómenos de formação de crosta superficial, por rápida e excessiva desidratação (Leistner e Ayres, 1968; Grazia *et al.*, 1986; Lücke, 1987; López, 1997).

A contribuição dos bolores usados como culturas de arranque no fabrico de enchidos para a melhoria da sua qualidade é apresentada, de forma sumária, no Quadro 11.

Quadro 11 – Contribuição dos bolores usados como culturas de arranque para a manutenção e melhoria da qualidade dos enchidos.

Factor de qualidade	Efeito	Característica	Actividade metabólica
Higio-sanitário	Bioprotector	- Prevenção no desenvolvimento de bolores produtores de micotoxinas	- Crescimento e formação de camada superficial (“flor”) protectora
Nutricional	Fermentativo	- Melhoria da digestibilidade	- Proteólise - Lipólise
Sensorial	Fermentativo	- Cor - Aroma e sabor	- Catalase - Crescimento (a “flor” protege os enchidos da acção do oxigénio e da luz) - Proteólise - Lipólise
		- Prevenção no aparecimento do ranço	- Catalase
		- Aparência	- Crescimento e formação da “flor”
Tecnológico	Fermentativo	- Desidratação interna mais homogénea	- Crescimento e formação da “flor”

Fonte: Adaptado de Carrascosa (2001).

6.5 - Leveduras

A utilização de leveduras como cultura de arranque na indústria alimentar é indubitavelmente mais importante no fabrico de alimentos de origem vegetal, como o pão, o vinho e a cerveja, do que em produtos cárneos.

Estes microrganismos são caracterizados pela sua elevada halotolerância, podendo crescer em meios com valores de a_w de 0,87, pelo seu metabolismo aeróbio ou ligeiramente fermentativo e por serem ácidoresistentes. As espécies de leveduras mais utilizadas como culturas de arranque pertencem ao género *Debaryomyces*: *D. hansenii*, *D. kloeckerii*, *D. cantarellii* e *D. pfaffii* (Comi e Cantoni, 1980; Lücke, 1998). São utilizadas para inoculações superficiais e em profundidade, sob a forma de culturas mistas, com bactérias lácticas, micrococáceas e bolores (Lücke, 1985; Hammes, 1986; Carrascosa, 2001). A inoculação destes microrganismos é levada a cabo no momento da mistura das massas de carne, no caso das sementeiras em profundidade, ou por imersão ou pulverização do enchido após o enchimento, no caso das inoculações superficiais.

Provavelmente, *Debaryomyces hansenii* será a espécie mais utilizada como cultura de arranque. Esta levedura, para além de ser tolerante ao sal, é capaz de reduzir os nitratos; contudo, é um microrganismo aeróbio estrito, pelo que somente cresce na superfície dos enchidos (Coretti, 1977; Hammes et al., 1985; López, 1997).

6.5.1 - Contribuição das leveduras para assegurar e melhorar a qualidade dos enchidos

A interferência benéfica das leveduras sobre a qualidade higio-sanitária dos enchidos revela-se através do seu efeito bioprotector, inibindo por exclusão competitiva o desenvolvimento de microrganismos patogénicos e de alteração, tanto quando se aplicam na superfície dos enchidos como na profundidade das massas (Fernández, 2000).

Por outro lado, a actividade lipolítica e proteolítica das leveduras poderá tornar os lípidos e proteínas dos enchidos mais digestíveis, o que afectará desejavelmente a qualidade nutricional daqueles produtos (Carrascosa, 2001). Além disso, aquelas actividades metabólicas influem também na qualidade sensorial dos enchidos, contribuindo para o aparecimento de precursores sápidos e aromáticos (Hammes, 1986; Lücke e Hechelmann, 1987; Lücke, 1998).

A sementeira de leveduras na superfície dos enchidos leva à participação destes microrganismos na formação da camada protectora que, tal como foi descrito para o caso dos bolores, favorece a formação da cor e dificulta a ocorrência de fenómenos de autoxidação prematuros das gorduras devido à produção de catalase (Lücke e Hechelmann, 1987; Fernández, 2000). Quando as leveduras são inoculadas na profundidade das massas, a catalase tem o mesmo efeito que na superfície: controlar o excesso de peróxidos. A capacidade proteolítica e a capacidade de metabolizar o lactato pode provocar, no caso dos enchidos, uma ligeira subida do pH, durante a maturação, uma vez já ocorrida a fermentação láctica (Lücke, 1998; Carrascosa, 2001).

No Quadro 12 é apresentado o papel das leveduras com interesse tecnológico na melhoria da qualidade dos enchidos.

Quadro 12 – Contribuição das leveduras usadas como culturas de arranque para a manutenção e melhoria da qualidade dos enchidos.

Factor de qualidade	Efeito	Característica	Actividade metabólica
Higio-sanitário	Bioprotector	- Prevenção na multiplicação de microrganismos patogénicos e de alteração	- Crescimento
Nutricional	Fermentativo	- Melhoria da digestibilidade	- Proteólise - Lipólise
Sensorial	Fermentativo	- Cor - Aroma e sabor - Prevenção no aparecimento do ranço - Aparência	- Catalase - Crescimento (a camada superficial protege os enchidos da ação do oxigénio e da luz) - Proteólise - Lipólise - Catalase - Crescimento e formação da camada superficial protectora

Fonte: Adaptado de Carrascosa (2001).

II – Metodologia

7 – Objectivos e plano do trabalho

Com o trabalho que nos propusemos realizar pretendemos atingir cinco objectivos principais:

- 1 - Conhecer, com os meios de que dispúnhamos, vários aspectos relacionados com o fabrico de um enchido tradicional de porco Alentejano com expressão no mercado.
- 2 - Saber durante quanto tempo é possível conservar, à temperatura ambiente, um produto de salsicharia de elevada qualidade.
- 3 - Formar uma colecção de bactérias lácticas e de micrococáceas com potencial para serem utilizadas como culturas de arranque no fabrico de enchidos.
- 4 - Verificar a acção de algumas culturas de arranque da nossa colecção nas características do paio de porco Alentejano.
- 5 - Encontrar uma metodologia de trabalho que permita um conhecimento mais alargado dos fenómenos relacionados com o fabrico de produtos de salsicharia para obtenção de produtos de melhor qualidade, devendo esta ter um carácter de reproduzibilidade.

O trabalho realizado tem como material base para estudo o paio de porco da raça Alentejana, um dos produtos do porco Alentejano mais fabricados. Além do mais, as massas de carne usadas no fabrico deste enchido são muito semelhantes às usadas em outros enchidos, como o chouriço e o palaio (um paio de grande calibre, por vezes 10 – 12cm). Deste modo, os resultados obtidos no âmbito deste trabalho poderão ser, de certo modo, extrapolados a outros produtos de salsicharia.

Neste contexto, foram produzidos enchidos com características semelhantes em duas fábricas distintas. Uma localizada em Estremoz (Alto Alentejo), onde se curam os enchidos com recurso à fumagem, e outra localizada em Barrancos (Baixo Alentejo), onde os produtos são curados sem recurso à fumagem.

Para alcançarmos os objectivos propostos decidimos desenvolver o seguinte trabalho experimental:

- 1 - Duração e condições ambientais das etapas de fabrico. Nesta parte do trabalho pretende-se dar a conhecer a duração das várias fases de fabrico. Fez-se também um levantamento dos valores da temperatura e da humidade relativa do ar dos locais directamente relacionados com o processo de fabrico do paio de porco Alentejano.
- 2 - Caracterização das matérias-primas subsidiárias. Neste capítulo do trabalho faz-se uma avaliação físico-química e microbiológica de ingredientes dos enchidos, designadamente, massa de pimentão, massa de alho e tripas. O sal e a água foram submetidos a análises microbiológicas.
- 3 - Caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico. A partir de amostras recolhidas em 4 fases do processo de fabrico (1-massa não condimentada, 2-pré-enchimento, 3-fase intermédia da cura e 4-produto final) realizaram-se análises físico-químicas, determinou-se o perfil de ácidos gordos e efectuaram-se análises microbiológicas.

- 4 - Conservação do paio de porco Alentejano. Nesta parte do trabalho, produtos finais, inteiros, dos enchidos estudados no âmbito do ponto anterior (caracterização do paio de porco Alentejano) foram embalados sob vácuo e sob um tipo de atmosfera modificada (20% de CO₂; 80% de N₂) e mantiveram-se à temperatura ambiente. Foram analisadas amostras aos 0, 3, 6 e 9 meses de conservação. Em cada um destes tempos de conservação fizeram-se análises físico-químicas, determinou-se o perfil de ácidos gordos, fizeram-se análises reológicas, microbiológicas e sensoriais.
- 5 - Selecção de estirpes da família *Micrococcaceae* e do género *Lactobacillus* para utilização como culturas de arranque. Nesta fase do trabalho, estirpes daqueles 2 grupos bacterianos que haviam sido isoladas, principalmente, no decurso do estudo da caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico, foram sujeitas a provas de selecção. Escolheram-se e identificaram-se as mais adaptadas às condições de fabrico dos enchidos estudados, perspectivando a sua utilização como culturas de arranque no fabrico de enchidos.
- 6 - Ensaios de inoculação. Nesta última fase do trabalho foram inoculadas 2 das estirpes seleccionadas (uma de *Lactobacillus sakei* e outra de *Staphylococcus xylosus*) em massas de carne destinadas ao fabrico de paio de porco Alentejano. Realizaram-se 2 ensaios em cada uma das duas fábricas e foi avaliado o efeito da introdução daquelas culturas sobre parâmetros físico-químicos, reológicos, microbiológicos e sensoriais.

8 – Materiais e métodos

8.1 - Matéria-prima e processo de fabrico

O produto estudado no âmbito deste trabalho é o paio de porco da raça Alentejana, que designamos vulgarmente por paio de porco Alentejano. Este tipo de paio, assume designações diferentes consoante a região onde é produzido. No caso concreto do nosso trabalho, na região onde está inserida uma das fábricas que foi objecto do nosso estudo este enchido é designado por “paio de Barrancos”. Na área onde labora a outra fábrica utilizada no nosso estudo o produto é designado por “chouriço grosso”. O paio de porco Alentejano é um enchido tradicional, de forma cilíndrica, com diâmetro variável, normalmente entre 4 – 5 cm, dependendo do calibre irregular da tripa, e comprimento usual entre 25 – 30 cm. É elaborado com carne (70 – 80%) e gorduras rijas (20 – 30%) procedentes de porcos da raça Alentejana. As carnes são retiradas da entremeada, pá, cachaço e perna, devidamente limpas de tendões, aponevroses, gorduras inconsistentes e outras que apresentem sinais de oxidação.

Como invólucro foi usado o intestino grosso de porco, natural, salgado, com as camadas muscular e serosa, destituído, portanto, da mucosa. Antes do enchimento as tripas foram banhadas numa mistura de água, sal e vinagre.

Os enchidos foram produzidos em duas salsicharias que operam no Alentejo: uma em Barrancos (Baixo Alentejo), que não recorre à fumagem dos produtos (designada neste trabalho por fábrica A); outra em Estremoz (Alto Alentejo), onde os produtos são fumados (designada neste trabalho por fábrica B).

A fábrica A produz anualmente cerca de 200 000 kg de produto acabado, tem 18 empregados ligados à produção e fabrica exclusivamente produtos do porco Alentejano. Nesta fábrica, para o fabrico do paio as carnes e gorduras, depois de picadas (ou migadas) em porções cúbicas com cerca de 2,5 cm de lado, foram condimentadas com massa de pimentão (3%), alho (2,2%), água (3,5%) e sal (2%). Como aditivos utilizaram-se 0,04% de P₂O₅, 0,039% de NaNO₃, 0,008% de KNO₃ e 0,0076% de KNO₂. A maturação das massas foi realizada em câmaras com temperatura de 6°C, aproximadamente, e humidade relativa de 80%, durante 96 horas. A primeira parte da cura fez-se numa câmara com temperatura que variou entre 10 - 12°C e humidade relativa entre 75 – 80%, durante 30 dias. O acabamento dos enchidos fez-se numa sala de cura natural, durante 35 dias, com temperatura média de 19,5°C e humidade relativa média de 65,7%.

A fábrica B, por ano, produz cerca de 600 000 kg de produtos de salsicharia acabados e tem 20 funcionários afectos à produção de enchidos. Nesta fábrica, os produtos do porco Alentejano representam 7% da produção total. Na fábrica B as massas de carne compostas por porções cúbicas com cerca de 2,5 cm de lado, foram condimentadas com 4% de massa de pimentão, 4% de alho, 3,5% de água e 4% de sal. As massas maturaram durante 48 horas, com temperatura próxima de 6°C e humidade relativa de cerca de 85%. Quanto à cura dos enchidos, houve uma primeira fase que decorreu no fumeiro, durante 12 dias, com combustão lenta de lenha de azinho, com temperaturas que variaram entre 16 - 27°C. A segunda fase da cura durou 21 dias e ocorreu em câmara com temperatura entre 15 - 17°C e humidade relativa entre 65 – 80%.

A Fotografia 8 mostra um conjunto de paios de porco Alentejano usados no nosso estudo. A Fotografia 9 apresenta a secção de corte transversal de dois paios de porco

Alentejano; o da esquerda foi produzido na fábrica designada por A e o da direita na fábrica B.



Fotografia 8 - Conjunto de paios de porco Alentejano.



Fotografia 9 - Secção de corte transversal de dois paios de porco Alentejano (esquerda - paio produzido na fábrica A; direita - paio produzido na fábrica B).

8. 2 – Duração e condições ambientais das etapas de fabrico

Em ambas as fábricas (A e B) e para cada um de 3 lotes de produção, foram medidas a temperatura e a humidade relativa do ar nos seguintes locais representativos de todo o processo de fabrico: cais de recepção, câmara de recepção de carnes refrigeradas (apenas para a fábrica A e somente com registos de temperatura), sala de desmancha, câmara de maturação, sala de enchimento, câmara de cura com ambiente controlado (fábrica A), sala de cura natural (fábrica A), fumeiro (fábrica B) e câmara de secagem (fábrica B).

Na fábrica B as carnes e as carcaças passam directamente do cais de recepção para a sala de desmancha, razão pela qual não há registos da câmara de recepção de carnes refrigeradas naquela fábrica.

Para realizar estas leituras, utilizaram-se um termo higrómetro digital (Rotronic, modelo A1). As leituras foram realizadas durante os dias de trabalho e às seguintes horas: 10:00, 11:00, 12:00, 14:00, 15:00 e 16:00. Nos locais onde as etapas de fabrico foram relativamente curtas (cais de recepção de carcaças, sala de desmancha e sala de enchimento) realizaram-se apenas 3 registos por lote.

Os períodos de tempo em que foram feitos registos das condições ambientais constam dos Quadros 13 e 14.

Quadro 13 – Períodos de tempo (mês e ano) e número de registos efectuados para parâmetros ambientais (temperatura e humidade relativa do ar) nas duas fábricas em estudo (A e B), em função do lote de produção e dos locais de fabrico.

Fábrica	Cais de Recepção		Câmara de Refrigeração		Sala de Desmancha		Câmara de Maturação		Sala de Enchimento	
	Lote	Nº de registos		Nº de registos		Nº de registos		Nº de registos		Nº de registos
A	1	Jan./2000	3	Jan./2000	25	Jan./2000	3	Jan./2000	18	Jan./2000
	2	Abr./2000	3	Abr./2000	21	Abr./2000	3	Abr./2000	12	Abr./2000
	3	Jun./2000	3	Jun./2000	20	Jun./2000	3	Jun./2000	11	Jun./2000
B	1	Agt./1999	3	*		Agt./1999	3	Agt./1999	6	Agt./1999
	2	Set./1999	3	*		Set./1999	3	Set./1999	6	Set./1999
	3	Out./1999	3	*		Out./1999	3	Out./1999	6	Out./1999

* Na Fábrica B as carnes e carcaças passam directamente do cais de recepção para a sala de desmancha.

Quadro 14 – Períodos de tempo (mês e ano) em que decorreram registos de parâmetros ambientais nas duas fábricas em estudo (A e B), em função do lote de produção e dos locais de cura.

Fábrica	Câmara de cura (Ambiente Controlado)		Sala de Cura Natural		Fumeiro		Câmara de Estabilização		Nº de registos
	Lote	Nº de registos		Nº de registos		Nº de registos		Nº de registos	
A	1	Jan.-Fev./2000	126	Fev.-Abr./2000	156	1)			1)
	2	Abr.-Jun./2000	170	Jun.-Jul./2000	86	1)			1)
	3	Jun.-Jul./2000	120	Jul.-Agt./2000	101	1)			1)
B	1	2)		2)		Agt./1999	18	Agt.-Out./1999	155
	2	2)		2)		Set.-Out./1999	81	Out./1999	
	3	2)		2)		Out./1999	46	Out.-Nov./1999	26

1) – Equipamentos que não fazem parte do processo de fabrico da fábrica A.

2) – Equipamentos que não fazem parte do processo de fabrico da fábrica B.

Procedeu-se ainda ao registo do tempo de duração de cada uma das etapas do processo de fabrico e foram determinadas as perdas de peso (quebras) ao longo do fabrico dos enchidos.

Para o cálculo das perdas de peso, em cada lote de produto estudado foram escolhidas aleatoriamente 48 unidades de enchido. Estas unidades foram pesadas individualmente numa balança digital Keru, modelo EW600-2M, desde o enchimento até ao produto final.

Nos produtos não submetidos à fumagem (fábrica A), realizaram-se duas pesagens por semana nas 4 primeiras semanas após o enchimento. Nas restantes semanas fez-se apenas uma pesagem semanal. Na fábrica B procedeu-se de modo semelhante, no entanto realizaram-se duas pesagens apenas nas primeiras 3 semanas após o enchimento.

8.2.1 – Análise estatística

Apenas foi feita análise estatística para os dados relativos à avaliação das condições ambientais das etapas de fabrico.

Foi realizada uma análise de variância unifatorial considerando o factor “fábrica”, com 2 níveis: A e B. Para tal utilizou-se o programa Statistica 5.1.

8.3 – Caracterização das matérias-primas subsidiárias

Neste capítulo do trabalho foram avaliadas algumas características físico-químicas e microbiológicas das massas de pimentão e alho e das tripas usados no fabrico do paio de porco Alentejano. Fez-se ainda o controlo microbiológico do sal e da água utilizados naquele processo de fabrico.

A massa de pimentão foi adquirida, pelas fábricas, já preparada. Para tal, os pimentos foram abertos, desprovidos de grainhas e colocados, à temperatura ambiente, entre camadas de sal. Após um período de tempo variável sob aquelas condições, entre 2 e 6 meses, o pimento, com pele, foi moído, embalado em bidões plásticos e comercializado. Já nas salsicharias, foi conservada a temperaturas de refrigeração.

A massa de alho usada era composta por dentes de alho moídos e salgados. A massa foi adquirida já pronta e até à sua utilização foi conservada em bidões plásticos sob refrigeração.

A tripa utilizada (fresca e salgada) foi comercializada em bidões plásticos e nas salsicharias manteve-se sempre sob refrigeração.

Ambas as fábricas utilizaram sal marinho higienizado e a água usada vem da rede pública.

Para cada um dos ingredientes, e em cada fábrica, foram recolhidas amostras de três lotes diferentes de produção de paio de porco Alentejano, fabricados em três datas diferentes; em cada um dos lotes foram recolhidas duas amostras. Portanto, para cada ingrediente e em cada uma das fábricas foram recolhidas 6 amostras.

As análises microbiológicas realizadas à massa de pimentão, massa de alho, tripas e sal foram contagens de microrganismos mesófilos totais, psicrotróficos totais, bolores, leveduras, *Micrococcaceae*, *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococci* do Grupo D e esporos de bactérias aeróbias. Fez-se a estimativa do número de células viáveis de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e de *Escherichia coli*. As análises à água consistiram na contagem de microrganismos aeróbios totais (mesófilos e psicrotróficos) e na estimativa do número mais provável de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, *Streptococci* fecais, coliformes fecais e *Escherichia coli*.

As análises físico-químicas feitas às massas de pimentão e alho foram a determinação do pH, da actividade da água, da humidade, do teor de cloretos e a leitura objectiva da cor (L^* , a^* , b^*). Relativamente às tripas, fizeram-se as análises acabadas de

referir, à excepção da leitura da cor, acrescidas da determinação da matéria gorda, teor de proteína bruta e cinza total.

As análises laboratoriais efectuaram-se de acordo com as técnicas descritas no capítulo 8.8.

8.3.1 – Análise estatística

Para todos os parâmetros observados realizaram-se análises de variância unifactoriais considerando o factor “fábrica”, com 2 níveis: A e B.

Foi utilizado o programa Statistica 5.1.

8.4 – Caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico

Para avaliar as características do paio de porco Alentejano procedeu-se à recolha de amostras nas seguintes fases do processo de fabrico:

- 1 - Massa não condimentada. Esta toma de amostra pretende avaliar as características da matéria-prima no início do processo, após a migra das carnes e antes da adição de outros ingredientes.
- 2 - Pré-ernchimento. Recolha de amostra após a fase de maturação das massas e antes de se iniciar a operação de enchimento; tem por objectivo observar hipotéticas alterações que tenham ocorrido durante a maturação das massas.
- 3 - Fase intermédia da cura. Para avaliar os produtos nesta fase foram recolhidas amostras aos 20 dias de cura em câmara com condicionamento ambiental, na fábrica A, e aos 10 dias de fumagem, na fábrica B.
- 4 - Produto final, para avaliação dos produtos considerados aptos para comercialização.

As análises físico-químicas realizadas foram: leituras do pH e da actividade da água (a_w), determinação dos teores de cloretos, humidade, proteína total, matéria gorda livre, cinza total e azoto básico volátil total (ABVT). Procedeu-se ainda à medição objectiva da cor (L^* , a^* , b^*).

Na determinação do perfil de ácidos gordos foram considerados os ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), margárico (17:0), margaroleico (17:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolénico (18:3), gadoleico (20:1) e heneicosenoico (21:1). Foi ainda calculado o rácio ácidos gordos polinsaturados/ ácidos gordos saturados (P/S) pela razão entre o somatório dos ácidos gordos linoleico (18:2) e linolénico (18:3) e o somatório dos ácidos gordos láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0) e esteárico (18:0), seguindo a metodologia descrita por Enser *et al.* (2000).

As análises microbiológicas consistiram nas contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos totais, bolores, leveduras, *Lactobacillus* spp., Bactérias ácido lácticas, *Micrococcaceae*, esporos de bactérias aeróbias, *Enterobacteriaceae* e *Streptococci* do grupo D. e estimativa do número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores e de células viáveis de bactérias coliformes e de *Escherichia coli*.

Neste estudo foram avaliados 5 lotes de produção de paio, por salsicharia, fabricados em datas distintas. Em cada lote e em cada uma das fases de fabrico consideradas foram recolhidas 3 amostras.

A metodologia adoptada para a realização das análises indicadas neste capítulo é apresentada no capítulo 8.8.

8.4.1 – Análise estatística

Para todos os parâmetros observados realizaram-se análises de variância multifactoriais considerando os factores “fábrica” (com 2 níveis: A e B) e “fase de fabrico” (com 4 níveis: 1, 2, 3 e 4) e a interacção “fábrica” x “fase”. Para as interacções que foram significativas fez-se a comparação de médias através do teste de Tukey, considerando-se as diferenças significativas para $p<0,05$.

Para o tratamento de dados recorreu-se ao programa Statistica 5.1.

8.5 – Conservação do paio de porco Alentejano

Paios inteiros curados, oriundos dos lotes que foram estudados para a caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico (capítulo 8.4), foram embalados, à razão de um por embalagem, em sacos obtidos de um filme multicapa, coextrudido, constituído por polietileno, etilvinilalcool e poliamida. De acordo com o fabricante estes sacos apresentam uma permeabilidade ao oxigénio e ao gás carbónico de, respectivamente, $35\text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}/\text{bar}$ e $150\text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}/\text{bar}$ e uma permeabilidade ao vapor de água de $20\text{ g/m}^2/24\text{h}$. As saquetas foram fechadas por termo-colagem; umas sob vácuo e outras com um tipo de atmosfera modificada ($20\% \text{ CO}_2$; $80\% \text{ N}_2$).

Os produtos embalados deste modo foram mantidos à temperatura ambiente numa sala com valores de temperatura máxima e mínima que variaram entre 18 e 11 °C, no Inverno, entre 26 e 15 °C, na Primavera, entre 31 e 17 °C, no Verão e entre 24 e 12 °C, no Outono.

Os sacos foram abertos aos 3, 6 e 9 meses de conservação. Para cada um dos 5 lotes estudados em cada fábrica, para cada modalidade de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e em cada uma das datas de análise (0, 3, 6 e 9 meses) foram recolhidas 3 amostras. Os produtos foram submetidos às seguintes determinações: físico-químicas, análise do perfil de ácidos gordos, reológicas, microbiológicas e sensoriais.

As análises físico-químicas realizadas foram: pH, a_w , teor de cloretos, azoto básico volátil total (ABVT), acidez da gordura e leitura dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* .

As propriedades mecânicas incidiram sobre a análise do perfil de textura (TPA, do inglês “Texture Profil Analysis”), força máxima de corte e trabalho de corte. No teste TPA foram considerados os parâmetros dureza, coesividade, elasticidade, resiliência, gomosidade e masticabilidade.

As análises microbiológicas e do perfil de ácidos gordos realizadas foram as indicadas no capítulo 8.4.

Na análise sensorial foram considerados os atributos intensidade da cor, cores estranhas, marmoreado, intensidade do aroma, aromas estranhos, tenrura, fibrosidade, suculência, intensidade do sabor, sabores estranhos, intensidade da salga e apreciação global.

A metodologia seguida para a execução das análises é apresentada no capítulo 8.8.

8.5.1 – Análise estatística

Para as variáveis estudadas foram realizadas análises de variância multifactoriais considerando os factores “fábrica” (com 2 níveis: A e B), “modo de conservação” (com 2 níveis: vácuo e atmosfera modificada) e “tempo de conservação” (com 4 níveis: 0, 3, 6 e 9 meses) e as interacções “fábrica” x “modo de conservação”, “fábrica” x “tempo de conservação” e “modo de conservação” x “tempo de conservação”. Para as interacções que foram significativas fez-se a comparação de médias pelo método de Tukey, considerando-se as diferenças significativas para $p<0,05$. Utilizou-se o programa Statistica 5.1.

8.6 - Selecção de estirpes da família *Micrococcaceae* e do género *Lactobacillus* para utilização como culturas de arranque no fabrico de enchidos

O objectivo fundamental deste capítulo do trabalho foi a obtenção de estirpes bacterianas autóctones, procedentes de enchidos tradicionais do Alentejo, com propriedades de interesse tecnológico para a sua possível utilização como culturas de arranque no fabrico de enchidos típicos do Alentejo.

Pretende-se alcançar o objectivo proposto mediante a realização de provas selectivas sobre as estirpes isoladas das famílias *Lactobacillaceae* e *Micrococcaceae*, atendendo às suas propriedades fisiológicas e às suas condições de desenvolvimento.

As provas de selecção foram finalizadas com um estudo taxonómico das estirpes seleccionadas. Posteriormente foi verificada a sua resistência à congelação e à liofilização.

8.6.1 - Isolamento das estirpes a estudar

Neta fase do trabalho recolheram-se amostras de quatro enchidos tradicionais do Alentejo, chouriço, morcela, paio e lombo, produzidos com carne e gorduras de porco da raça Alentejana em seis fábricas de enchidos instaladas no Alentejo (designadas no presente trabalho por fábricas A, B, C, D, E e F). As fábricas A e B são as já assim designadas neste capítulo. As fábricas C, D, E e F recorrem à fumagem dos enchidos e utilizam processos de fabrico semelhantes aos da fábrica B.

As estirpes estudadas foram recolhidas em várias fases do processo de fabrico: ¹⁾massa não condimentada (carne e gordura picadas, não condimentadas), fase inicial do processo; ²⁾pré-enchimento; ³⁾fase intermédia da cura e ⁴⁾produto final.

Na recolha das amostras para isolamento de estirpes bacterianas, com os devidos cuidados de assepsia foram retirados 10 g de cada um dos enchidos utilizados para sacos de “Stomacher” e a cada saco adicionou-se 90 ml de solução salina de triptona. Após a recolha da amostra, cada saco foi ao agitador mecânico “Stomacher” (Seward 400) durante 3 minutos para homogeneização do seu conteúdo. A partir das “suspensões-mãe” obtidas deste modo, foram realizadas diluições decimais que por sua vez foram semeadas, em superfície, em meio de cultura agar Man Rogosa e Sharpe (MRS, Oxoid), sob condições de microaerofilia, para crescimento de estirpes da família *Lactobacillaceae*, e Manitol Salt Agar (MSA, Oxoid), onde cresceram as estirpes da família *Micrococcaceae*. A incubação foi feita à temperatura de 30°C durante 48 horas. No final do período de incubação foram realizadas provas de identificação prévias, às colónias que se mostraram mais representativas, consistindo estas provas na observação morfológica celular e na avaliação da produção de catalase.

Deste modo, no que respeita à morfologia celular as colónias seleccionadas foram as que apresentaram a forma de cocos, no caso dos microrganismos que cresceram em meio MSA (Oxoid); das placas com meio MRS (Oxoid) foram seleccionadas as colónias identificadas como bacilos.

Na prova da catalase depositou-se uma gota de peróxido de hidrogénio de 10 volumes numa lâmina e sobre aquela gota colocou-se uma pequena quantidade da cultura a estudar. A prova baseia-se na hidrólise do peróxido de hidrogénio pela catalase, se existir, com produção de água e oxigénio, manifestando-se este último pela presença de bolhas. No caso das colónias procedentes de placas com meio MSA foram seleccionadas as colónias catalase-positiva. De entre as colónias que cresceram em meio MRS foram seleccionadas as colónias catalase-negativa.

8.6.2 - Manutenção das estirpes isoladas

As bactérias que foram seleccionadas pela sua morfologia e pela produção, ou não, de catalase foram submetidas a conservação para utilização posterior em provas selectivas. Deste modo, as estirpes que haviam crescido tanto em meio MSA (Oxoid) como em meio MRS (Oxoid) foram semeadas em meio de cultura agar “Brain Heart Infusion” (BHI, Merck) e colocadas a 30°C durante 24 h. Após este período procedeu-se à recolha das colónias isoladas. As colónias que inicialmente haviam crescido no meio MSA (Oxoid), supostamente da família *Micrococcaceae*, foram inoculadas em tubos com caldo BHI (Merck) durante 24 h

a 30°C. As colónias que haviam crescido no meio MRS agar, supostamente da família *Lactobacillaceae*, foram inoculadas em meio MRS caldo (Oxoid) e incubadas também a 30°C durante 48 h. Após os referidos períodos de incubação, de cada um dos tubos, tanto dos que continham caldo BHI (Merck) como dos outros com MRS caldo (Oxoid), foram retirados 0,5 ml de meio de cultura com crescimento bacteriano e colocados em tubos de Eppendorf com 0,5 ml de glicerol, utilizado como crioprotector. Depois de homogeneizado o seu conteúdo, estes tubos de Eppendorf foram colocados a -85°C (oitenta e cinco graus Celsius negativos) durante sensivelmente um ano. Este procedimento serviu para fazer uma selecção da resistência das estirpes à congelação.

Para continuação das provas de selecção, o conteúdo dos tubos de Eppendorf foi descongelado à temperatura ambiente. De cada um dos tubos com caldo MRS (Oxoid) foram retiradas, com pipeta de Pasteur estéril, quatro gotas que foram inoculadas em tubos com caldo MRS (Oxoid), que incubaram a 30°C até que foi observado crescimento. Logo após, o inóculo de cada tubo foi semeado por estria e esgotamento em placas com agar MRS (Oxoid) para comprovação da pureza da estirpe isolada. Estas placas foram a incubar a 30°C durante 24 h. De cada uma das placas retirou-se uma colónia com ansa de platina e inoculou-se em caldo MRS (Oxoid), que incubou a 30°C durante 48 h.

As estirpes que estavam em tubos de Eppendorf com caldo BHI (Merck), após o descongelamento foram inoculadas em tubos com caldo BHI (Merck), a comprovação do grau de pureza das estirpes foi feita em placas com meio MSA (Oxoid). A sementeira das colónias que cresceram nestas placas fez-se em caldo BHI (Merck), que incubou a 30°C durante 48 h. Os procedimentos adoptados foram idênticos aos referidos no parágrafo anterior.

Nesta fase do trabalho, e após a avaliação morfológica celular e a prova da catalase, a colecção de estirpes supostamente pertencentes às famílias *Micrococcaceae* e *Lactobacillaceae* era composta por 61 e 150 unidades, respectivamente.

Com as colónias jovens assim obtidas realizaram-se as provas que a seguir se descrevem.

8.6.3 - Provas de identificação prévia

Antes de se iniciar o estudo selectivo procedeu-se à confirmação de que as estirpes isoladas em caldo BHI (Merck) e em MRS (Oxoid) agar pertenciam, respectivamente, às famílias *Micrococcaceae* e *Lactobacillaceae*. Deste conjunto de provas fazem parte a observação microscópica, a prova da catalase (ambas já descritas em 8.6.1 e realizadas no momento em que são escolhidas para isolamento as colónias que cresceram em MSA ou em MRS agar), a coloração pelo método de Gram e, no caso das colónias que cresceram no MSA (Oxoid), o crescimento em anaerobiose.

8.6.3.1 - Coloração pelo método de Gram

Prova realizada segundo as recomendações da I.C.M.S.F. (1983). Para a observação utilizou-se um microscópio óptico (Leitz, modelo Laborlux K), com objectiva de imersão e ampliação de 1000X.

As estirpes que se revelaram Gram-negativas foram excluídas do estudo.

8.6.3.2.- Crescimento em anaerobiose

A esta prova apenas foram submetidas as estirpes que cresceram em meio MSA (Oxoid), supostamente da família *Micrococcaceae*, na medida em de as colónias que cresceram em meio MRS agar (Oxoid) haviam incubado sob condições de microaerofilia.

Neste estudo utilizou-se o meio de Evans e Kloos (1972), composto por tioglicolato de Brewer (Difco) adicionado de 0,3% de agar, de modo a obter-se uma concentração final de agar de 0,35%.

O meio de cultura foi distribuído à razão de 9 ml por tubo, posteriormente esterilizado em autoclave (121°C durante 15 minutos) e permaneceu à temperatura ambiente até alcançar 45-50°C. Uma vez atingida esta temperatura as estirpes foram inoculadas com ansa de sementeira. Posteriormente, o meio solidificou à temperatura ambiente, com os tubos na posição vertical. A incubação foi realizada a 35°C durante um período variável entre 24 e 72 h, uma vez que as estirpes que apresentam crescimento em condições de anaerobiose podem ter taxas de crescimento mais lentas.

Os microrganismos que cresceram nestas condições foram classificados de aeróbios, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos consoante o seu crescimento tenha ocorrido, respectivamente, na superfície do meio de cultura, na superfície e no interior do meio de cultura ou exclusivamente no interior do meio.

8.6.4 - Provas selectivas

As provas selectivas foram realizadas tendo como base as culturas seleccionadas pelas provas de identificação prévias (capítulo 8.6.3).

8.6.4.1 - Produção de CO₂

Prova realizada utilizando apenas microrganismos da família *Lactobacillaceae* com o objectivo de eliminar do processo de selecção microrganismos produtores de CO₂, indesejáveis na composição de culturas de arranque.

O meio de cultura utilizado foi o de Gibson, com a seguinte composição:

Extrato de carne	5 g
Triptona	10 g
Peptona	5 g
Glucose	50 g
NaCl	15 g
Gelatina	200 g
Água destilada	1000 ml

pH final, aproximado, de 6,4

O meio de cultura é distribuído em tubos (160x10 mm) à razão de 8 ml por tubo, ocorrendo posteriormente a esterilização (121°C durante 15 minutos).

A semienteira foi feita com uma pipeta de Pasteur, em espiral, desde o fundo até à superfície; acto contínuo adicionou-se à superfície do meio 2 ml de uma solução de agar a 2% (p/v). Esta solução, uma vez solidificada, constituirá uma membrana que retém o gás (CO_2) produzido, distendendo-se. A produção de gás, proveniente da fermentação dos açúcares, revela o carácter heterofermentativo das bactérias, característica não desejável em microrganismos que integram culturas de arranque. Deste modo, foram excluídas do estudo todas as bactérias produtoras de CO_2 .

8.6.4.2 - Capacidade nitrato-redutase

A capacidade nitrato-redutase foi estudada de acordo com o método recomendado pela A.P.H.A. (1984) em caldo indol-nitrito, composto por:

Triptona	20 g
Fosfato dissódico	2 g
Nitrato de potássio	1 g
Glucose	1 g
Agar	1 g
Água destilada	1000 ml

pH final, aproximado, de 7,2.

O meio, distribuído à razão de 3 ml por tubo, foi esterilizado em autoclave (121°C durante 15 minutos). A incubação ocorreu a 30°C durante 18 horas, após o que a reação foi avaliada adicionando a cada tubo 2 gotas de cada uma das seguintes soluções:

Solução A:

Ácido sulfanílico	0,5 g
Ácido acético glacial	30 ml
Água destilada	120 ml

Solução B:

N(1-naftil) etilendiamina dihidroclorada	0,2 g
Ácido acético glacial	30 ml
Água destilada	120 ml

O aparecimento de uma cor roxo-violácea no meio de cultura após 10 minutos indicou que os nitratos haviam sido reduzidos a nitritos. Nos casos em que não apareceu esta coloração adicionaram-se ao meio uns grânulos de pó de zinco (Sigma), com a finalidade de detectar o nitrito residual. Passados 10 minutos a reacção voltou a ser lida. O aparecimento de uma coloração roxo-violácea confirmou o resultado negativo, pelo que se consideraram as estirpes que ocasionaram estes resultados como não redutoras de nitratos. Em caso contário, assumiu-se que os nitratos haviam sido reduzidos a um estado distinto aos nitritos, considerando-se, nestes casos, a estirpe problema como redutora de nitratos.

As estirpes que se revelaram não redutoras de nitratos foram eliminadas do estudo.

8.6.4.3 - Tolerância ao cloreto de sódio

Para o estudo dos microrganismos pertencentes à família *Lactobacillaceae* utilizou-se caldo Elliker (Difco) como meio de base adicionado de 2% de agar e concentrações de cloreto de sódio de 5, 7, 8 e 9% (p/v).

Nas provas aplicadas às estirpes da família *Micrococcaceae* recorreu-se ao meio de cultura agar “Brain Heart Infusion” (BHI, Merck) adicionado de 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21% de cloreto de sódio.

Para ambas as famílias em estudo a sementeira foi realizada radialmente, à razão de 6 estirpes por placa. A incubação fez-se à temperatura de 30°C durante 48 h. Após a incubação consideraram-se os resultados como positivos (se houve crescimento bem visível em toda a superfície com que a ansa contactou), negativos (se não se verificou qualquer crescimento) ou crescimento débil (se houve algum crescimento, mas não em toda a superfície com que a ansa contactou, ou se existiu crescimento em toda a superfície onde a ansa contactou embora mal visualizado).

8.6.4.4 - Crescimento a 4,5 °C e a 7°C

Para a avaliação da capacidade de crescimento de *Micrococcaceae* às temperaturas de 4,5 °C e de 7 °C utilizaram-se os mesmos meios de cultura que foram referidos na prova anterior; as estirpes foram semeadas radialmente à razão de 6 por placa. A incubação realizou-se a 4,5 °C e a 7 °C, durante 48 h, permanecendo até às 60 h de incubação as estirpes que não apresentaram crescimento até às 48 h, para verificação do seu possível desenvolvimento.

As estirpes de *Lactobacillaceae* foram semeadas em tubos com caldo MRS (Oxoid) que incubaram a 4,5 °C e 7 °C durante 48 h, em aerobiose e em anaerobiose, numa jarra de anaerobiose. Quando não se verificou crescimento, o período de incubação foi alargado até às 60 h, para verificação de possível desenvolvimento de algumas estirpes. Foi considerado haver crescimento microbiano quando o meio se apresentou turvo.

8.6.4.5 - Tolerância a 100 ppm de nitrito de sódio

Para esta prova usou-se como meio base agar “Brain Heart Infusion” (BHI, Merck), para *Micrococcaceae*, e caldo Elliker (Difco), para *Lactobacillaceae*, ambos os meios adicionados de 100 ppm (p/v) de nitrito de sódio. Em qualquer dos casos a incubação realizou-se durante 48 h à temperatura de 30 °C. As estirpes que não se desenvolveram nestas condições foram eliminadas do estudo.

8.6.5 - Identificação das estirpes seleccionadas

Para a identificação das estirpes seleccionadas utilizaram-se culturas jovens, que haviam sido submetidas a uma incubação de 48 h a 30°C em caldo “Brain Heart Infusion” (BHI, Merck), para a família *Micrococcaceae*, e em caldo Elliker (Difco), para a família *Lactobacillaceae*.

8.6.5.1 - Família *Micrococcaceae*

8.6.5.1.1 - Crescimento em agar FP

Realizou-se segundo a técnica descrita por Rheinbaben e Hadlok (1981), recomendada na última edição do Manual Bergey (Schleifer, 1986) para diferenciação dos géneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*.

Como meio base foi utilizado o agar P (Kloos *et al.*, 1974) com a seguinte composição:

Peptona	10 g
Extracto de levedura	5 g
Cloreto de sódio	5 g
Glucose	5 g
Agar	12 g
Água destilada	1000 ml

pH final próximo de 7,0.

Após a esterilização do meio em autoclave (15 minutos, 121°C) e arrefecimento à temperatura ambiente até aos 45 - 50 C, adicionaram-se-lhe 100 ml de uma solução de furazolidona em acetona a 0,02% (p/v), misturada mediante suave agitação, obtendo-se deste modo o agar FP. A concentração final de furazolidona no agar FP foi de 20 µg/ml (p/v). Antes da preparação das placas, para facilitar a evaporação da acetona, os frascos com meio de cultura permaneceram num banho de água (60 - 70 C) de 3 a 5 minutos, ligeiramente destapados.

Seguidamente, realizou-se, em duplicado, semienteira em estria das estirpes em estudo no agar P e no agar FP, radialmente, à razão de 6 estirpes por placa.

Concluída a incubação durante 48 horas a 30 C, as estirpes que apresentaram desenvolvimento forte ou débil em agar FP foram designadas como pertencentes ao género *Micrococcus*. Foram considerados como pertencentes a este género as estirpes que apresentaram, também, crescimento em agar P, para além de terem crescido em agar FP. As estirpes que cresceram em agar P e não em agar FP consideraram-se do género *Staphylococcus*.

8.6.5.1.2 - Provas bioquímicas

8.6.5.1.2.1 – Galerias API STAPH

As provas bioquímicas fizeram-se com recurso a galerias API STAPH (Biomerieux) para a identificação de espécies dos géneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*, seguindo as indicações da nota técnica (versão H) API-2050.

Para identificação das espécies, procedeu-se à sua semienteira em agar P, seguida de incubação a 35-37 C durante 18 h. Com ansa de semienteira foram colhidas colónias bem isoladas, normalmente em número de duas e com diâmetro inferior a 2 mm, para que ao serem suspensas em caldo API STAPH se consiga uma opacidade final equivalente ao ponto 0,5 (aprox. $4,5 \times 10^8$ u.f.c./g) da escala de McFarland (Biomerieux).

Realizada a suspensão das estirpes, procedeu-se à sementeira das mesmas sobre as galerias API, em câmara de fluxo laminar e com uso de uma pipeta de Pasteur. As galerias foram incubadas a 37°C durante 48 h.

Em cada galeria são realizadas as seguintes provas:

a) Acidificação a partir de carbohidratos

Estudou-se a formação de ácido a partir dos seguintes carbohidratos: D-glucose, D-frutose, D-manoze, maltose, lactose, D-trehalose, D-manitol, xilitol, D-melibiose, rafinose, xilose, sacarose, α -metil-D-glucósido e N-acetil-glucosamina. A produção de ácido foi detectada pela viragem de cor do meio de vermelho a amarelo. A leitura é realizada fazendo-se a comparação entre o tubo controlo (negativo) e o tubo que contém glucose (positivo).

b) Redução de nitratos a nitritos

O estudo incidiu sobre a redução do nitrato de potássio. A reacção é detectada mediante a adição dos reagentes NIT1 e NIT2 (API). 10 minutos após a adição daqueles reagentes o meio adquiriu coloração vermelha se ocorreu redução de nitrato a nitrito. Em caso contrário o meio permaneceu incolor e procedeu-se à adição de pó de zinco, seguindo a técnica já descrita neste mesmo capítulo para a avaliação da capacidade da nitrato-redutase.

c) Produção de fosfatase alcalina

A produção de fosfatase alcalina foi revelada mediante a adição dos reagentes ZYM A e ZYM B (API). A cor do meio virou de amarelo para violeta quando houve ataque ao α -naftilfosfato.

d) Produção de acetil metil-carbinol

É revelada através da adição dos reagentes VP1 e VP2 (API). Decorridos 10 minutos desde a adição dos reagentes, a presença de acetilmetylcarbinol, produzido a partir do piruvato de sódio, é detectada pela mudança de cor, de incolor a rosa violáceo.

e) Produção de arginina dihidrolase

A hidrólise da arginina foi detectada pela mudança de cor do meio de amarelo para vermelho.

f) Produção de urease

A hidrólise da ureia produziu uma mudança de cor no meio de amarelo para vermelho violáceo. Para esta prova e para a anterior (produção de arginina dihidrolase), os tubos vão a incubar preenchidos superficialmente com óleo de parafina estéril, para que se criem condições de anaerobiose.

Para a identificação das estirpes foi necessário codificar o conjunto das reacções obtidas num perfil numérico. Na ficha de resultados as provas estão separadas em grupos de 3, podendo cada grupo receber o valor de 1, 2 ou 4, consoante os resultados. Como a galeria é constituída por 21 provas obtém-se um código de 7 dígitos.

A resistência à lisostafina, característica do género *Micrococcus*, constitui a 21^a prova. No nosso trabalho a prova da lisostafina foi substituída pela prova do crescimento em agar FP, já descrita neste mesmo capítulo, e que permite identificar os géneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*.

Após a obtenção do perfil numérico procedeu-se à identificação das estirpes com o auxílio do Catálogo Analítico API-STAPH (API, 1986). Quando a percentagem de identificação do perfil obtido foi igual ou superior a 80% considerou-se que a estirpe em estudo correspondia à taxonomia indicada. Segundo a percentagem obtida, a identificação foi considerada excelente ($\geq 99,9\%$), muito boa ($\geq 99,0\%$), boa ($\geq 90,0\%$) e aceitável ($\geq 80,0\%$).

8.6.5.2 - Família *Lactobacillaceae*

8.6.5.2.1 - Provas bioquímicas

8.6.5.2.2.1.1 - Prova da acidificação a partir de hidratos de carbono

Nesta prova foi estudada a formação de ácido a partir dos hidratos de carbono arabinose, trealose e manitol, que foram adicionados em separado a um meio base com a seguinte composição:

Peptona	15 g
Extracto de levedura	5 g
Tween 80	1 g
Arabinose, ou	
Trealose, ou	
Manitol	10 g
Vermelho de clorofenol*	5 ml
Água destilada	1000 ml

pH final: 6,4

*Solução vermelho de clorofenol:

Alcool etílico 95°	5,0 ml
Clorofenol	0,04 g

Os 3 meios obtidos, cada um com um açúcar diferente, são distribuídos em tubo, à razão de 5 ml, e esterilizados durante 10 minutos a 115°C, para prevenir a caramelização dos açúcares. Os meios são semeados com as culturas jovens obtidas de acordo com o referido em 8.6.5 e incubados durante 24h a 30 C. A produção de ácido detecta-se pela viragem da cor do meio, de vermelho a amarelo. A leitura é imediata e faz-se através da comparação entre o tubo controlo (negativo) e o respectivo tubo semeado.

8.6.5.2.1.2 - Galeria API 50 CHL

A utilização da galeria API 50 CHL (Biomerieux) permite a identificação de *Lactobacillus* spp., usando como meio de suspensão API 50 CHL Medium (ref. 50410), seguindo as indicações da nota técnica (versão C) API.5030.

A partir de culturas que incubaram a 30°C durante 24 h, em meio MRS agar (Oxoid), colheram-se, com ansa de platina, colónias bem isoladas da estirpe em estudo, em quantidade suficiente para que, ao suspendê-las no caldo API 50 CHL, se conseguisse uma opacidade final equivalente à escala 2 de McFarland (Biomerieux). Após a suspensão das culturas, em condições de assépsia, inocularam-se cada um dos 50 tubos da galeria API. Esta foi a incubar a 30-34°C durante 24 h.

A galeria API 50 CHL permite realizar o estudo do metabolismo fermentativo de 49 hidratos de carbono. É composta por 50 micro tubos. O primeiro tubo, sem princípio activo, funciona como controlo (negativo), cada um dos seguintes 49 tubos contém, em quantidade definida, hidratos de carbono e derivados. Estes substratos poderão ser metabolizados por fermentação, em anaerobiose, dando lugar à produção de ácido. A produção de ácido é detectada pela mudança de cor em cada tubo, de vermelho violáceo a amarelo, revelada pelo indicador (Púrpura de Bromocresol) de pH do meio. O tubo nº 25 (teste da esculina) constitui excepção, virando de vermelho violáceo a preto, quando há produção de ácido. A leitura de cada tubo faz-se por comparação com o tubo controlo (negativo).

8.6.6 – Outras provas de interesse tecnológico

8.6.6.1 - Capacidade proteolítica das estirpes seleccionadas

8.6.6.1.1 - Hidrólise da caseína

A técnica descrita por Martley *et al.* (1970) foi a empregue. Para esta prova, realizada para todas as estirpes seleccionadas, utilizou-se o meio de cultura agar cálcio caseinato (ACC, Pronadisa), adicionado de 1% de leite desnatado, com a seguinte composição:

Peptona de carne	5 g
Extracto de carne	3 g
Cloreto de sódio	5 g
Caseína (Hammarsten)	2,5 g
Hidróxido de cálcio	0,005 g
Agar bacteriológico	13,5 g
Água destilada	1000 ml

pH final: 7,2 ± 0,2

Após esterilização do meio em autoclave (15 minutos, 121°C), estirpes jovens de *Micrococcaceae* foram semeadas radialmente, à razão de 6 por placa. A incubação fez-se a 30°C durante 48 h. As estirpes proteolíticas produziram um halo transparente em seu redor.

As estirpes de lactobacilos foram semeadas em estria à razão de 4 por placa. As condições de incubação foram idênticas às indicadas para *Micrococcaceae*.

8.6.6.2 - Capacidade lipolítica das estirpes seleccionadas

8.6.6.2.1 - Hidrólise da tributirina

Foi seguida a técnica descrita por Mourey e Kilbertus (1976), para todas as estirpes em estudo. Utilizou-se o meio de cultura agar extracto de carne, extracto de levedura, peptona, tributirina (BYPTA), composto por:

Extracto de carne	5 g
Peptona	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Extracto de levedura	3 g
Tributirina	5 g
Alcool polivinílico	1 g
Agar	15 g
Água destilada	1000 ml

pH final: 7,0

Em banho maria, o agar foi dissolvido em 250 ml de água destilada. Os restantes ingredientes foram dissolvidos em 750 ml de água destilada e homogeneizados em Ultra – Turrax (IKA Labortechnik, T25 basic) a 15 000 rpm, até ser obtida uma emulsão leitosa. Ambas as porções foram misturadas e o meio foi esterilizado em autoclave (15 minutos, 121°C).

As estirpes foram semeadas (radialmente, à razão de 6 por placa, para micrococáceas, e em estria, à razão de 4 por placa, para lactobacilos) e foram a incubar durante 48 h a 30°C. As estirpes lipolíticas produziram um halo transparente em redor da zona semeada.

8.6.6.2.2 - Hidrólise do tween 40

Nesta prova, usada para todas as estirpes em estudo, utilizou-se o agar Sierra (Harrigan e McCance, 1968) composto por:

Peptona	10 g
---------	------

Cloreto de cálcio hidratado	0,1 g
Cloreto de sódio	5 g
Tween 40	10 ml
Agar	15 g
Água destilada	1000 ml

pH final: aproximadamente 7,2.

Após ter sido esterilizado em autoclave (15 minutos, 121°C), o meio foi semeado (radialmente, à razão de 6 por placa, para micrococáceas, e em estria, à razão de 4 por placa, para lactobacilos). O aparecimento de um halo opaco em volta da zona semeada indicou que a estirpe tinha actividade lipolítica sobre este substrato.

8.6.6.2.3 - Hidrólise do tween 80

Seguiu-se a metodologia indicada na prova anterior, tendo havido unicamente a substituição do tween 40 pelo tween 80, como substrato a hidrolisar.

8.6.6.3 - Produção de compostos inibidores por *Lactobacillus* pelo método de difusão

Segundo o método de difusão (Villani *et al.*, 1993), foi estudada a possível produção de compostos inibidores por parte das estirpes seleccionadas sobre culturas de *Serratia liquefaciens* (IFI – SL65), *Listeria monocytogenes* (CECT – 932) e *Listeria innocua* (CECT – 910).

As estirpes seleccionadas com possível interesse tecnológico foram semeadas em tubos de ensaio contendo cada um 3 ml de caldo BHI (Merck), após o que foram a incubar, a 34°C durante 18 h em estufa com agitador, a 250 rpm. *S. liquefaciens*, *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram incubadas em caldo BHI (Merck), durante 24 h a 30°C.

Após a incubação das estirpes com possível interesse tecnológico centrifugaram-se 1,5 ml de cada cultura a 10 000 rpm durante 10 minutos. Do sobrenadante de cada tubo retiraram-se 20 µl que foram inoculados do modo que descrevemos no parágrafo seguinte.

Após a incubação de *S. liquefaciens*, *L. monocytogenes* e *L. innocua*, semeou-se por incorporação 1ml de cada uma daquelas culturas em placas de agar BHI (BHI adicionado de 1,5% de agar). Após solidificação, o meio foi perfurado à razão de 5 orifícios por placa; em seguida estes orifícios foram preenchidos com 20 µl do sobrenadante obtido como se refere no parágrafo anterior. Seguidamente, as placas foram colocadas no frigorífico durante 1 hora e depois incubadas a 30°C durante 18 h. Terminado o período de incubação, se houve produção de halos transparentes em redor dos orifícios, verificou-se a inibição do crescimento de *S. liquefaciens*, *L. monocytogenes* ou *L. innocua*, pelo que se considerou, nestes casos, ter havido produção de compostos inibidores por parte das estirpes com possível interesse tecnológico seleccionadas.

8.6.6.4 - Liofilização

Considerando que a liofilização permite guardar estirpes microbianas por longos períodos de tempo e também a sua aplicação directa a substratos como massas de carne ou leites, entre outros, entendemos pertinente estudar a resistência das estirpes seleccionadas àquele processo de conservação.

Para liofilizar as estirpes seleccionadas procedeu-se à sementeira destas em placas com meio de agar “Brain Heart Infusion” (BHI, Merck). Após incubação a 30°C durante 24 h, cada placa foi inundada com 6 ml de leite desnatado esterilizado. A população microbiana existente nas placas foi homogeneizada no leite com o auxílio de uma ansa. A mistura de bactérias e leite de cada uma das placas foi pipetada (2 ml/frasco) para 3 frascos adaptáveis ao liofilizador, com tampa de borracha sem vedar completamente, e congelados a 70°C negativos. A liofilização ocorreu num aparelho Edwards, modelo Modulyo 4K.

Para avaliar a resistência das estirpes à liofilização hidratou-se, com leite desnatado esterilizado, o conteúdo de 1 dos 3 frascos correspondentes a cada estirpe e de seguida semearam-se as estirpes, com o auxílio de uma ansa, em tubos com caldo BHI (Merck). A incubação fez-se em estufa com agitador a 250 rpm, a 34°C durante 18 h. Nos tubos onde não se verificou crescimento assumiu-se que as estirpes não resistiram à liofilização pelo que passaram a ser consideradas não seleccionadas. Os 2 tubos remanescentes correspondentes a cada uma das estirpes seleccionadas foram guardados para posterior utilização.

8.7 – Ensaios de inoculação

De entre as estirpes bacterianas seleccionadas no âmbito de estudo anterior foi escolhida uma estirpe de *Lactobacillus sakei* e uma outra de *Staphylococcus xylosus*, por terem sido as que apresentaram melhores resultados nas provas selectivas. Com estas estirpes foram realizados dois ensaios de inoculação, em cada uma das fábricas a que recorremos para estes estudos.

8.7.1 - Multiplicação das estirpes a inocular

As culturas usadas no primeiro ensaio de inoculação encontravam-se liofilizadas. Estas culturas foram activadas pela adição de 2 ml de leite desnatado estéril às ampolas que continham as culturas. As estirpes aplicadas no segundo ensaio de inoculação estavam congeladas, em tubos mantidos a - 84°C (numa ultra congeladora Sanyo MDF-U4086S), e que continham 0,5 ml de meio de cultura líquido rico em células bacterianas e 0,5 ml de glicerol. Foram activadas por descongelação à temperatura ambiente.

Duas horas após a adição de leite desnatado às culturas que estavam liofilizadas, ou concluída a descongelação das estirpes congeladas, as culturas foram repicadas com ansa de platina para tubos com meio de cultura MRS caldo – “Man, Rogosa and Sharpe” – (Oxoid), com 4% de NaCl, para *Lactobacillus sakei*, e em meio BHI – “Brain Heart Infusion” – (Merck), também com 4% de NaCl, para *Staphylococcus xylosus*. Os tubos inoculados foram a incubar, sob agitação orbital (250 rpm), à temperatura de 30°C, durante 48 h (*Lactobacillus sakei*), ou 24 h (*Staphylococcus xylosus*).

Após crescimento das culturas naqueles meios, foi confirmada a pureza das culturas mediante sementeira à superfície em placas com meio MRS agar (Oxoid), para *Lactobacillus sakei*, e meio MSA – “Manitol, Salt, Agar” – (Oxoid), para *Staphylococcus xylosus*. As culturas de ambos os meios incubaram a 30°C durante 72 horas. Porém, a incubação de *Lactobacillus sakei* fez-se em anaerobiose, utilizando-se para o efeito uma jarra (Oxoid) com catalizador, “kit” gerador de gases e indicador de anaerobiose.

Para a multiplicação de *Lactobacillus sakei*, a partir de uma colónia bem isolada de entre as que haviam crescido em MRS agar (Oxoid), com a ajuda de uma ansa estéril de platina semearam-se 2 Erlenmeyers (capacidade de 200 ml) que continham 30 ml de MRS caldo com 4% de NaCl. O meio inoculado foi a incubar, sob agitação orbital de 250 rpm, durante 48 h à temperatura de 30°C. Após este período de crescimento, o conteúdo de cada um dos Erlenmeyer foi transferido para outros dois Erlenmeyer (capacidade de 2000 ml) que continham 1000 ml de MRS caldo (Oxoid), com 4% de NaCl. Tal como os anteriores, foram colocados sob agitação (250 rpm) durante 48 h a 30°C.

Para a multiplicação de *Staphylococcus xylosus* seguiu-se metodologia identica, contudo o meio de cultura usado foi o BHI caldo (Merck) com 4% de NaCl e os períodos de incubação foram de 24 h a 30°C.

Após a multiplicação bacteriana, as culturas foram submetidas a centrifugação, por forma a concentrar o número de células microbianas assim como eliminar os metabolitos microbianos e o caldo nutritivo onde as bactérias cresceram. Para tal, as culturas que se haviam obtido foram centrifugadas a 8000 G durante 10 minutos, em ambiente refrigerado (8°C), numa centrífuga Sorvall RC-5B. De seguida eliminou-se o sobrenadante e as células concentradas foram ressuspensas em soro fisiológico. Esta solução foi homogeneizada e tornou a ser centrifugada. A operação efectuou-se duas vezes de modo a reduzir a influência de compostos estranhos no aroma dos enchidos.

Com o recurso à escala de McFarland (Biomerieux) foi estimado o número de microrganismos existentes por unidade de volume da solução concentrada de células bacterianas. Este valor foi confirmado por sementeira em placa de diluições daquela solução. Uma vez estimado (através da escala de Mc Farland) o número de células na solução concentrada procedeu-se à sua diluição em soro fisiológico estéril. As suspensões microbianas foram colocadas em recipientes providos de sistema de aspersão e foram mantidos sob refrigeração, a 7°C, durante um período máximo de 12 horas, até ocorrer a inoculação das massas. A viabilidade das células que constituiram estas suspensões foi verificada mediante a sementeira em placas de diluições decimais de amostras de inoculo líquido recolhidas no momento da inoculação das massas de carne.

8.7.2 - Inoculação das massas de carne para fabrico de paio

Em cada uma das fábricas foram preparados 4 lotes, com o peso unitário de 25 kg, de massa, destinados ao fabrico de paio de porco Alentejano. A concentração de microrganismos inoculados por grama de massa em cada um dos lotes foi, aproximadamente, de: ¹⁾ 10^8 células de *Lactobacillus sakei*; ²⁾ 10^8 células de *Staphylococcus xylosus*; ³⁾ 10^8 células de *Lactobacillus sakei* e 10^8 células de *Staphylococcus xylosus* e ⁴⁾o quarto lote não foi inoculado, funcionando como testemunha.

Estes lotes de massa resultaram na produção de paio de porco Alentejano em condições iguais. De cada lote foram retiradas 4 amostras em cada uma das seguintes fases de fabrico: ¹⁾massa não condimentada, ²⁾pré-enchimento, ³⁾fase intermédia da cura e ⁴⁾produto final.

Foram realizadas análises físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais. As análises reológicas e sensoriais incidiram apenas sobre o produto final.

As análises físico-químicas executadas foram as leituras do pH, da actividade da água (a_w) e da cor (L^* , a^* , b^*). As análises microbiológicas realizadas foram as indicadas em 8.4. As análises reológicas e sensoriais foram as enumeradas em 8.5.

As técnicas seguidas para a execussão daquelas análises são descritas no capítulo 8.8.

8.7.3 – Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados fez-se separadamente para os produtos de uma e outra fábrica. Portanto, relativamente aos dados obtidos para cada uma das fábricas, para as variáveis em estudo foram feitas análises de variância considerando os factores “fase de fabrico” (com 4 níveis: 1, 2, 3 e 4) e “modalidade de inoculação” (com 4 níveis: *L. sakei* x *S. xylosus*, *L. sakei*, *S. xylosus* e testemunha) e a interacção “fase de fabrico” x “modalidade de inoculação”. Para as interacções que foram significativas fez-se a comparação de médias pelo método de Tukey, considerando-se as diferenças significativas para $p<0,05$. Utilizou-se o programa Statistica 5.1.

8.8 - Métodos laboratoriais

8.8.1 - Análises físico-químicas, químicas e físicas

As amostras referidas no trabalho correspondem a volumes de massa destinada ao fabrico de enchidos ou unidades inteiras destes, em quantidade suficiente à realização das análises que nos propusemos efectuar.

8.8.1.1 - Preparação da amostra

As amostras, exceptuando as destinadas à determinação objectiva da cor e às análises reológicas, depois de removidas as tripas, foram trituradas e homogeneizadas numa picadora de facas “Robot Coupe”, após o que se iniciaram de imediato as determinações analíticas cujos resultados eram mais susceptíveis de alteração com a congelação (pH, a_w , humidade e azoto básico volátil total). A parte restante das amostras trituradas e homogeneizadas foi colocada em recipiente estanque e mantida a -18°C (dezoito graus Celsius negativos) até ser analisada.

As amostras destinadas à determinação objectiva da cor e às determinações reológicas não eram trituradas nem homogeneizadas e eram analisadas logo após a colheita.

8.8. 1.2 - pH

O pH foi determinado de acordo com o método descrito na Norma Portuguesa NP-3441 (1990). A leitura realizou-se com um potenciómetro digital da marca Crison, modelo 507.

8.8. 1.3 - Actividade da água (a_w)

Para realizar a determinação da actividade da água (a_w) recorreu-se ao equipamento específico Rotronic Hygroscop DT, com sonda WA-40 mantida à temperatura de 25°C .

8.8.1.4 - Humidade

A determinação da humidade fez-se por secagem da amostra em estufa a $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até massa constante, de acordo com a Norma Portuguesa NP – 1614 (1979). O resultado é expresso em percentagem.

8.8.1.5 - Teor de matéria gorda livre

Esta análise foi executada de acordo com a Norma Portuguesa NP – 1224 (1982), tendo-se utilizado o éter de petróleo como solvente; a extracção efectuou-se pelo método de Soxhlet sobre o resíduo seco. Os resultados foram expressos em percentagem.

8.8.1.6 - Proteína total

O teor de proteína total foi calculado multiplicando por 6,25 o teor de azoto total. Este foi calculado pelo método Kjeldhal, segundo a Norma Portuguesa NP – 1612 (1979). De acordo com esta técnica, a amostra é sujeita a digestão com ácido sulfúrico concentrado, que transforma o azoto orgânico em iões amónio, em presença de sulfato de cobre como catalisador. A adição de hidróxido de sódio provoca a libertação do amoníaco, sendo este destilado e recebido num excesso de solução de ácido bórico. O amoníaco recolhido foi quantificado por titulação com ácido clorídrico 0,1N.

8.8.1.7 - Cinza total

Determinação obtida por destruição total da matéria orgânica da amostra, primeiro por carbonização directa à chama, seguida de incineração em mufla a 550°C. De acordo com a Norma Portuguesa NP – 1615 (1979), os resíduos minerais foram pesados e os resultados apresentados em percentagem de produto.

8.8.1.8 - Teor de azoto básico volátil total (ABVT)

O teor de azoto básico volátil total, constituído pelo amoníaco e pelas aminas voláteis, foi determinado pelo método das células de Conway, de acordo com o descrito na Norma Portuguesa NP – 1848 (1987). Esta técnica consiste na precipitação da proteína pelo ácido tricloroacético, subsequente libertação da amónia por alcalinização com carbonato de potássio, recepção da mesma em solução de ácido bórico seguida de titulação do borato de amónia com solução de ácido clorídrico de título conhecido. O resultado é apresentado em miligramas de amoníaco por 100 g de produto.

8.8.1.9 - Acidez da gordura

A acidez da gordura foi determinada de acordo com a metodologia indicada por Pearson (1975). Após homogeneização da amostra com clorofórmio, o extracto homogeneizado foi filtrado e decantado. A acidez foi determinada titulando o extracto solubilizado em igual volume (25 ml) de etanol (95%) neutralizado, usando NaOH (0,1N) e solução alcoólica de fenolftaleína (1%) como indicador. O teor em gordura do extracto homogeneizado foi determinado gravimetricamente, após evaporação e dessecção de 10 ml do mesmo. Os resultados são expressos em percentagem de ácido oleico em relação à gordura total do extracto.

8.8.1.10 - Teor de cloretos

A determinação dos cloretos, expressos em cloreto de sódio, foi efectuada por extracção a quente, seguida de precipitação destes por nitrato de prata 0,1N cujo excesso, que não se combinou com os cloretos existentes na amostra, foi titulado com tiocianato de potássio 0,1N, na presença sulfato duplo de ferro e amónio, como descreve a Norma Portuguesa NP – 1845 (1982). A diferença entre o volume de tiocianato de potássio 0,1N gasto no ensaio em branco e na amostra permite calcular o teor de cloretos presentes na última, expresso em percentagem de NaCl.

Para a análise às massas de alho e pimentão recorreu-se à técnica descrita na Norma Portuguesa NP – 1422 (1979), sendo os resultados igualmente expressos em percentagem de NaCl.

8.8.1.11 - Determinação objectiva da cor

A determinação objectiva da cor foi efectuada através do sistema CIELAB (Artigas *et al.*, 1985), com recurso a um colorímetro Minolta CR-200. Usaram-se os valores de L* (medem a luminosidade, oscilando entre 0, para o negro, e 100, para o branco); os de a* (medem as tonalidades vermelha, valores positivos, e verde, valores negativos) e os de b* (medem as tonalidades amarela, valores positivos, e azul, valores negativos).

As medições fizeram-se na superfície de corte, em triplicado, usando para tal várias secções de cada amostra, e incidiram sobre a parte magra, que eventualmente poderia conter alguma gordura intramuscular.

8.8.1.12 - Perfil de ácidos gordos

Para a determinação do perfil de ácidos gordos procedeu-se previamente à extracção da gordura a frio, segundo o método descrito por Bannon *et al.* (1985). Para a metilação da gordura pesaram-se 200 mg de gordura fundida à qual se adicionaram 2 ml de hexano para solubilização da gordura. Subsequentemente foram adicionados 100 µl de uma solução de hidróxido de potássio 2N, utilizado como agente catalisador da hidrólise dos triacilglicéridos. Após agitação, a mistura foi deixada em repouso durante 30 minutos. Adicionaram-se mais 2 ml de hexano, ao que se seguiu mais um período de repouso de 10 minutos. O hidróxido de potássio foi neutralizado por igual volume de ácido clorídrico 2N, usando como indicador uma solução aquosa de laranja de metilo a 1%. Procedeu à injecção no cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890, Series II, equipado com um injector split-splitless e um detector de ionização de chama (FID). O cromatograma decorreu nas seguintes condições: temperatura inicial de 200°C durante 10 minutos; a rampa foi de 10°C/minuto até serem alcançados os 240°C, mantendo-se esta temperatura durante 11 minutos. A temperatura do

injector e do detector foi de 280°C. A identificação dos ácidos gordos fez-se por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos com os de uma mistura padrão de composição conhecida. Foram estudados os ácidos gordos láurico (12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), margárico (17:0), margaroleico (17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3), gadoleico (20:1) e heneicosenoico (C21:1). O teor de ácidos gordos foi expresso em percentagem do total de ésteres metílicos identificados.

Seguindo a metodologia indicada por Enser *et al.* (2000) calculámos o rácio P/S (ácidos gordos polinsaturados/ ácidos gordos saturados) pela razão entre o somatório dos ácidos gordos linoleico (18:2) e linolénico (18:3) e o somatório dos ácidos gordos láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0) e esteárico (18:0).

8.8.1.13 - Determinações reológicas

Para a avaliação das propriedades mecânicas recorreu-se a um analisador de textura Stable Microsystems Mod. TA-Hdi e ao “software” específico. Os testes realizados foram a Análise do Perfil de Textura (TPA – “Texture Profil Analysis”) e a determinação da força máxima de corte e do trabalho de corte, segundo a metodologia indicada por Caine *et al.* (2003) e Martinez *et al.* (2004). As amostras para o primeiro teste tinham forma cilíndrica, com 3,5 cm de diâmetro e 3,5 cm de altura, e foram comprimidas em dois ciclos, até 10% da altura inicial. Para a determinação da força máxima de corte e trabalho de corte as amostras eram constituídas por fatias com 4 mm de espessura que eram cortadas na totalidade com uma sonda de corte. Na análise do perfil de textura foram considerados os parâmetros dureza, coesividade, elasticidade, resiliência, gomosidade e masticabilidade.

8.8.2 - Análises microbiológicas dos enchidos

8.8.2.1 - Preparação da amostra

A recolha das amostras para análise microbiológica realizou-se de acordo com a Norma Portuguesa NP-1829 (1982).

Depois de recolhidas as amostras, procedeu-se, para cada uma, à pesagem asséptica de 10 g. Como diluidor foi usada a solução de triptona sal (triptona 0,3%; NaCl 0,85%) esterilizada. A suspensão foi homogeneizada recorrendo a um homogeneizador pulsátil Stomacher, modelo Seward 400. As diluições decimais foram efectuadas de acordo com a técnica descrita na Norma Portuguesa NP-3005 (1985).

8.8.2.2 - Contagem de microrganismos mesófilos totais

Determinação realizada em placa com meio de cultura “Tryptone Glucose Extract Agar” (Merck). Efectuou-se sementeira à superfície, em duplicado, de 0.1 ml de cada uma das diluições escolhidas. A incubação fez-se à temperatura de 30°C durante 48 h. Depois de contadas as colónias e calculada a média aritmética do número de colónias registado nas duas placas de cada uma das diluições expressaram-se os resultados em unidades formadoras de colónias por grama (u.f.c.g-1), tal como é indicado na Norma Portuguesa NP-1995 (1982).

8.8.2.3 - Contagem de microrganismos psicrotróficos totais

Após sementeira à superfície, em duplicado, de 0,1 ml de cada uma das diluições escolhidas em meio idêntico ao utilizado para a contagem de microrganismos mesófilos, as placas foram a incubar à temperatura de 6,5°C durante 10 dias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama, de acordo com a técnica da Norma Portuguesa NP-2307 (1987).

8.8.2.4 - Contagem de fungos

Para a contagem de fungos procedeu-se à sementeira em placa, à superfície e em quintuplicado, de 0.2 ml de cada uma das diluições preconizadas. Utilizou-se o meio de cultura “Yeast Extract Agar” (Merck), ao qual se adicionou 0.5% de ciclohexamida. A incubação fez-se a 25°C durante 5 dias; efectuou-se contagem separada de colónias de bolores e de leveduras. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama, seguindo a técnica descrita na Norma Portuguesa NP-2077 (1985).

8.8.2.5 - Contagem de *Lactobacillus* spp.

A cultura realizou-se em placa após sementeira em superfície de 0,1ml das diferentes diluições no meio selectivo agar MRS (Man, Rogosa e Sharpe - Oxoid) com pH de 6,2. A incubação fez-se durante 72 horas a 30°C, em condições de anaerobiose garantida pela utilização de uma jarra da marca Oxoid, com catalizador e indicador de anaerobiose. A contagem das colónias foi referida ao grama de produto, como nos casos anteriores.

8.8.2.6 - Contagem de bactérias ácido-lácticas

Para realizar esta análise seguiu-se a metodologia indicada para a contagem de *Lactobacillus* spp., variando apenas o pH do meio de cultura, que neste caso é de 5,7.

8.8.2.7 - Contagem de *Micrococcaceae*

Após sementeira à superfície de 0,1 ml das diluições preconizadas no meio selectivo MSA (Manitol Salt Agar – Oxoid), as placas inoculadas foram submetidas a uma incubação de 72 horas à temperatura de 30°C. Foram contadas as colónias características: redondas, com 1 a 3 mm de diâmetro, plano-convexas, bordo regular, superfície lisa, manitol negativas. As colónias manitol positivas (indicador do meio com cor amarela) não foram contadas, tal como as que pelas suas características morfológicas se revelaram *Bacilli*. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias de acordo com a Norma Portuguesa NP-1995 (1982).

8.8.2.8 - Contagem de esporos de bactérias aeróbias

Procedeu-se à prévia inactivação das formas vegetativas do inóculo em banho de água a 80°C durante 10 minutos, seguida de sementeira por incorporação de 1ml de cada uma das diluições escolhidas em placas com meio “Tryptone Glucose Extract Agar” (Merck). A incubação fez-se a 30°C durante 48 h. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama, de acordo com a Norma Portuguesa NP-1995 (1992).

8.8.2.9 - Contagem de *Enterobacteriaceae*

A contagem de *Enterobacteriaceae* fez-se em placa, no meio de cultura “Violet Red Bile Glucose Agar” (Oxoid). Efectuou-se sementeira à superfície de 0,1 ml da cada uma das diluições escolhidas, seguida de incubação a 37°C durante 48 h. Foram contadas as colónias vermelhas características e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama.

8.8.2.10 - Contagem de *Streptococci* do grupo D

Foi realizada sementeira por incorporação, em placa, de 1ml de cada uma das diluições escolhidas em meio “Kanamicina Aesculin Azide Agar” (Oxoid), seguida de

incubação a 37°C durante 48 h. Após a contagem das colónias típicas (com halo negro devido à hidrólise da esculina), expressaram-se os resultados em unidades formadoras de colónias por grama.

8.8.2.11 – Estimativa do número de células viáveis de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores

Após a inactivação das formas vegetativas do inóculo em banho de água a 80°C durante 10 minutos, procedeu-se à sementeira por incorporação de 1 ml de cada uma das diluições escolhidas em tubos com meio SPS (“Sulfit Polimixin Sulfadiazine Agar” - Merck), regenerados por ebulição e arrefecidos a 50°C. A incubação decorreu durante 72 h à temperatura de 44.5°C. De acordo com a Norma Portuguesa NP – 2262 (1986), foram considerados positivos os tubos que apresentaram colónias negras, resultantes da formação de sulfureto de ferro consecutiva à redução, pelas enzimas bacterianas, dos sulfitos em presença dos iões de ferro. Os resultados expressaram-se em número de esporos por grama.

Para o tratamento estatístico dos resultados, estes foram agrupados em classes do seguinte modo:

Classe 1	< 1 esporo g ⁻¹
Classe 2 > 1 e	< 10 esporos g ⁻¹
Classe 3 > 10 e	< 100 esporos g ⁻¹
Classe 4 > 100 e	< 1000 esporos g ⁻¹
Classe 5 > 1000 e	< 10 000 esporos g ⁻¹
Classe 6 > 10 000 e	< 100 000 esporos g ⁻¹

8.8.2.12 - Estimativa do número de células viáveis de bactérias coliformes

Semearam-se diferentes quantidades das diluições estipuladas em tubos com caldo lactosado com bílis e verde brilhante (“Brilliant Green Bile Lactose Broth” 2% - Merck) de dupla concentração (volumes de 10 ml) e de concentração simples (volumes de 1 ml). No interior dos referidos tubos foram colocados tubos de Durham em posição invertida. A incubação fez-se a 30°C, durante 48 h. De acordo com a Norma Portuguesa NP – 2164 (1983), consideraram-se positivos os tubos que apresentaram gás a ocupar, pelo menos, 1/10 da altura do tubo de Durham. Os resultados (expressos em número de bactérias por grama) foram referidos considerando haver pelo menos uma bactéria no tubo positivo semeado com a mais baixa diluição e menos de uma bactéria no tubo negativo sequente de mais elevada diluição.

Para o tratamento estatístico dos resultados, estes foram agrupados em classes do seguinte modo:

Classe 1	< 1 bactéria g ⁻¹
----------	------------------------------

Classe 2	> 1 e	< 10 bactérias g ⁻¹
Classe 3	> 10 e	< 100 bactérias g ⁻¹
Classe 4	> 100 e	< 1000 bactérias g ⁻¹
Classe 5	> 1000 e	< 10 000 bactérias g ⁻¹
Classe 6	> 10 000 e	< 100 000 bactérias g ⁻¹

8.8.2.13 - Estimativa do número de células viáveis de *Escherichia coli*

A partir dos tubos em que foi detectada a presença de bactérias coliformes repicou-se 0,01 ml de inóculo para novos tubos com “Brilliant Green Bile Lactose Broth” 2% (Merck), e para tubos com água peptonada (Merck) a 1%. Os tubos inoculados foram incubados a 44,5°C durante 48 h. Segundo a Norma Portuguesa NP – 2308 (1986), a presença de *Escherichia coli* foi considerada positiva quando se verificou simultaneamente produção de gás no tubo com o meio de cultura (“Brilliant Green Bile Lactose Broth”) e produção de indol no tubo com água peptonada, sendo a presença de indol revelada pela formação de uma coroa de coloração alaranjada na superfície da água peptonada após a adição do reagente de Kovacs. Os resultados apresentam-se de forma idêntica ao indicado para a estimativa do número de células viáveis de bactérias coliformes.

Classe 1		< 1 bactéria g ⁻¹
Classe 2	> 1 e	< 10 bactérias g ⁻¹
Classe 3	> 10 e	< 100 bactérias g ⁻¹
Classe 4	> 100 e	< 1000 bactérias g ⁻¹
Classe 5	> 1000 e	< 10 000 bactérias g ⁻¹
Classe 6	> 10 000 e	< 100 000 bactérias g ⁻¹

8.8.3 - Análises Microbiológicas à Água

8.8.3.1 – Preparação da amostra

A água analisada procedeu da rede pública; as amostras foram recolhidas em condições de assepsia, para frascos esterilizados, cumprindo o indicado nas Normas Portuguesas NP – 1829 (1982) para recolha de amostras. Para todas as análises seguiram-se os procedimentos indicados em Anónimo (1983).

8.8.3.2 - Bactérias aeróbias

Crescimento a 37°C

Sementeira em placa, por incorporação, em meio de cultura TGE (“Tryptone Glucose Extract Agar” – Merck). Para cada amostra foram usadas duas placas, uma inoculada com

1ml e outra com 0,1 ml. A incubação fez-se a 37°C durante 48 horas. Os resultados foram expressos em número de bactérias aeróbias totais por ml.

Crescimento a 22°C

Procedimento idêntico ao acabado de referir, contudo o meio inoculado foi a incubar a 22°C durante 72 horas. Os resultados foram apresentados em número de bactérias aeróbias totais por ml.

8.8.3.3 - Estimativa do número mais provável de *Streptococci* fecais

Sementeira de 50 ml de inóculo em tubos múltiplos (três) com meio de Roth (caldo “Azide Dextrose” - Merck) de dupla concentração; sementeira de 10 ml de inóculo em outros três tubos com o mesmo meio e na mesma concentração, sementeira de 1 ml de inóculo em outros três tubos com o mesmo meio mas com concentração simples e ainda sementeira de 0,1 ml de inóculo em outros três tubos com o mesmo meio de cultura e concentração idêntica à anterior. Os tubos contendo o meio inoculado foram incubados a 37°C durante 48 horas, tendo sido considerados positivos os que apresentaram turvação e/ou sedimentação. A confirmação dos resultados positivos fez-se transferindo três ansas dos tubos que haviam sido positivos na prova presuntiva para tubos contendo meio de cultura “Bromocresol-Purple Azide” caldo - Merck, seguido de incubação a 37°C durante 24+24 horas. Confirmaram-se positivos os que ao fim de 24 ou 48 horas apresentaram turvação e/ou sedimento violeta. O resultado final, calculado por tabulação, vem expresso em número mais provável (NMP) de *Streptococci* fecais por 100 ml de água.

8.8. 3.4 - Estimativa do número mais provável de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores

Após inactivação das formas vegetativas da amostra por aquecimento em banho de água a 80°C durante 5 minutos, semearam-se 20 ml da amostra em tubo contendo 20 ml do meio de cultura agar SPS (“Sulfit Polimixin Sulfadiazine” - Merck), regenerados por ebulição e arrefecidos a 50°C. A incubação decorreu à temperatura de 37°C durante 48 horas após o que foram contadas as colónias negras desenvolvidas na totalidade da coluna de meio de cultura. O resultado foi expresso em número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores em 20 ml de água.

8.8.3.5 - Estimativa do número mais provável de bactérias coliformes

Inoculação de diferentes volumes de água a analisar em séries de tubos contendo o meio de cultura “Brilliant Green Bile Lactose Broth” (Merck). No interior dos referidos tubos foram colocados tubos de Durham em posição invertida. Numa primeira fase, prova presumível, inocularam-se 50 ml da amostra num tubo, 10 ml da amostra em 5 tubos e 1 ml da amostra em outros 5 tubos. A incubação fez-se a 37°C durante 24 + 24 horas. De acordo com Anónimo (1983), consideraram-se positivos os tubos que apresentaram turvação do líquido e gás no tubo de Durham independentemente da quantidade. Estes tubos foram sujeitos a uma prova de confirmação que consistiu na repicagem de 0,1ml para tubo com meio de cultura “Brilliant Green Bile Lactose Broth” a 2% - Merck, de concentração simples e com tubo de Durham em posição invertida no seu interior, que foram a incubar à temperatura de 44,5°C durante 24 horas. Consideraram-se positivos os tubos que apresentaram formação de gás no tubo de Durham, sendo deste modo confirmada a presença de coliformes fecais. Os resultados foram expressos em número mais provável de bactérias por mililitro.

8.8.3.6 - Estimativa do número mais provável de células viáveis de *Escherichia coli*

A partir dos tubos em que foi detectada a presença de bactérias coliformes, procedeu-se de forma idêntica ao referido para as amostras de alimentos sólidos. Os resultados foram expressos em número mais provável de bactérias por mililitro.

De modo a permitir um tratamento estatístico mais adequado, os resultados das contagens de microrganismos foram transformados em unidades logarítmicas, tendo-se assumido que existiu 1 unidade formadora de colónia (log 0) nas determinações cujos resultados foram inferiores ao limiar de detecção dos métodos utilizados.

8.8.4 - Análise sensorial

8.8.4.1 - Preparação da amostra

As amostras destinadas à apreciação sensorial foram preparadas em fatias com espessura de, aproximadamente, 3 mm. Esta preparação era feita cerca de 30 minutos antes de se iniciarem as provas, mantendo-se as fatias à temperatura ambiente. Nos casos em que se avaliaram enchidos que haviam sido conservados sob vácuo ou sob atmosfera modificada, aqueles eram retirados dos sacos no dia anterior à prova e mantidos à

temperatura ambiente. Cada amostra, codificada com três dígitos, foi apresentada em pratos brancos. Os provadores tinham à sua disposição bolachas de água e sal e água para eliminar aromas e sabores residuais. Em cada sessão de prova o número máximo de amostras avaliadas foi de 6.

8.8.4.2 - Painel de provadores

Ao longo do tempo em que decorreram estes estudos, utilizou-se um painel de provadores treinados para análise sensorial de presunto de porco Alentejano. Em média, este painel foi constituído por 14 elementos; o número mínimo de provadores a comparecer numa sessão foi de 10. Antes de se iniciarem as sessões de prova directamente implicadas com este trabalho fizeram-se duas sessões durante as quais se provaram amostras dos enchidos estudados neste trabalho e se explicou o significado dos atributos a analisar.

8.8.4.3 - Avaliação sensorial

A avaliação sensorial decorreu numa sala concebida para o efeito, satisfazendo as exigências de Costell e Durán (1981d). As provas iniciavam-se às 10 horas e terminavam às 12 horas. Os provadores realizavam as tarefas dentro deste horário, conforme as suas disponibilidades.

Esta avaliação fez-se segundo o método de análise descritiva quantitativa. Foram considerados os atributos intensidade da cor, presença de cores estranhas, marmoreado (proporção, na superfície de corte do enchido, entre carne e gordura), intensidade do aroma, presença de aromas considerados desagradáveis, tenrura, fibrosidade, suculência, intensidade do sabor, presença de sabores considerados desagradáveis, intensidade da salga e apreciação global. Para quantificar estes atributos utilizou-se uma escala estruturada pontuável de 0 a 100 (Figura 2). Sempre que possível, os provadores indicaram as cores estranhas e compararam os aromas e sabores desagradáveis detectados com outros do conhecimento geral. No caso do atributo intensidade da salga o valor óptimo esperado era de 50; valores aquém representariam insuficiência de sal e valores além de 50 representariam excesso de sal.

PROVADOR _____	AMOSTRA _____	DATA _____
APRECIAÇÃO VISUAL		
INTENSIDADE DA COR		
CORES ESTRANHAS		
Qual ou quais?		
MARMOREADO		
APRECIAÇÃO OLFACTIVA		
INTENSIDADE DO AROMA		
AROMAS ESTRANHOS		
Qual ou quais?		
APRECIAÇÃO DA TEXTURA		
TENRURA		
FIBROSIDADE		
SUCULÊNCIA		
APRECIAÇÃO DO SABOR		
INTENSIDADE DO SABOR		
SABORES NEGATIVOS		
Qual ou Quais?		
INTENSIDADE DA SALGA		
APRECIAÇÃO GLOBAL		

Figura 2 – Ficha de análise sensorial de paio de porco Alentejano.

III - Resultados e discussão

9 - Duração e condições ambientais das etapas de fabrico

Este capítulo preambular tem por objectivo contribuir para um melhor conhecimento do processo de fabrico do paio de porco Alentejano, focando três aspectos: ⁱ⁾ a duração de cada uma das etapas do fabrico (desde o cais de recepção até ao produto final), ⁱⁱ⁾ os parâmetros ambientais ao longo das várias etapas do fabrico e ⁱⁱⁱ⁾ as perdas de peso, desde o enchimento até ao produto final.

Por limitações humanas não nos foi possível fazer coincidir a recolha da informação apresentada neste capítulo com a da caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico, cujos resultados são apresentados no capítulo 11. Contudo, cremos na utilidade da informação que passamos a apresentar.

9.1 - Duração das etapas de fabrico

Apesar da fábrica B produzir o triplo da quantidade de produtos de salsicharia que a fábrica A, esta apresenta, em qualquer dos lotes, um número de carcaças recebidas superior ao verificado na outra fábrica (Quadro 15). Estes valores devem-se ao facto da fábrica A produzir, exclusivamente, produtos do porco da raça Alentejana, enquanto a fábrica B transforma maioritariamente carcaças de porcos de raças precoces. Por outro lado, na fábrica A compram sempre carcaças, que são desmarchadas na própria fábrica, enquanto que na fábrica B, por vezes, adquirem também aparas de carne de porco Alentejano. Este comportamento contribui também para que o número de carcaças recebidas seja inferior na fábrica B.

Não se apresentam, para a fábrica B, tempos de permanência das carcaças na câmara de recepção uma vez que nesta fábrica as carcaças passam directamente do cais de recepção para a sala de desmancha.

Observa-se uma certa tendência para desmanchar mais rapidamente as carcaças quando o número daquelas é mais elevado. A título de exemplo refira-se que na fábrica A demorou-se, em média, 64 segundos por carcaça para desmanchar 100 carcaças, enquanto na fábrica B gastaram-se, em média, 113 segundos por carcaça num lote constituído por 8 carcaças.

Na fábrica A os tempos de maturação das massas foram claramente superiores aos praticados na fábrica B (entre 96 e 120 horas na fábrica A; entre 39 e 43 horas na fábrica B). Esta etapa do processo de fabrico tem duração muito variável, em função do tipo de produto e dos hábitos culturais existentes nas várias regiões do nosso país. Oliveira (1989) para o chouriço de carne português produzido industrialmente numa fábrica localizada nos arredores de Lisboa usou um período de maturação de 24 horas. Rosário (1989) produziu salpicão tradicional de Vila Real e usou um período de maturação das massas de 12 dias. Chouriço (1999) para enchidos tradicionais da região de Estremoz e Borba, designados por “paia de lombo”, “paio” e “chouriço grosso” refere tempos de maturação de 2 dias. Patarata (2002), ao fabricar linguiça tradicional transmontana usou um tempo de maturação de 3 dias.

Quadro 15 – Duração para várias etapas do fabrico do paio de porco Alentejano, considerando três lotes de produção em cada uma das duas fábricas estudadas (A e B).

	FÁBRICA A			FÁBRICA B		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Nº de carcaças recebidas	100	31	37	12	15	8
Permanência de cada carcaça no cais de recepção a)	84 segundos	58 segundos	49 segundos	150 segundos	120 segundos	114 segundos
Câmara de recepção de carcaças b)	56 horas	30 horas	56 horas	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica
Tempo para desmanchar 1 carcaça c)	64 segundos	83 segundos	71 segundos	65 segundos	68 segundos	113 segundos
Câmara de maturação de massas	120 horas	96 horas	96 horas	39 horas	41 horas	43 horas
Sala de enchimento	3 horas	2 horas	2 horas	1 hora	1 hora	1 hora
Câmara de cura forçada	36 dias	55 dias	31 dias	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica
Sala de cura natural	49 dias	30 dias	25 dias	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica
Fumeiro	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica	6 dias	25 dias	14 dias
Câmara de secagem	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica	41 dias	0 dias	18 dias
Tempo total de cura	85 dias	85 dias	56 dias	47 dias	25 dias	32 dias
Datas do início / termo do fabrico	04-01-1999/ 08-04-1999	06-04-1999/ 07-07-1999	14-06-1999/ 17-08-1999	18-08-1999/ 06-10-1999	28-09-1999/ 26-10-1999	12-10-1999/ 16-11-1999

a) tempo médio por carcaça;

b) tempo de permanência das carcaças que constituem um lote, contabilizado desde a 1ª a entrar na câmara até à última carcaça a abandoná-la;

c) tempo médio para desmanchar 1 carcaça em pás, entremeada e lombada.

Quanto ao tempo de cura, os valores não são constantes em nenhuma das fábricas porque tanto numa como na outra existe uma etapa que é influenciada pelas condições ambientais: a sala de cura natural, na fábrica A e o fumeiro, na fábrica B. As condições ambientais tanto na sala de cura natural como no fumeiro estão dependentes das condições climatéricas exteriores, variando estas com a estação do ano. Deste modo, na fábrica A houve dois lotes produzidos entre Janeiro e Julho que tiveram, cada um, um tempo total de cura de 85 dias, e um terceiro lote, fabricado entre Junho e Agosto, que foi considerado pronto para venda aos 56 dias de cura. Na fábrica B o recurso ao fumeiro permite encurtar o tempo de cura. Nesta fábrica, o período total de cura mais longo foi de 47 dias (lote 1). O lote 2 permaneceu no fumeiro durante 25 dias, pelo que não houve necessidade de passar pela câmara de secagem.

Os resultados apresentados permitem-nos ter uma ideia da heterogeneidade dos tempos de cura em processos parcialmente influenciados pelas condições ambientais do exterior. Porém, estas diferenças nos tempos de cura, dependentes das diferentes condições ambientais dos locais onde decorre a cura (vide 9.2.6) resultam também em produtos finais com características não regulares, o que pode prejudicar a fidelização que se pretende entre o consumidor e o produto, neste caso paio de porco Alentejano.

9.2 - Avaliação das condições ambientais

As análises de variância apresentadas neste capítulo fizeram-se separadamente para cada uma das fábricas. Tínhamos conhecimento prévio de que as condições ambientais eram distintas entre as fábricas, razão porque decidimos estudar as características de um produto fabricado mediante dois processos diferentes. Assim, não foi nosso objectivo comprovar aquelas diferenças mas sim avaliar a regularidade daqueles parâmetros ao longo do tempo, razão porque acompanhámos três lotes de produção em cada fábrica.

9.2.1 - Cais de recepção das carcaças

A análise de variância (Quadro 16) mostrou haver diferenças significativas entre lotes de produção para as variáveis temperatura e humidade relativa, na fábrica A, e para a variável humidade relativa na fábrica B.

Quadro 16 – Análise de variância para o factor lote (1, 2 e 3), considerando as variáveis temperatura e humidade relativa do ar, registadas no cais de recepção das carcaças das duas fábricas (A e B).

Factor de variação	FÁBRICA A	FÁBRICA B		
Temperatura	Humidade relativa	Temperatura	Humidade relativa	
Valor de F	174,7900	58,3630	3,2010	26,1168
Valor de p	0,000004	0,00117	0,083	0,000107
Nível de significância	***	**	N.S.	***

Níveis de significância: N.S.=Não Significativo; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Na fábrica A a temperatura média do ar no cais de recepção (Quadro 17) variou entre 11,1 °C (lote 1, com início de produção em Janeiro) e 20,4 °C (lote 3, com início de produção em Junho). Estas grandes variações térmicas ocorreram porque o cais de recepção da fábrica A não é climatizado. Nesta mesma fábrica e também em função da época do ano, os valores da humidade relativa média do ar foram significativamente superiores no lote 1 (75,5%) comparativamente aos outros dois lotes, com valores inferiores a 60,0%. Contudo, do ponto de vista tecnológico as variações nos valores da humidade relativa não têm grande significado dado o curto período de permanência de cada carcaça no cais de recepção.

No cais de recepção da fábrica B, apesar de também não ser climatizado, a temperatura do ar manteve-se sem alterações significativas entre os lotes de produção, embora com valores elevados. Quanto à humidade relativa do ar registada no cais de recepção desta mesma fábrica, os valores mais baixos (50,9%) foram os do lote recebido em Agosto e os mais elevados (76,3%) corresponderam ao lote recebido em Outubro.

Quadro 17 – Médias e desvios-padrão para as variáveis temperatura (°C) e humidade relativa (%) do ar registadas no cais de recepção das carcaças, nas duas fábricas (A e B) e nos três lotes de fabrico estudados (1, 2 e 3).

	FÁBRICA A			FÁBRICA B		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Temperatura	11,1a±0,85	14,7b±0,12	20,4c±0,48	17,9±0,06	18,9±0,53	18,3±0,60
Humidade relativa	75,5b±3,11	54,6a±1,21	59,0a±1,45	50,9a±3,50	61,2b±8,43	76,3c±2,53

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

9.2.2 - Câmara de recepção de carcaças

Neste capítulo apenas se apresentam registos feitos na fábrica A uma vez que na fábrica B as carcaças passam directamente do cais de recepção para a sala de desmancia.

Através da observação dos Quadros 18 e 19 verifica-se que na câmara de recepção de carcaças da fábrica A não houve diferenças significativas entre lotes, nem para a temperatura (cujos valores se situaram próximos de 0°C) nem para a humidade relativa do ar (com registos próximos de 80%) (Quadros 4 e 5).

Quadro 18 – Análise de variância para o factor lote (1, 2 e 3), considerando as variáveis temperatura e humidade relativa do ar, registadas na câmara de recepção de carcaças da fábrica A.

FÁBRICA A		
Factor de variação	Temperatura	Humidade relativa
Valor de F	1,0538	1,1252
Valor de p	0,3547	0,3310
Nível de significância	N.S.	N.S.

Níveis de significância: N.S.=Não Significativo.

Quadro 19 – Médias e desvios-padrão para as variáveis temperatura (°C) e humidade relativa (%) do ar registadas na câmara de recepção de carcaças na fábrica A e nos três lotes de fabrico estudados (1, 2 e 3).

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Temperatura	0,72±1,54	0,05±1,56	0,60±1,81
Humidade relativa	79,4±2,66	80,5±2,84	80,4±2,95

Durante a permanência das carcaças na câmara de recepção (56 horas para os lotes 1 e 3; 30 horas para o lote 2) foram feitas 25, 21 e 20 medições de temperatura, respectivamente para os lotes 1, 2 e 3. Pela leitura da Figura 3 verificamos que 20 das medições realizadas para o lote 1 obtiveram resultados no intervalo de temperatura situado entre -1 C e 0 C. No lote 2 apenas 2 medições não obtiveram resultados entre -2 C e 0 C e no lote 3 houve inclusivamente 1 registo cujo resultado foi colocado no intervalo de temperatura entre -3 C e -2 C. Neste mesmo lote as temperaturas mais frequentemente registadas situaram-se entre os -1 C e 0 C, tal como havia acontecido nos outros dois lotes. No entanto, houve 3 registos entre os 3 C e os 4 C, situação que terá resultado de aberturas mais demoradas ou mais frequentes da porta da câmara, com reflexos mais notórios na temperatura do ar uma vez que o lote 3 começou a ser processado no final da Primavera.

A Portaria nº 252/96, de 10 de Julho, estipula que as carnes frescas devem ser arrefecidas imediatamente após a inspecção *post mortem* e mantidas, permanentemente, a uma temperatura igual ou inferior a 7 C. Deste modo, todas as medições de temperatura realizadas na câmara de recepção de carcaças estiveram de acordo com as exigências legais.

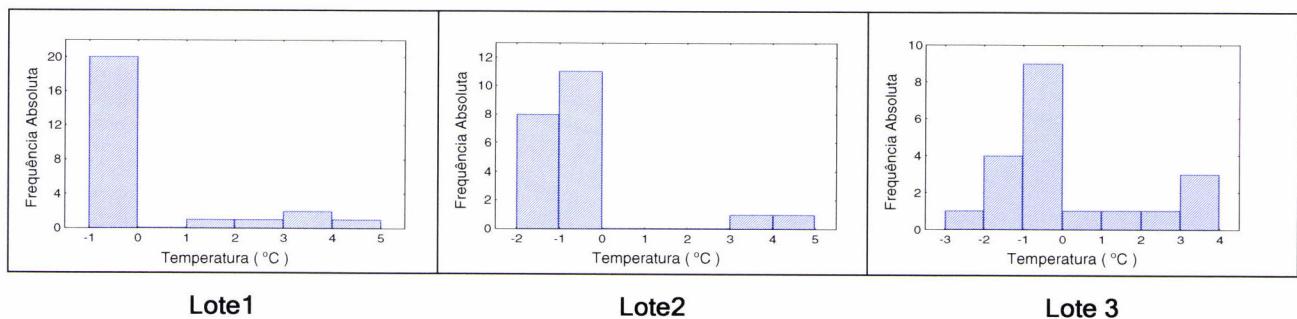


Figura 3 – Frequências absolutas para os registos de temperatura do ar da câmara de recepção de carcaças da fábrica A durante a permanência dos 3 lotes estudados.

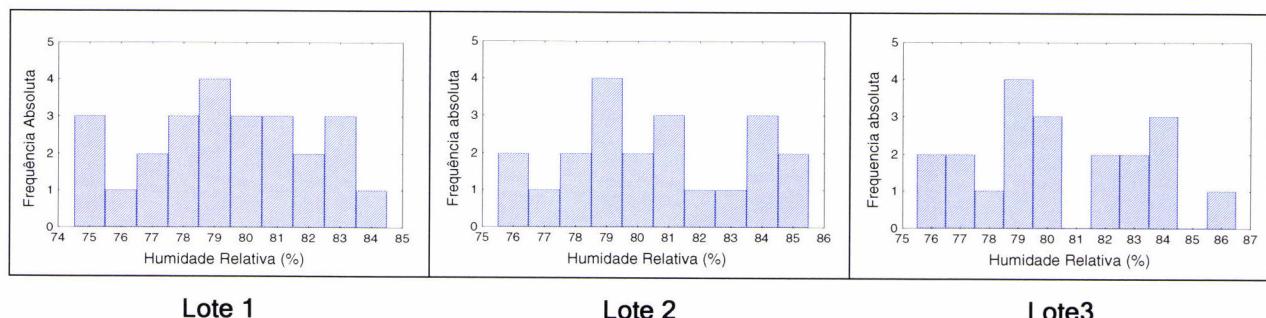


Figura 4 – Frequências absolutas para os registos de humidade relativa do ar da câmara de recepção de carcaças da fábrica A durante a permanência dos 3 lotes estudados.

É hoje bem conhecida a influência que o meio ambiente tem sobre as capacidades vitais dos microrganismos. Verifica-se assim que a qualquer mudança significativa das

condições ambientais corresponde, de forma inequívoca, uma alteração das características morfológicas e/ou fisiológicas dos microrganismos. Dos diferentes factores físicos que caracterizam o meio ambiente, a temperatura é o que tem uma influência mais relevante sobre o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos nos alimentos. No entanto, já foi experimentalmente demonstrado que os microrganismos são capazes de se desenvolver numa gama muito larga de temperaturas, que vai de -12 C a 90 C embora, obviamente, sejam muito raras as estirpes que revelam capacidade para se multiplicarem nas temperaturas extremas (Cruz, 1986). A quase totalidade dos microrganismos patogénicos para o Homem e para os animais de sangue quente (homeotérmicos) pertence ao grupo dos mesófilos, cuja temperatura mínima de crescimento varia entre os 5 e os 15 (Frazier e Westhoff, 1993); por outro lado, a temperatura exerce uma nítida influência sobre a curva de crescimento dos microrganismos e sobre a ocorrência de alguns fenómenos bioquímicos. São estas as razões fundamentais porque se recorre às baixas temperaturas para a conservação de alimentos perecíveis.

As medições da humidade relativa do ar (Figura 4), em número idêntico aos registos feitos para a temperatura, apresentaram uma amplitude semelhante nos 3 lotes; 75,0% foi o valor mais baixo registado e 86,0% foi o mais elevado.

9.2.3 - Sala de Desmancha

A humidade relativa do ar na sala de desmancha variou significativamente entre lotes nas duas fábricas (Quadro 20). Por outro lado, os registos da temperatura do ar apenas variaram, de forma significativa, entre lotes na fábrica A. Nesta fábrica, os valores médios da humidade relativa do ar (Quadro 21) variaram entre 74,1% (lote 2) e 76,5% (lote 3). Na sala de desmancha da fábrica B a humidade relativa do ar foi mais baixa, próxima de 70,0% em dois lotes e um outro com valor médio de 56,2%. Quanto aos registos da temperatura, em ambas as fábricas estiveram acima do legalmente exigido. Com efeito, o Decreto nº 44/93, de 27 de Novembro, determina que quando estiverem a decorrer as operações de corte das carnes a sala deve ser mantida a uma temperatura não superior a 12 C.

Quadro 20 – Análise de variância para o factor lote (1, 2 e 3), considerando as variáveis temperatura e humidade relativa do ar, registadas na sala de desmancha das duas fábricas (A e B).

	FÁBRICA A		FÁBRICA B	
Factor de variação	Temperatura	Humidade relativa	Temperatura	Humidade relativa
Valor de Fábrica	30,8928	3,3522	2,3085	13,4648
Valor de p	0,000000003	0,0441	0,1387	0,00068
Nível de significância	***	*	N.S.	***

Níveis de significância: N.S.=Não Significativo; *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,001$.

Quadro 21 – Médias e desvios-padrão para as variáveis temperatura (°C) e humidade relativa (%) do ar registadas na sala de desmancha das duas fábricas (A e B) e nos três lotes de fabrico estudados (1, 2 e 3).

	FÁBRICA A			FÁBRICA B		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Temperatura	13,3a±0,8	15,6c±1,4	14,2b±0,5	16,8±0,6	15,3±1,3	14,9±0,6
Humidade relativa	76,2b±1,8	74,1a±4,3	76,5b±1,8	56,2a±1,1	70,5b±3,6	70,0a±4,0

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes

Por outro lado Frey (1995) esclarece que a sala de desmancha de carnes não deve estar a uma temperatura superior a 12 °C, de modo a evitar uma intensa proliferação da microbiota psicrotrófica (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, entre outros) nas peças durante o corte. De acordo com o mesmo autor, a sala de desmancha deve possuir uma humidade suficientemente baixa de modo a evitar que o valor da actividade da água da carne aumente bruscamente.

9.2.4 - Câmara de maturação de massas

A maturação das massas de carne constitui um fenómeno complexo, todavia ainda não totalmente esclarecido, em que o sal, a água e os microrganismos desempenham funções relevantes. Com efeito, o sal introduz-se nos fragmentos da carne, extrai a água e a proteína das fibras musculares, actuando também como inibidor do desenvolvimento de bactérias que exijam valores elevados de actividade da água, como é o caso de grande parte de espécies patogénicas putrefactivas.

Apesar das condições ambientais nas câmaras de maturação poderem ser controladas, em ambas as fábricas as variáveis temperatura e humidade relativa apresentam diferenças significativas entre lotes de fabrico (Quadro 22).

A observação do Quadro 23 e das Figuras 5, 6, 7 e 8 mostra as diferenças acabadas de referir no parágrafo anterior. Quanto às temperaturas registadas na fábrica A, verifica-se que a maturação do lote 1 decorreu a temperaturas relativamente baixas, compreendidas principalmente entre 0 e 3 °C, no lote 2 as temperaturas foram relativamente elevadas, com 1 registo no intervalo entre 12 e 13 °C, e no lote 3 as temperaturas foram um pouco mais baixas que no lote 2. Na fábrica B não houve uma diferença tão acentuada entre os lotes, com um número maior de regtos a variar entre os 5 e os 8 °C, sensivelmente. As médias dos valores da humidade relativa foram sempre inferiores na fábrica A.

Os valores dos parâmetros ambientais referidos neste capítulo estão muito longe de gerarem consensos. De facto, surgem grandes variações, não só com o tipo de produto que se vai fabricar mas, principalmente, com os hábitos dos fabricantes, ocorrendo estas variações não apenas entre zonas geográficas de Portugal mas também dentro da mesma zona. Sousa e Ribeiro (1983) referem que durante o período de maturação deve manter-se

uma temperatura não superior a 10 C, entre outras razões para evitar o risco de multiplicação de *Staphylococcus aureus*. Contudo Oliveira (1989) usou uma temperatura de 19 - 20 C para a maturação de massas de carne destinadas ao fabrico de um tipo de chouriço de carne português, produzido numa fábrica instalada na Grande Lisboa. Rosário (1989) utilizou uma temperatura de 6 C e uma humidade relativa de 75% para a maturação de massas para fabrico de salpicão tradicional de Vila Real. Chouriço (1999) para a maturação de produtos tradicionais do Alentejo, designados por “paia de lombo”, “paio” e “chouriço grosso” refere temperaturas a variar entre 0 e 5 C e valores de humidade relativa do ar entre 90 e 95%. Por outro lado, Patarata (2002) ao fabricar linguiça tradicional transmontana utilizou temperaturas de 2 - 4 C durante a maturação. O nosso conhecimento indica-nos que na maioria das salsicharias portuguesas que conhecemos, para a maturação das massas de carne, os valores de temperatura mais comumente utilizados variam entre 0 e 6 C e os de humidade relativa entre 80 e 90%.

Pelo exposto, opinamos não serem despropositados os valores dos parâmetros ambientais registados em ambas as fábricas, exceptuando alguns valores de temperatura excessivos observados durante a maturação do lote 2 produzido na fábrica A, mas criticamos a falta de uniformização das condições ambientais em que decorre a maturação, sobretudo na fábrica A. Esta realidade pode contribuir para a falta de regularidade na qualidade dos paios, factor indesejável quando se procura fomentar hábitos de consumo.

Quadro 22 – Análise de variância para o factor lote (1, 2 e 3), considerando as variáveis temperatura e humidade relativa do ar, registadas na câmara de maturação de massas, nas duas fábricas (A e B).

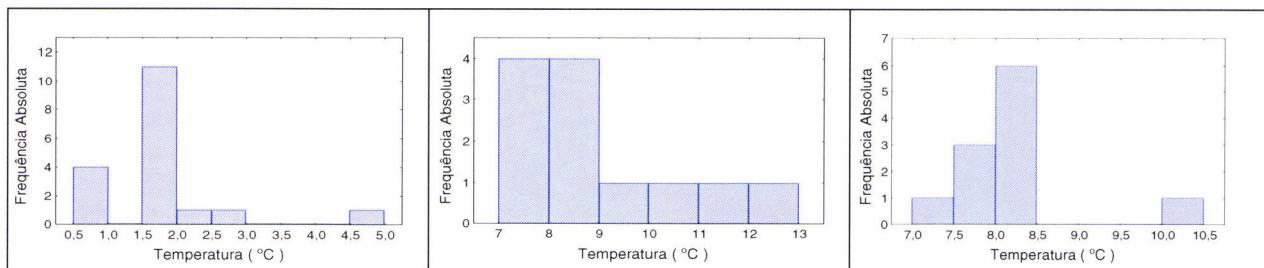
	FÁBRICA A		FÁBRICA B	
Factor de variação	Temperatura	Humidade relativa	Temperatura	Humidade relativa
Valor de F	193,2094	3,7894	8,0140	5,2394
Valor de p	0,000000002	0,0317	0,004291	0,0188
Nível de significância	***	*	**	*

Níveis de significância: N.S.=Não Significativo; *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Quadro 23 – Médias e desvios-padrão para as variáveis temperatura (°C) e de humidade relativa (%) do ar registadas na câmara de maturação de massas, nas duas fábricas (A e B) e nos três lotes de fabrico estudados (1, 2 e 3).

	FÁBRICA A			FÁBRICA B		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Temperatura	2,0a±0,9	9,0b±1,5	8,3b±0,7	8,1b±0,5	6,6a±1,4	5,9a±1,5
Humidade relativa	75,1a±2,5	75,5a±2,1	77,4b±1,7	78,1a±7,0	85,8b±4,5	86,3b±1,8

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

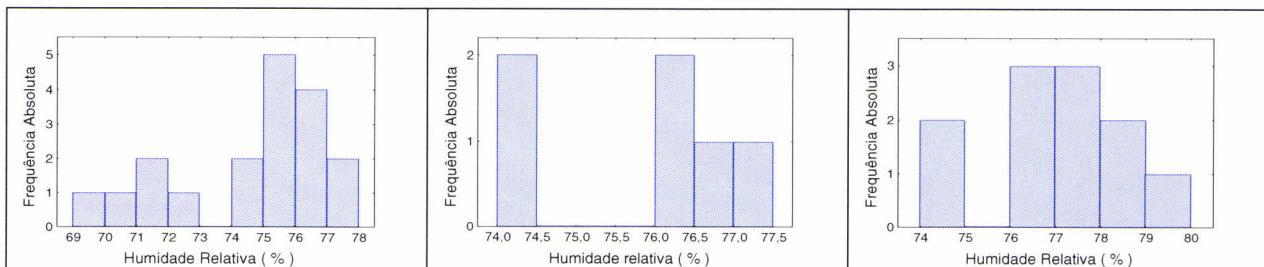


Lote 1

Lote 2

Lote 3

Figura 5 – Frequências absolutas para os registos de temperatura do ar da câmara de maturação de massas da fábrica A durante a permanência dos 3 lotes estudados.

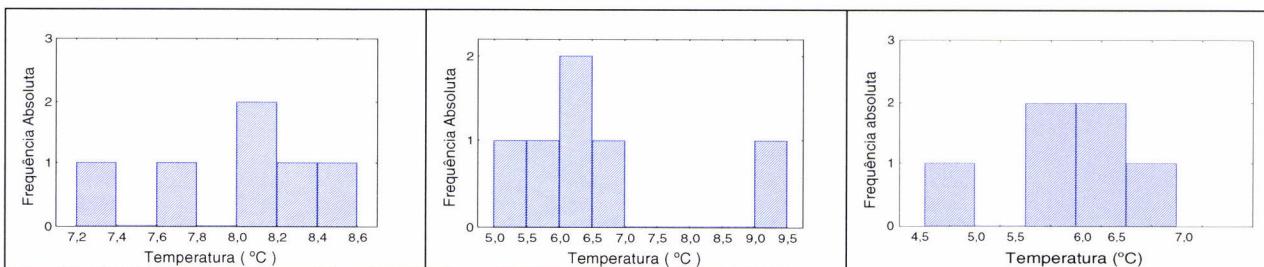


Lote 1

Lote 2

Lote 3

Figura 6 – Frequências absolutas para os registos de humidade relativa do ar da câmara de maturação de massas da fábrica A durante a permanência dos 3 lotes estudados.

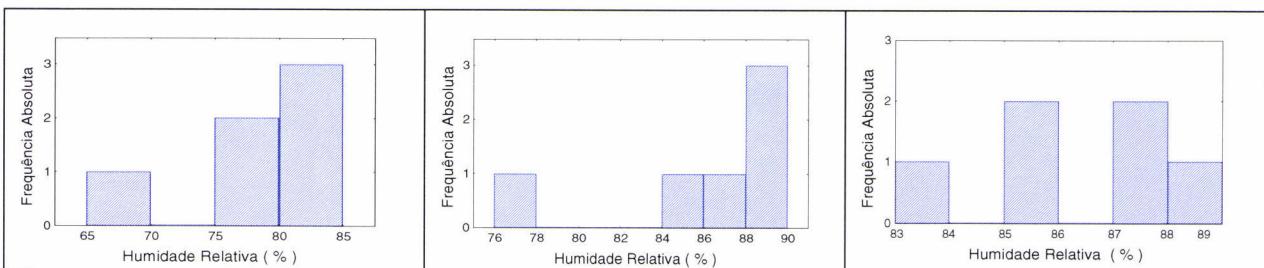


Lote 1

Lote 2

Lote 3

Figura 7 – Frequências absolutas para os registos de temperatura do ar da câmara de maturação de massas da fábrica B durante a permanência dos 3 lotes estudados.



Lote 1

Lote 2

Lote 3

Figura 8 – Frequências absolutas para os registos de humidade relativa do ar da câmara de maturação de massas da fábrica B durante a permanência dos 3 lotes estudados.

9. 2. 5 - Sala de enchimento

Uma vez mais e apesar das salas de enchimento das duas fábricas terem equipamento para controlo da temperatura e da humidade relativa do ar, estes dois parâmetros variaram significativamente entre lotes de produção em ambas as fábricas (Quadro 24).

De acordo com o Decreto nº 44/93, de 27 de Novembro, a temperatura na sala de enchimento não deve ser superior a 12°C, pelo que à excepção de um lote (lote 1) produzido na fábrica A, todos os restantes foram sujeitos a temperaturas um pouco acima do limite máximo estabelecido, durante a sua permanência na sala de enchimento (Quadro 25). Quanto aos valores da humidade relativa do ar permitimo-nos destacar a média relativamente baixa (66,8%) correspondente ao lote 1 produzido na fábrica B.

Quadro 24 – Análise de variância para o factor lote (1, 2 e 3), considerando as variáveis temperatura e humidade relativa do ar, registadas na sala de enchimento das duas fábricas (A e B).

	FÁBRICA A		FÁBRICA B	
Factor de variação	Temperatura	Humidade relativa	Temperatura	Humidade relativa
Valor de F	28,5038	5,0034	32,7697	12,7677
Valor de p	0,000012	0,0229	0,000140	0,0032
Nível de significância	***	*	***	**

Níveis de significância: *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Quadro 25 – Médias e desvios-padrão para as variáveis temperatura (C) e humidade relativa (%) do ar registadas na sala de enchimento, nas duas fábricas (A e B) e nos três lotes de fabrico estudados (1, 2 e 3).

	FÁBRICA A			FÁBRICA B		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Temperatura	12,0a±0,1	14,6b±0,8	14,2b±0,6	15,9b±0,5	15,5b±0,4	13,0a±0,6
Humidade relativa	77,8b±0,8	75,9a±1,2	76,9a±0,8	66,8a±1,6	74,3b±2,7	75,5b±0,7

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes

9.2.6 - Condições ambientais em que decorreu o processo de cura

Considerando as diferentes condições ambientais em que decorre a cura do paio de porco Alentejano nas duas fábricas objecto de estudo, apresentaremos em primeiro lugar os resultados obtidos na câmara de cura forçada e na sala de cura natural, etapas do processo

de cura da fábrica A. Posteriormente são apresentados os resultados obtidos dos registos efectuados no fumeiro e na câmara de secagem, etapas do processo de cura da fábrica B.

9. 2. 6. 1 - Câmara de cura forçada (fábrica A)

A câmara de cura forçada da fábrica A permite controlos eficazes sobre os parâmetros ambientais. Assim, apesar da análise de variância (Quadro 26) para a variável temperatura ter evidenciado haver diferenças significativas entre os lotes de fabrico, do ponto de vista prático estas diferenças não têm expressão. Na realidade, pretende-se nesta etapa de fabrico que a temperatura se situe entre os 10 - 11 C, o que foi, de certo modo, conseguido (Quadro 27 e Figura 9). Os valores médios da humidade relativa do ar estiveram, em termos médios, ligeiramente abaixo de 79%, o que está de acordo com o pretendido para esta fase da cura. Considerando a dispersão dos registos efectuados ao longo do tempo verifica-se que a humidade relativa do ar da câmara de cura forçada (Figura 10) se situou principalmente entre os 75 e os 80%.

Quadro 26 – Análise de variância para o factor lote (1, 2 e 3), considerando as variáveis temperatura e humidade relativa do ar na câmara de cura forçada da fábrica A.

FÁBRICA A		
Factor de variação	Temperatura	Humidade relativa
Valor de F	154,0693	1,8672
Valor de p	0,00000006	0,1559
Nível de significância	***	N.S.

Níveis de significância: N.S.=Não Significativo; ***significativo para $p<0,001$.

Quadro 27 – Médias e desvios-padrão para as variáveis temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e humidade relativa (%) do ar registadas na câmara de cura forçada, na fábrica A e nos três lotes de fabrico estudados (1, 2 e 3).

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Temperatura	11,0c \pm 0,4	10,2b \pm 0,5	10,0a \pm 0,5
Humidade relativa	78,7 \pm 3,3	78,2 \pm 2,1	78,7 \pm 2,0

Na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

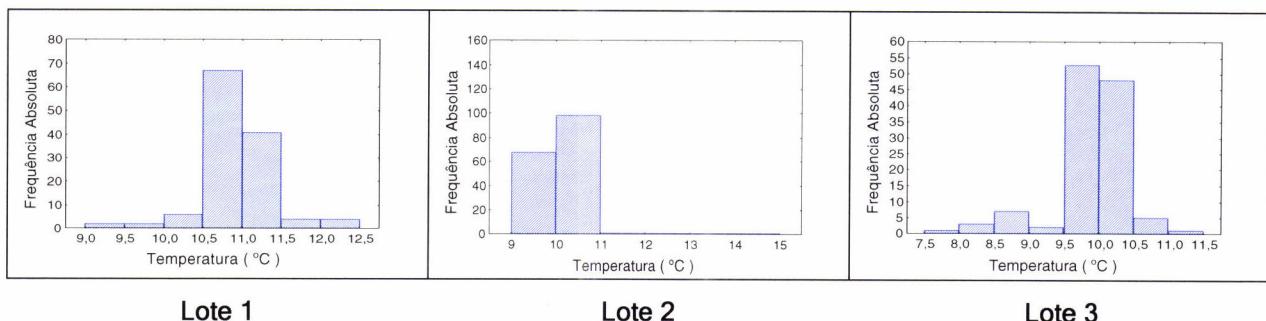


Figura 9 – Frequências absolutas para os registos de temperatura do ar da câmara de cura forçada da fábrica A durante a permanência dos 3 lotes estudados.

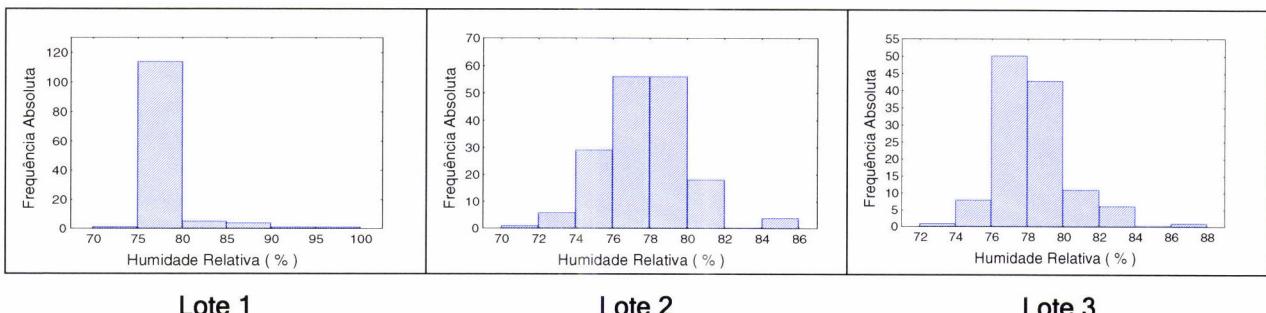


Figura 10 – Frequências absolutas para os registos de humidade relativa do ar da câmara de cura forçada da fábrica A durante a permanência dos 3 lotes estudados.

Pretendia-se que a temperatura da câmara de cura forçada se situasse entre 10 e 12 °C, de modo a permitir o desenvolvimento da microbiota Gram-positiva, responsável pela estabilidade do produto e pelo desenvolvimento da cor (Coppola *et al.*, 1997; Garcia-Varona *et al.*, 2000; Hugas *et al.*, 2002).

A humidade relativa da câmara de cura forçada deve situar-se entre 70 e 80% por forma a permitir uma lenta secagem do enchido, uma vez que a secagem rápida pode originar a formação de uma crosta superficial, resultante da desnaturação proteica, que impede a saída de água do interior do enchido.

9.2.6.2 - Sala de cura natural (fábrica A)

A sala de cura natural tem janelas (protegidas com rede de malha fina) que comunicam directamente com o exterior. Deste modo, são compreensíveis as diferenças entre lotes, tanto para a temperatura como para a humidade relativa do ar registados naquela sala (Quadros 28 e 29; Figuras 11 e 12).

Quadro 28 – Análise de variância para o factor lote (1, 2 e 3), considerando as variáveis temperatura e humidade relativa do ar na sala de cura natural da fábrica A.

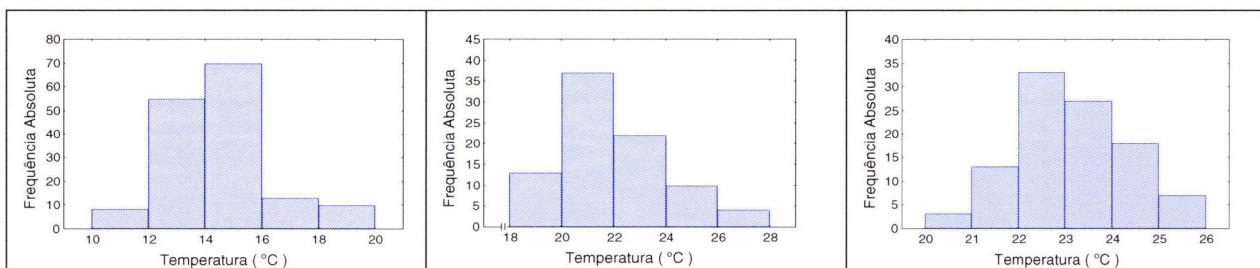
FÁBRICA A		
Factor de variação	Temperatura	Humidade relativa
Valor de F	963,4294	21,9780
Valor de p	0,000000000005	0,0008
Nível de significância	***	***

Níveis de significância: ***significativo para $p<0,001$.

Quadro 29 – Médias e desvios-padrão para as variáveis temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e humidade relativa (%) do ar registadas na sala de cura natural, na fábrica A e nos três lotes de fabrico estudados (1, 2 e 3).

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Temperatura	$14,5\text{a}\pm1,7$	$22,0\text{b}\pm2,1$	$23,0\text{c}\pm1,2$
Humidade relativa	$72,1\text{c}\pm7,3$	$63,9\text{a}\pm13,7$	$69,3\text{b}\pm7,0$

Na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

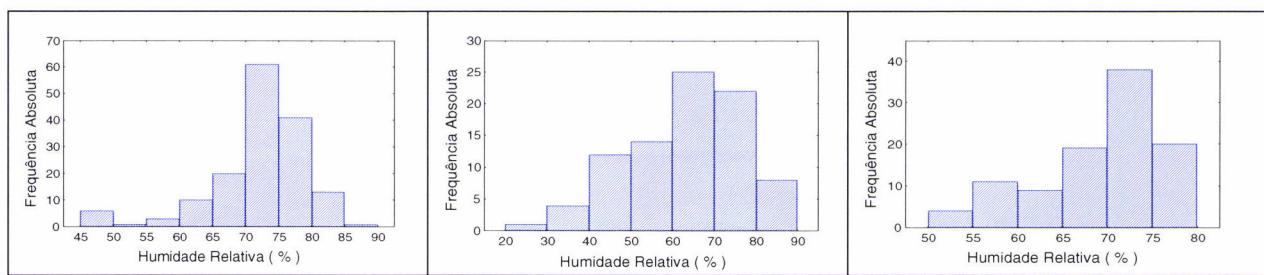


Lote 1

Lote 2

Lote 3

Figura 11 – Frequências absolutas para os registos de temperatura do ar da sala de cura natural da fábrica A durante a permanência dos 3 lotes estudados.



Lote 1

Lote 2

Lote 3

Figura 12 – Frequências absolutas para os registos de humidade relativa do ar da sala de cura natural da fábrica A durante a permanência dos 3 lotes estudados.

O fabricante pretende que a temperatura da sala de cura natural se situe entre 10 e 17 C e que a humidade relativa do ar daquela sala não saia do intervalo 65 – 80%, de modo a permitir uma secagem gradual e uniforme dos enchidos.

A observação da Figura 11 mostra-nos que nos lotes 1 e 2, que permaneceram na sala de cura natural durante os meses de Fevereiro/Março e Maio/Junho, respectivamente, estiveram sujeitos, principalmente, a temperaturas que variaram entre 12 e 16 C. No entanto, o lote 3 que esteve naquela sala durante os meses de Julho e Agosto, foi exposto a temperaturas de 20 - 26 C, resultado das temperaturas extremamente quentes que habitualmente se fazem sentir durante esta época do ano em Barrancos. Por seu lado, os registos efectuados para a humidade relativa, nos 3 lotes, estiveram maioritariamente dentro dos limites preconizados pelo fabricante (Figura 12).

9.2.6.3 - Fumeiro (fábrica B)

Apesar da análise de variância (Quadro 30) ter mostrado haver diferenças significativas entre os lotes de fabrico, tanto para a variável temperatura como para a humidade relativa, uma vez mais essas diferenças, na prática, não têm grande expressão. Não obstante, o lote 3, fabricado em pleno Outono, foi sujeito durante a fumagem a valores de temperatura mais baixos e de humidade relativa mais elevados, comparativamente aos outros dois lotes (Quadro 31 e Figura 13).

Quadro 30 – Análise de variância para o factor lote (1, 2 e 3), considerando as variáveis temperatura e humidade relativa do ar no fumeiro da fábrica B.

FÁBRICA B		
Factor de variação	Temperatura	Humidade relativa
Valor de F	18,0280	9,4355
Valor de p	0,000002	0,000142
Nível de significância	***	***

Níveis de significância: ***significativo para $p<0,001$.

Quadro 31 – Médias e desvios-padrão para as variáveis temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e humidade relativa (%) do ar registadas no fumeiro da fábrica B para os três lotes de fabrico estudados (1, 2 e 3).

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Temperatura	$24,7\text{b}\pm1,7$	$23,7\text{b}\pm3,9$	$20,3\text{a}\pm2,7$
Humidade relativa	$78,9\text{a}\pm4,6$	$79,5\text{a}\pm5,9$	$83,8\text{b}\pm5,9$

Na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

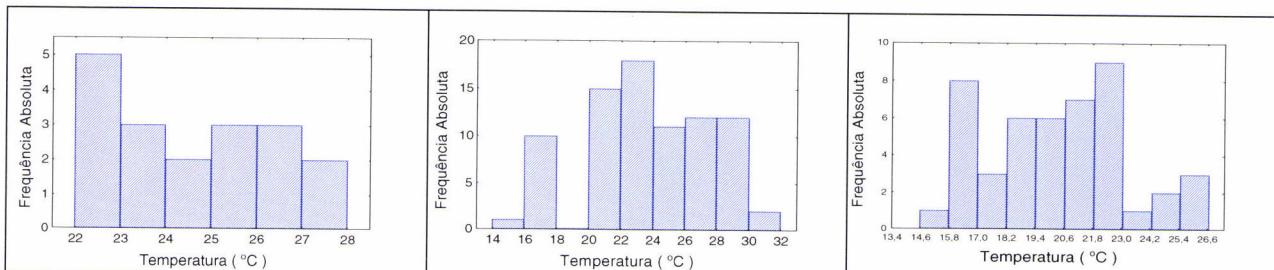


Figura 13 – Frequências absolutas para os registos da temperatura do ar no fumeiro da fábrica B

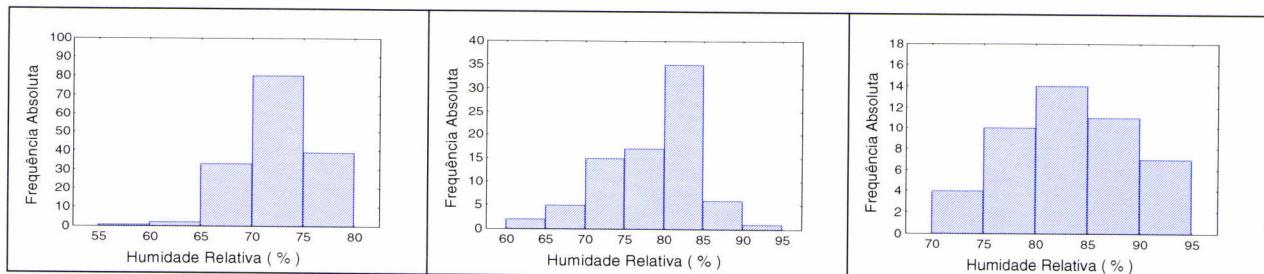


Figura 14 – Frequências absolutas para os registos de humidade relativa do ar do fumeiro da fábrica B durante a permanência dos 3 lotes estudados.

De acordo com o produtor B, no fumeiro a temperatura deve situar-se entre os 21 e os 31 °C, com valores óptimos próximos de 25 °C e a humidade relativa entre 75 e 85%, de modo a evitar que a evaporação da água se processe de forma brusca. Estes objectivos foram relativamente alcançados nos 3 lotes de produção (Figuras 13 e 14), embora as temperaturas em que decorreu a fumagem do lote 3 tenham ficado um pouco aquém do desejado.

9.2.6.4 - Câmara de secagem (fábrica B)

Os valores apresentados neste capítulo apenas dizem respeito aos lotes 1 e 3, uma vez que o lote 2 foi considerado pronto após ter permanecido 25 dias no fumeiro, tempo consideravelmente superior ao da fumagem dos outros dois lotes (6 e 14 dias).

Os valores da humidade relativa do ar da câmara de secagem durante a permanência do lote 3 foram significativamente inferiores aos registados para o lote 1 (Quadros 32 e 33). Porém, esta diferença foi intencional e teve por objectivo permitir uma mais eficaz estabilização dos enchidos (lote 3) que haviam sido fumados num período do ano (Outono) em que a humidade relativa do ar ambiente era elevada.

Quadro 32 – Análise de variância para o factor lote (1, 2 e 3), considerando as variáveis temperatura e humidade relativa do ar da câmara de secagem da fábrica B nos lotes de produção estudados.

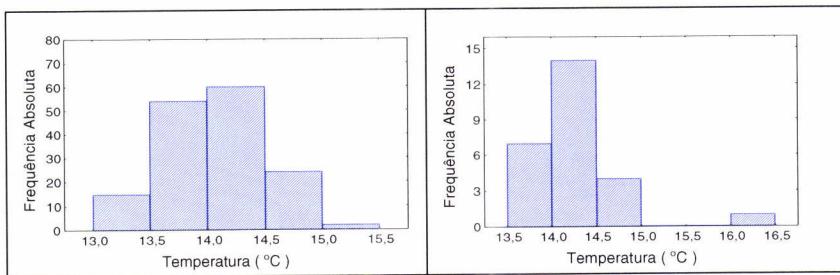
FÁBRICA B		
Factor de variação	Temperatura	Humidade relativa
Valor de F	2,8430	32,6311
Valor de p	0,0935	0,0000001
Nível de significância	N.S.	***

Níveis de significância: N.S.=Não Significativo; ***significativo para $p<0,001$.

Quadro 33 – Médias e desvios-padrão para as variáveis temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e humidade relativa (%) do ar registadas na câmara de secagem, na fábrica B e nos lotes de fabrico 1 e 3.

FÁBRICA B			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Temperatura	$14,1 \pm 0,4$	*	$14,3 \pm 0,5$
Humidade relativa	$72,5\text{b} \pm 3,6$	*	$67,9\text{a} \pm 5,0$

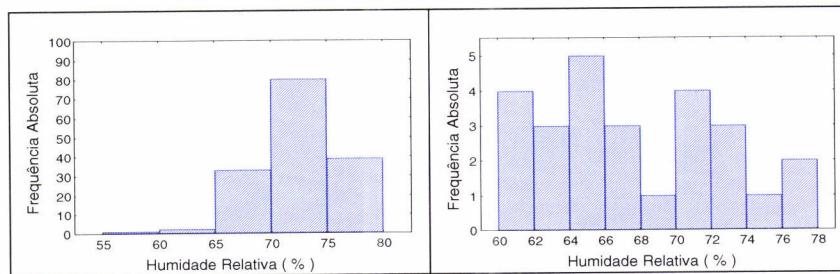
Na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.
* o lote n.º2 saiu do fumeiro directamente para a expedição (venda) sem ter passado pela câmara de secagem.



Lote 1

Lote 3

Figura 15 – Frequências absolutas para os registos de temperatura do ar na câmara de secagem da fábrica B durante a permanência de 2 lotes estudados.



Lote 1

Lote 3

Figura 16 – Frequências absolutas para os registos de humidade relativa do ar da câmara de secagem da fábrica B durante a permanência de 2 lotes estudados.

Na opinião do fabricante B, a temperatura na câmara de secagem não deve ser superior a 16 C, de modo a evitar uma desidratação muito rápida dos enchidos que pode afectar profundamente as características sensoriais do produto final.

A humidade relativa do ar da câmara de secagem, também segundo o fabricante B, deve situar-se entre 70 e 80%, de forma a permitir que a secagem do enchido decorra gradual e uniformemente.

Os valores da temperatura por nós registados durante a permanência dos lotes 1 e 3 na câmara de secagem estão, de modo geral, dentro dos limites estabelecidos pelo produtor de enchidos (Figura 15). Contudo, o lote 3 permaneceu nesta câmara com valores de humidade relativa um pouco abaixo do pretendido pelo fabricante de enchidos (Figura 16).

De acordo com Fischer (1988), a fase de cura é a mais crítica no processo de fabrico de enchidos. Segundo este autor, contrariamente ao que acontecia, os enchidos são curados maioritariamente em câmaras com parâmetros ambientais (como sejam temperatura, humidade relativa e velocidade de circulação do ar) e durante períodos de tempo definidos em função do tipo de produto. Para Hermele *et al.* (2003) um dos aspectos mais importantes na concepção de uma moderna câmara de cura prende-se com a sua capacidade para promover uma desidratação homogénea dos enchidos durante a cura. A diferença entre a actividade da água na superfície do enchido e a humidade relativa do ar ambiente é a força motriz para o processo de desidratação. Para que este processo decorra de forma adequada aquela diferença não deve exceder 5% ao longo de todo o processo de cura. Hermele *et al.* (2004) realizaram um trabalho em que relacionaram o fluxo de ar com a perda de água durante a cura de enchidos em câmaras. Verificaram que quando a entrada do fluxo de ar é vertical a humidade relativa da câmara fica estratificada, resultando daí uma desidratação não homogénea, variando com a localização dos enchidos em altura. Neste mesmo trabalho os autores promoveram melhorias na homogeneidade da humidade relativa ambiental, mediante a alteração periódica na direcção (vertical e horizontal) da entrada do fluxo de ar na câmara.

9.3 - Avaliação das perdas de peso ao longo do processo de cura

Pela observação do Quadro 34 verificamos que os pesos dos paio produzidos em ambas as fábricas são próximos, com pesos unitários após o enchimento relativamente próximos de 500 g e pesos finais relativamente próximos de 300 g.

Na fábrica A as maiores perdas de peso ocorreram durante a cura forçada, com valores próximos de 30%. Nesta mesma fábrica as perdas de peso na segunda fase da cura (passagem pela sala de cura natural) já apresentam maiores variações entre lotes, consequência da influência das condições ambientais exteriores. Na fábrica B as perdas de peso são bastante variáveis, tanto no fumeiro como na câmara de secagem, contudo estas últimas acabam por ser reflexo das verificadas durante a fumagem, isto é, os produtos que perderam menos peso durante a fumagem vão ter maiores quebras durante a sua permanência na câmara de secagem. Nesta câmara, tenta-se que as perdas de água sejam as necessárias para que o produto atinja a estabilidade microbiológica e bioquímica desejadas para poder ser lançado no mercado.

As perdas de peso totais para os lotes estudados variaram entre 34,7% (lote 2, fábrica B) e 44,8% (lote 2, fábrica B).

Quadro 34 – Pesos médios (kg) e perdas médias de peso (%) por unidade de paio de porco Alentejano, para os três lotes estudados nas duas fábricas (A e B).

	FÁBRICA A			FÁBRICA B		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Peso médio (kg) imediatamente após o enchimento *	0,459	0,523	0,506	0,510	0,471	0,495
Peso médio (kg) no final da cura forçada *	0,317	0,359	0,381	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica
Perda de peso (%) durante a cura forçada *	31,0	31,0	29,1	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica
Peso médio (kg) no final da cura natural (fim da cura)*	0,268	0,328	0,311	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica
Perda de peso (%) durante a cura natural *	10,9	6,0	12,9	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica
Peso médio (kg) no final da fumagem *	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica	0,446	0,308	0,388
Perda de peso (%) durante a fumagem *	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica	12,4	34,7	27,1
Peso médio (kg) no final da secagem (fim da cura) *	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica	0,282	0,308	0,314
Perda de peso (%) durante a secagem *	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica	32,4	a)	13,1
Perda de peso (%) total (final da cura) *	41,9	37,0	42,0	44,8	34,7	40,2

*peso médio de cada uma das unidades da amostra usada no estudo de cada lote.

a) o lote foi expedido após a etapa de fumegem, sem ter passado pela câmara de secagem.

10 - Caracterização das matérias-primas subsidiárias

As matérias-primas subsidiárias tradicionalmente utilizadas no fabrico do paio de porco Alentejano são a massa de pimentão, a massa de alho, o sal e a água. Esta última utilizada como excipiente, para difusão dos condimentos, facilitando tanto a sua absorção pela carne como a sua distribuição, tão homogénea quanto possível, na massa.

Com o objectivo de avaliar a possível influência daquelas matérias-primas subsidiárias e das tripas utilizadas como invólucro nas características do paio de porco Alentejano, foram realizadas algumas determinações físico-químicas e microbiológicas sobre aqueles produtos.

10.1 - Condimentos

De acordo com Gerhardt (1975), condimentos são “produtos de origem vegetal, inteiros ou reduzidos a pó, que se adicionam aos alimentos para lhes conferir um sabor e aroma próprios”, aplicando-se o termo tanto a produtos cortados em porções maiores ou menores como aos reduzidos a pó (Ferrão, 1993). Rebollo (1998) acrescenta ainda que para além de melhorarem as características organolépticas dos alimentos, os condimentos exercem actividades anti-oxidantes, bacteriostáticas e medicinais. Por outro lado, os condimentos estimulam o apetite ao favorecer a secreção das glândulas digestivas, resultando num melhor aproveitamento dos alimentos por parte do organismo (Gerhardt, 1975).

O efeito antioxidante do pimento (*Capsicum annuum*), fresco ou transformado, foi demonstrado por vários autores (Lee *et al.*, 1995; Daood *et al.*, 1996; Mateo *et al.*, 1997; Aguirrezábal *et al.*, 2000), tal como a acção antimicrobiana de extractos de alho (Karaioannoglou *et al.*, 1977; Patel *et al.*, 1985; Solomon e Kautter, 1988; Kyung *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 1998; Banerjee e Sarkar, 2003).

A análise de variância feita a partir dos resultados das análises físico-químicas realizadas à massa de pimentão recolhida nas duas fábricas em estudo (Quadro 35) revelou haver diferenças significativas para as variáveis pH e humidade.

Contudo, as diferenças entre as médias correspondentes às duas fábricas (Quadro 36) para aquelas variáveis (fábrica A: pH=3,85, humidade=68,18%; fábrica B: pH=3,37, humidade=69,49%) na prática acabam por ter um significado relativo

Quadro 35 – Massa de pimentão: análise de variância para variáveis físico-químicas considerando o factor fábrica (A e B).

Variáveis	Fábrica
	G.L.=1
pH	$F=87,2403$ p=0,0000***
a_w	$F=0,0004$ p=0,9854
Humidade	$F=5,7557$ p=0,0374*
Teor de cloretos	$F=0,9025$ p=0,3645
L*	$F=1,0639$ p=0,3266
a*	$F=0,5262$ p=0,4848
b*	$F=0,0040$ p=0,9507

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.
Níveis de Significância - *significativo para p<0,05; ***significativo para p<0,001.

Quadro 36 – Massa de pimentão: médias e desvios padrão para variáveis físico-químicas, considerando 2 fábricas (A e B).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
pH	$3,85 \text{ a} \pm 0,11$	$3,37 \text{ b} \pm 0,06$
a_w	$0,768 \pm 0,008$	$0,767 \pm 0,020$
Humidade (%)	$68,18 \text{ a} \pm 1,21$	$69,49 \text{ b} \pm 0,47$
Teor de cloretos (% NaCl)	$29,11 \pm 0,02$	$29,09 \pm 0,03$
L*	$32,73 \pm 0,63$	$33,17 \pm 0,78$
a*	$29,14 \pm 2,66$	$30,03 \pm 1,13$
b*	$17,72 \pm 1,46$	$17,74 \pm 0,82$

Nota: na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Quanto à massa de alho, verificaram-se diferenças significativas entre fábricas para as variáveis a_w , humidade e coordenada cromática a^* (Quadro 37). Os valores médios obtidos para as variáveis físico-químicas (Quadro 38), especialmente a a_w e a humidade, mostram ser a massa de alho da fábrica B a mais estável.

Quadro 37 – Massa de alho: análise de variância para variáveis físico-químicas considerando o factor fábrica (A e B).

Variáveis	Fábrica	
	G.L.=1	
pH	$F=0,0945$	$p=0,7649$
a_w	$F=83,5714$	$p=0,0000^{***}$
Humidade	$F=10,6543$	$p=0,0085^{**}$
Teor de cloreto	$F=0,9284$	$p=0,3580$
L*	$F=1,3172$	$p=0,2778$
a*	$F=9,6085$	$p=0,0113^*$
b*	$F=3,6748$	$p=0,0842$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$;

significativo para $p<0,01$; *significativo para $p<0,001$.

Quadro 38 – Massa de alho: médias e desvios padrão para variáveis físico-químicas, considerando 2 fábricas (A e B).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
pH	$5,25 \pm 0,22$	$5,21 \pm 0,23$
a_w	$0,946 \text{ a} \pm 0,025$	$0,842 \text{ b} \pm 0,012$
Humidade (%)	$69,28 \text{ a} \pm 6,73$	$60,30 \text{ b} \pm 0,70$
Teor de cloreto (%) NaCl)	$28,83 \pm 0,83$	$29,09 \pm 0,02$
L*	$53,45 \pm 5,06$	$50,24 \pm 4,84$
a*	$-2,37 \text{ a} \pm 0,88$	$-1,02 \text{ b} \pm 0,62$
b*	$14,54 \pm 3,14$	$18,27 \pm 3,66$

Nota: na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Castro *et al.* (1998) estudaram a composição química e a cor de alho pelado e salgado numa salmoura com uma concentração de 8% de NaCl (p/v). Uma parte do alho descascado foi submetida a branqueamento e outra não. Todo o alho usado naquele estudo foi fermentado com o auxílio de uma cultura de arranque de *Lactobacillus plantarum*. Após 7 dias de fermentação o valor do pH foi de 3,77 para o alho submetido a branqueamento, onde a estirpe inoculada pôde crescer sem concorrência, e de 5,75 para o produto não sujeito a branqueamento. Na opinião dos autores estes valores de pH não excluem o potencial crescimento e produção de toxinas de *Clostridium botulinum*, se estiver presente. O teor de sal encontrado, tanto no alho branqueado como no não branqueado, foi de 2,9%.

No produto sujeito a branqueamento os parâmetros de cor não variaram de forma significativa com a fermentação, com valores de L*, a* e b* de, respectivamente, 64,2; -3,3 e 13,8; antes da fermentação, e de 66,2; -2,8 e 12,5 após a fermentação. Quanto ao alho não branqueado os autores informam que apresentou uma coloração esverdeada desde o dia seguinte à imersão em salmoura, sem no entanto apresentarem os valores para os parâmetros da medição objectiva da cor. Concluíram os autores ser essencial o recurso ao branqueamento para prevenir a ocorrência de efeitos indesejáveis, como o esverdeamento dos bolbilhos (dentes de alho), por exemplo.

De um modo geral, os condimentos são cultivados em áreas quentes e húmidas, onde cresce um grande número e variedade de microrganismos. A qualidade microbiológica dos condimentos, particularmente os teores em *Enterobacteriaceae*, são indicadores das condições de higiene inerentes à sua produção e processamento (Banerjee e Sarkar, 2003).

As análises microbiológicas realizadas sobre amostras de massas de pimentão e alho recolhidas nas fábricas em estudo indicam não haver diferenças substanciais entre cada tipo de massa utilizada numa e noutra fábrica (Quadros 39, 40, 41 e 42). No entanto, destacam-se as contagens de leveduras sobre as amostras de massa de pimentão recolhidas na fábrica A (3,06 log ufc/g), que podem estar relacionadas com o processo fermentativo do pimentão. Na fábrica B todas as amostras apresentaram, para as contagens de leveduras, resultados inferiores ao limiar de detecção dos métodos utilizados. Por outro lado, as contagens de *Lactobacillus* spp. são relativamente baixas naquelas massas, apesar de serem frequentemente associados aos produtos vegetais (Frazier e Westhoff, 1993). As contagens de microrganismos mesófilos totais e de *Micrococcaceae* são muito semelhantes entre si, tanto na massa de pimentão como na de alho, pelo que a maioria da microbiota mesófila será composta por *Micrococcaceae*. Estes resultados são explicados pelo carácter de halotolerância que estes microrganismos têm. Aparecem também em número considerável as contagens de esporos de bactérias aeróbias. Serão microrganismos da família *Bacillaceae*, que naturalmente existem nos produtos vegetais e que surgirão nestas massas devido à manipulação pouco cuidada tanto do pimentão como do alho.

No que respeita aos microrganismos associados ao controlo higio-sanitário, tanto a massa de pimentão como a de alho, em ambas as fábricas, apresentam resultados adequados.

Num trabalho, já referido neste capítulo, onde foi estudada a fermentação de alho ao longo de 7 dias, Castro *et al.* (1998) registaram as contagens mais elevadas de *Enterobacteriaceae* aos dois dias, com valores a variar entre 1,5 e 2,0 log ufc/g. A partir dos 5 dias de fermentação as contagens deixaram de ser detectadas pelo método utilizado, em parte devido à acção bactericida do extracto de alho. Com efeito, Karaioannoglou *et al.* (1977) sustentaram que concentrações de alho superiores a 1% no meio de cultura inibem o crescimento de *L. plantarum* e concentrações superiores a 2% têm acção bactericida sobre aqueles microrganismos. Por outro lado, Singh *et al.* (2001), usando extracto de alho, comprovaram a acção inibitória sinérgica do alho, juntamente com a nisina, frente a *Listeria monocytogenes*. A actividade antimicrobiana do alho já havia sido demonstrada também por Adetumbi *et al.* (1986), sendo desde há muito atribuída esta actividade à alanina, um sulfinato (Feldberg *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 2001).

Quadro 39 – Massa de pimentão: análise de variância para resultados de análises microbiológicas considerando o factor fábrica (A e B).

Variáveis	Fábrica
	G.L.=1
Mesófilos totais	$F=10,2026$ p=0,0056**
Psicrotróficos totais	$F=2,1333$ p=0,1635
Bolores	$F=2,1333$ p=0,1635
Leveduras	$F=45,1385$ p=0,0000***
Lactobacillus spp.	$F=0,9611$ p=0,3415
Micrococcaceae	$F=3,5095$ p=0,0794
Esporos de bactérias aeróbias	$F=1,1517$ p=0,2991
Enterobacteriaceae	$F=0,4848$ p=0,4962
Streptococci do grupo D	$F=1,0938$ p=0,3112
Esporos de Clostridia sulfito-redutores	$F=2,1333$ p=0,1635

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância: - **significativo para p<0,01; ***significativo para p<0,001.

Banerjee e Sarkar (2003) analisaram amostras de pimento (*Capsicum frutescens*) e de alho (*Allium sativum*), frescos, recolhidas de grossistas de diferentes estados da Índia. Relativamente ao pimento obtiveram contagens de microrganismos mesófilos totais que variaram entre 4,0 e 5,0 log ufc/g e contagens de *Enterobacteriaceae* que variaram entre 1,0 e 2,0 log ufc/g. Para as amostras de alho os resultados obtidos variaram entre 3,0 e 4,0 log ufc/g, para as contagens de microrganismos mesófilos totais, e entre 1,5 e 2,5 log ufc/g, para as contagens de *Enterobacteriaceae*.

Quadro 40 – Massa de pimentão: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas, considerando 2 fábricas (A e B).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
Mesófilos totais (log UFC/g)	4,25 a ± 0,07	4,86 b ± 0,46
Psicrotróficos totais (log UFC/g)	0,33 ± 0,81	0,00 ± 0,00
Bolores (log UFC/g)	0,28 ± 0,69	0,00 ± 0,00
Leveduras (log UFC/g)	3,06 a ± 1,63	0,00 b ± 0,00
Lactobacillus spp. (log UFC/g)	2,86 ± 2,31	1,91 ± 1,73
Micrococcaceae (log UFC/g)	4,11 ± 0,08	4,62 ± 0,66
Esporos de bactérias aeróbias (log nº esporos/g)	3,38 ± 0,45	2,76 ± 1,37
Enterobacteriaceae (log UFC/g)	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,86
Streptococci do grupo D (log UFC/g)	0,50 ± 0,84	0,16 ± 0,54
Esporos de Clostridia sulfito-redutores ^	1,17 ± 0,41	1,00 ± 0,00
Estimativa do nº de células viáveis de bactérias coliformes ^	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Estimativa do nº de células viáveis de Escherichia coli ^	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

Nota: na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

□ Resultados para esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *E. coli*:

Classe 1: < 1 esporo/bactéria g⁻¹

Classe 2: > 1 e < 10 esporos/bactérias g⁻¹

Quadro 41 – Massa de alho: análise de variância para resultados de análises microbiológicas considerando o factor fábrica (A e B).

Variáveis	Fábrica
	G.L.=1
Mesófilos totais	F=9,2148 p=0,0126*
Lactobacillus spp.	F=0,5922 p=0,4593
Micrococcaceae	F=3,5066 p=0,0906
Esporos de bactérias aeróbias	F=0,0205 p=0,8891
Enterobacteriaceae	F=0,0248 p=0,8780
Streptococci do grupo D	F=1,0000 p=0,3409
Esporos de Clostridia sulfito-redutores	F=1,0000 p=0,3409

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância - *significativo para p<0,05.

Quadro 42 – Massa de alho: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas, considerando 2 fábricas (A e B).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
Mesófilos totais (log UFC/g)	3,98 a ± 0,37	3,50 b ± 0,12
Psicrotróficos totais (log UFC/g)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Bolores (log UFC/g)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Leveduras (log UFC/g)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Lactobacillus spp. (log UFC/g)	1,24 ± 1,93	0,51 ± 1,25
Micrococcaceae (log UFC/g)	3,65 ± 0,19	2,63 ± 1,32
Esporos de bactérias aeróbias (log nº esporos/g)	3,45 ± 0,24	3,42 ± 0,52
Enterobacteriaceae (log UFC/g)	0,80 ± 1,23	0,92 ± 1,42
Streptococci do grupo D (log UFC/g)	0,17 ± 0,41	0,00 ± 0,00
Esporos de Clostridia sulfito-redutores[▲]	1,00 ± 0,00	1,17 ± 0,41
Estimativa do nº de células viáveis de bactérias coliformes[▲]	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Estimativa do nº de células viáveis de Escherichia coli[▲]	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

Nota: na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

[▲]Resultados para esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *E. coli*: Classe 1: < 1 esporo/bactéria g⁻¹; Classe 2: > 1 e < 10 esporos/bactéria g⁻¹

10.2 - Tripas

Em Portugal, existe uma gama de produtos de salsicharia tradicionais em que a utilização de tripa natural está indicada, devendo mesmo ser considerada obrigatória em alguns deles. Referimo-nos principalmente aos produtos de cura mais prolongada, em que a perda lenta de água, devido à barreira que é a tripa natural, constituída pelas camadas muscular e serosa, é fundamental para as características sensoriais dos produtos, especialmente as relacionadas com a sua textura. Contudo, desde há alguns anos assiste-se a uma relativa descaracterização daqueles produtos devido à substituição em grande escala de tripa natural por tripa artificial. Apontam-se como razões principais desta substituição a deficiente produção em quantidade e qualidade da tripa natural (Morgado, 1983), a impossibilidade de a utilizar em máquinas de encher e porcionar automáticas e o seu preço.

De acordo com Antoine (1989), o emprego do sal como tratamento de conservação da tripa em teores de 30%, baixa a a_w para valores de 0,78, provocando a inibição do desenvolvimento das bactérias não halófilas. Segundo o mesmo autor, a salga pode dar origem a um efeito selectivo sobre determinados géneros, como *Pseudomonas* e

Staphylococcus, que encontram condições favoráveis para o seu desenvolvimento na altura da dessalga, quando esta se realiza ao longo de várias horas e à temperatura ambiente.

No que respeita à tripa utilizada no fabrico de paio de porco Alentejano (intestino grosso de porco, natural, salgado e com as camadas muscular e serosa), todas as variáveis físico-químicas analisadas, à excepção da humidade e da matéria gorda, apresentaram diferenças significativas entre fábricas (Quadro 43). Comparando os valores de a_w , teor de cloretos e humidade registados nas duas fábricas (Quadro 44), verificamos haver condições para uma maior estabilidade microbiológica nas tripas utilizadas na fábrica B. Apesar do tratamento estatístico dos dados mostrar não ter havido diferenças significativas entre fábricas para a matéria gorda, do ponto de vista prático há diferenças importantes entre tripas utilizadas numa e noutra fábrica (fábrica A=31,69%; fábrica B=18,86%). Estas diferenças podem condicionar substancialmente a desidratação dos enchidos e, consequentemente, a evolução do processo de cura. Em nosso entender, do ponto de vista prático o teor de matéria gorda, juntamente com a actividade da água, são as variáveis que mais marcam as diferenças entre as tripas utilizadas nas duas fábricas em estudo.

Quadro 43 – Tripa (intestino grosso de porco): análise de variância para variáveis físico-químicas considerando o factor fábrica (A e B).

Variáveis	Fábrica
	G.L.=1
pH	$F=13,4216$ p=0,0044**
a_w	$F=213,6521$ p=0,0000***
Teor de cloretos	$F=5,9546$ p=0,0348*
Humidade	$F=0,5996$ p=0,4566
Proteína total	$F=20,1708$ p=0,0012**
Matéria gorda	$F=3,8992$ p=0,0766
Cinza total	$F=276,8679$ p=0,0000***

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância - *significativo para p<0,05;

significativo para p<0,01; *significativo para p<0,001.

Quadro 44 – Tripa (intestino grosso de porco): médias e desvios padrão para variáveis físico-químicas, considerando 2 fábricas (A e B).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
pH	5,19 a ± 0,09	5,93 b ± 0,48
a _w	0,939 a ± 0,026	0,745 b ± 0,020
Teor de cloretos (%) NaCl)	4,96 a ± 0,87	5,82 b ± 0,002
Humidade (%)	53,35 ± 10,10	48,92 ± 8,64
Proteína total (%)	8,45 a ± 1,07	10,43 b ± 0,17
Matéria gorda (%)	31,69 ± 13,31	18,86 ± 8,73
Cinza total (%)	6,02 a ± 1,80	19,91 b ± 0,96

Nota: na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Se deslocarmos a nossa atenção para os valores do pH e da a_w, verificamos que o pH das tripas usadas na fábrica B (5,93) foi significativamente superior ao obtido para as tripas utilizadas na fábrica A (5,19). Contudo, a a_w registada para as tripas procedentes da fábrica B (0,745), por si só, confere-lhes estabilidade bacteriológica, podendo classificar-se estas tripas, segundo Rödel (1975), como conserváveis. Por outro lado, as tripas procedentes da fábrica A, por apresentarem valores de pH superiores a 5,0 e valores de a_w superiores a 0,90 (a média registada foi de 0,939), segundo o critério de Rödel (1975) são classificadas como putrescíveis. No entanto, ressalva-se que as amostras de tripa correspondem a produto demolhado e pronto a utilizar no enchimento das massas de carne e não a produto mantido em conservação para futura utilização. Porém, considerando os resultados obtidos para a tripa demolhada será de supor uma deficiente qualidade das tripas conservadas na fábrica A. Aliás, os resultados das análises microbiológicas feitas às amostras de tripa (Quadro 46) dão suporte a esta suposição.

O teor de cinza total obtido para as tripas utilizadas na fábrica B (19,91%) foi significativamente superior ao valor registado para as tripas usadas na fábrica A (6,02%). Uma possível explicação para estes resultados poderá resultar do facto das matérias minerais existentes nas amostras estudadas serem provenientes, principalmente, da salga (Fraqueza, 1992), tendo sido o teor de cloretos significativamente superior nas amostras recolhidas na fábrica B.

Ao trabalhar com tripa de ovino, fresca, de diferentes origens e categorias, Fraqueza (1992) obteve teores de gordura total que variaram entre 0,2% e 0,4%. Em tripa salgada de ovino, também com distintas origens, aquela autora registou teores de humidade que variaram entre 80,6 e 85,3% e teores de cinza entre 5,83 e 9,23%.

As tripas naturais, no decurso da sua preparação, são expostas a múltiplas contaminações por elementos de natureza biológica e química (Labie, 1987). Na opinião deste autor, o cólon e o ceco albergam um grande número de bactérias, sendo a população dominante constituída por espécies anaeróbias estritas pertencentes na sua grande maioria ao género *Bacteroides* e ainda aos géneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Clostridium*. Existem ainda bactérias anaeróbias facultativas da família *Enterobacteriaceae*, destacando-se os géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Shigella*. Fraqueza (1992) informa ainda que no conteúdo dos intestinos de suínos existem em

grande número bactérias dos géneros *Lactobacillus* e *Streptococcus* (centenas de milhões por grama).

As análises microbiológicas feitas às tripas utilizadas em ambas as fábricas mostraram haver diferenças significativas apenas para as contagens de microrganismos psicrotróficos totais e para as de leveduras (Quadro 45), com valores mais elevados, para aquelas contagens, nas amostras recolhidas na fábrica A (Quadro 46). De um modo geral, os valores das análises microbiológicas foram mais baixos nas amostras recolhidas na fábrica B, consequência também dos mais baixos valores de a_w e mais elevados valores de teor de cloretos das tripas utilizadas na fábrica B. Todas as tripas analisadas evidenciaram níveis de higiene compatíveis com a sua utilização como invólucro para enchidos.

Num trabalho já antigo, Glénat (1969) encontrou em tripa grossa de suíno, salgada, contagens de microrganismos mesófilos de $1,3 \times 10^5$ ufc/g, de microrganismos psicrotróficos de 2×10^6 e ausência de esporos de *Clostridia* sulfito redutores em 1 g de amostra. O mesmo autor, no mesmo trabalho, estudou a evolução da microbiota ao longo da salga de tripa grossa de suíno e ao 19º dia de salga os valores registados foram de $1,2 \times 10^6$ ufc/g, para microrganismos mesófilos totais; 10 ufc/g, para enterobactérias e presença de esporos de *Clostridia* sulfito redutores em 1g de amostra. Em tripa grossa de suíno, fresca, aquele autor encontrou níveis de contaminação de *Enterobacteriaceae* de $6,4 \times 10^4$ ufc/g.

Num trabalho em que estudou tripa grossa de suíno fresca, Fraqueza (1992) encontrou contagens de microrganismos mesófilos totais que variaram entre 6 e 7 log ufc/g.

Quadro 45 – Tripa (intestino grosso de porco): análise de variância para resultados de análises microbiológicas considerando o factor fábrica (A e B).

Variáveis	Fábrica
	G.L.=1
Mesófilos totais	$F=2,0241$ $p=0,1853$
Psicrotróficos totais	$F=7,7684$ $p=0,0192*$
Leveduras	$F=60,0891$ $p=0,0000***$
<i>Lactobacillus</i> spp.	$F=1,0325$ $p=0,3335$
<i>Micrococcaceae</i>	$F=0,1365$ $p=0,7195$
Esporos de bactérias aeróbias	$F=0,2645$ $p=0,6182$
<i>Enterobacteriaceae</i>	$F=4,7894$ $p=0,0535$
<i>Streptococci</i> do grupo D	$F=0,3179$ $p=0,5853$
Esporos de <i>Clostridia</i> sulfito-redutores	$F=0,2273$ $p=0,6438$
Bactérias coliformes	$F=0,3846$ $p=0,5490$
<i>Escherichia coli</i>	$F=2,5000$ $p=0,1449$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância - *significativo para $p < 0,05$; ***significativo para $p < 0,001$.

Trigo e Fraqueza (1998) estudaram a população microbiana de tripas frescas do intestino grosso de porco (cólon) preparadas num matadouro português e obtiveram os seguintes resultados (log UFC/g): 7,54 para microrganismos mesófilos totais; 3,85 para esporos de bactérias aeróbias; 7,45 para *Enterobacteriaceae*; 4,56 para *Streptococci* do grupo D e 1,74 para esporos de *Clostridia* sulfito-redutores. Na estimativa do número de células viáveis, tanto de bactérias coliformes como de *Escherichia coli*, aquelas autoras encontraram o mesmo valor (7,55) pelo que, naquele caso, a microbiota coliforme era maioritariamente composta por estirpes do género *E. coli*.

Quadro 46 – Tripa (intestino grosso de porco): médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas, considerando 2 fábricas (A e B).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
Mesófilos totais (log UFC/g)	5,31 ± 1,16	4,51 ± 0,75
Psicrotróficos totais (log UFC/g)	4,52 a ± 1,41	2,02 b ± 1,69
Bolores (log UFC/g)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Leveduras (log UFC/g)	5,57 a ± 0,59	1,91 b ± 0,99
Lactobacillus spp. (log UFC/g)	4,84 ± 2,44	3,56 ± 1,85
Micrococcaceae (log UFC/g)	3,92 ± 1,15	3,73 ± 0,50
Esporos de bactérias aeróbias (log nº esporos/g)	2,01 ± 1,46	2,34 ± 0,58
Enterobacteriaceae (log UFC/g)	2,63 ± 2,43	0,33 ± 0,82
Streptococci do grupo D (log UFC/g)	1,55 ± 1,06	2,04 ± 1,86
Esporos de Clostridia sulfito-redutores ▲	2,33 ± 1,37	2,67 ± 1,03
Estimativa do nº de células viáveis de bactérias coliformes ▲	1,33 ± 0,51	1,17 ± 0,40
Estimativa do nº de células viáveis de Escherichia coli ▲	1,33 ± 0,51	1,00 ± 0,00

Nota: na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

▲ Resultados para esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *E. coli*:

Classe 1: < 1 esporo/bactéria g⁻¹

Classe 2: > 1 e < 10 esporos/bactéria g⁻¹

Classe 3: > 10 e < 100 esporos/bactéria g⁻¹

10.3 - Sal

Quanto à avaliação microbiológica feita ao sal utilizado na formulação do paio de porco Alentejano, nas duas fábricas em estudo, foram encontradas diferenças significativas entre fábricas para as variáveis microrganismos mesófilos totais, *Micrococcaceae* e esporos de bactérias aeróbicas (Quadro 47).

O sal pode ser uma fonte de contaminação microbiológica da carne, para além de actuar como agente selectivo para bactérias halotolerantes, como *Staphylococcus* enterotóxicos e esporos de *Clostridium perfringens* (Fraqueza, 1992). Para Ribeiro (1986), o

sal refinado, pela natureza do processo de obtenção, é praticamente estéril, recomendando aquele autor o emprego deste sal na indústria alimentar por forma a diminuir os riscos de contaminação. Já o sal marinho e o sal gema, proveniente de poços de salmoura, cristalizado em tabuleiros de terra, são produtos fortemente contaminados.

Quadro 47 – Sal: análise de variância para resultados de análises microbiológicas considerando o factor fábrica (A e B).

Variáveis	Fábrica
	G.L.=1
Mesófilos totais	$F=536,5092$ $p=0,0000***$
Bolores	$F=1,0000$ $p=0,3409$
Leveduras	$F=4,6826$ $p=0,0557$
Micrococcaceae	$F=729,2727$ $p=0,0000***$
Esporos de bactérias aeróbias	$F=245,0749$ $p=0,0000***$
Esporos de Clostridia sulfito-redutores	$F=1,0000$ $p=0,3409$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.
Níveis de Significância - ***significativo para $p<0,001$.

Ribeiro *et al.* (1968), nos seus estudos sobre o sal marinho português, demonstraram que para além dumha microbiota banal composta por *Bacillaceae*, *Micrococcaceae*, bolores e *Corynebacteriaceae*, existem bactérias responsáveis pelo aparecimento de pigmentações vermelhas, como *Halobacterium* e *Halococcus*, extremamente prejudiciais do ponto de vista tecnológico para a indústria alimentar, assim como de esporos de *Clostridia* sulfito redutores, que constituem um risco para a saúde pública. Para Ribeiro (1986), o sal higienizado, obtido a partir do sal gema por lavagem com salmoura saturada a uma temperatura próxima de 100°C, comtém muito menos microrganismos que o sal que lhe deu origem sem que, contudo, seja estéril.

O sal utilizado na fábrica B apresentou sempre resultados inferiores aos limiares de detecção dos métodos utilizados (Quadro 48). Por seu lado, na fábrica A foram encontrados valores de microrganismos mesófilos totais de 2,99 log ufc/g, de leveduras 1,12 log ufc/g, de *Micrococcaceae* de 3,17 log ufc/g e de esporos de bactérias aeróbias de 2,06 log nº esporos/g. Considerando estes valores e que a fábrica A é também produtora de presunto, colocamos a hipótese desta fábrica fazer a reciclagem do sal utilizado na salga do presunto para sua utilização no fabrico de enchidos.

Quadro 48 – Sal: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas, considerando 2 fábricas (A e B).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
Mesófilos totais (log UFC/g)	2,99 a ± 0,32	0,00 b ± 0,00
Psicrotróficos totais (log UFC/g)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Bolores (log UFC/g)	0,50 ± 1,22	0,00 ± 0,00
Leveduras (log UFC/g)	1,12 ± 1,26	0,00 ± 0,00
Lactobacillus spp. (log UFC/g)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Micrococcaceae (log UFC/g)	3,17 a ± 0,29	0,00 b ± 0,00
Esporos de bactérias aeróbias (log nº esporos/g)	2,06 a ± 0,32	0,00 b ± 0,00
Enterobacteriaceae (log UFC/g)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Streptococci do grupo D (log UFC/g)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Esporos de Clostridia sulfito-redutores ▲	1,17 ± 0,41	1,00 ± 0,00
Estimativa do nº de células viáveis de bactérias coliformes ▲	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Estimativa do nº de células viáveis de Escherichia coli ▲	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

Nota: na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.
 ▲Resultados para esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *E. coli*:
 Classe 1: < 1 esporo/ bactéria g⁻¹; Classe 2: > 1 e < 10 esporos/ bactérias g⁻¹

10. 4 - Água

As análises microbiológicas realizadas sobre amostras de água fornecida pelas redes municipais de Barrancos (fábrica A) e Estremoz (fábrica B), utilizada tanto na higiene e sanitização das instalações fabris, alvo de estudo, como na formulação do paio de porco Alentejano, consideraram as contagens de bactérias aeróbias totais (mesófilas e psicrotróficas) e a determinação do número mais provável de *Streptococci* fecais, esporos de *Clostridia* sulfito-redutores e de bactérias coliformes. Em todas as amostras analisadas os resultados foram inferiores ao limiar de detecção dos métodos utilizados, confirmando a qualidade microbiológica da água daquelas redes municipais

11 – Caracterização do paio de porco Alentejano ao longo do processo de fabrico

Para a caracterização do processo de fabrico foram realizados, nos paios procedentes de ambas as fábricas estudadas, análises físico-químicas, incluindo a determinação do perfil dos ácidos gordos mais importantes, e análises microbiológicas. Foram recolhidas amostras em 4 fases do processo de fabrico: massa não condimentada (fase 1), pré-enchimento (fase 2), fase intermédia da cura (fase 3) e produto final (fase 4).

11.1 – Análises físico-químicas

A análise de variância feita sobre os resultados das análises físico-químicas (Quadro 49) mostrou haver diferenças significativas para a maioria das variáveis, tanto quando consideramos o factor fábrica (excepção para as variáveis a_w e parâmetros de cor) como o factor fase (exceptuaram-se os parâmetros de cor a^* e b^*). Estes resultados pressupõem diferenças marcadas entre os produtos fabricados numa e noutra fábrica, para características físico-químicas, supostamente devidas aos diferentes processos de fabrico adoptados pelas fábricas, principalmente pelo recurso à fumagem numa delas. A existência de diferenças ao longo das fases de fabrico são normais e esperadas, resultando das modificações que ocorrem com a evolução da cura dos enchidos.

Para a maioria das variáveis físico-químicas a interacção fábrica x fase foi significativa. Nestes casos a evolução daquelas variáveis ao longo da cura terá apresentado tendências diferentes, provavelmente como consequência das diferenças nos processos de fabrico, designadamente com a operação de fumagem na fábrica B.

A observação das médias das variáveis físico-químicas (Quadro 50) mostra um decréscimo do pH menos pronunciada nos enchidos da fábrica B, até à fase intermédia da cura (fase 3), provavelmente por acção de *Lactobacillus* spp. e de outras bactérias ácido lácticas, que na fase 3 existem em número significativamente inferior nos enchidos desta fábrica (capítulo 11.3; Quadro 54), consequência possível da acção bacteriostática e bactericida do fumo.

Na carne, a mínima capacidade de retenção de água corresponde a valores de pH próximos do ponto isoeléctrico das proteínas miofibrilares (5,00 – 5,30). Deste modo e entre outras razões, como por exemplo a relação entre o valor do pH e o crescimento microbiano, o pH é importante para a qualidade dos enchidos, uma vez que está relacionado com a sua desidratação, consistência e capacidade de conservação (Klement *et al.*, 1973; Lücke, 1985; Bacus, 1986; Demeyer *et al.*, 1987; San Martín, 1993; Alvarez, 1994; Frey, 1995; Guerrero *et al.*, 1999; Lizaso *et al.*, 1999; Muguerza *et al.*, 2004; Turubatovic *et al.*, 2004). Com efeito, aqueles valores de pH determinam a gelificação das proteínas, em acção conjunta com o cloreto de sódio possibilitam a solubilização das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas. O gel formado funciona como uma malha que envolve partículas de carne e de gordura contribuindo para aumentar a firmeza dos enchidos (Klettner e Rödel, 1978; Alvarez, 1994; Guerrero *et al.*, 1999).

Quadro 49 – Processo de fabrico de paio de porco Alentejano: análise de variância para variáveis físico-químicas considerando os factores fábrica (A e B) e Fase de fabrico (1, 2, 3 e 4).

Variáveis	Factores		Interacção 1x2	
	Fábrica			
	(1)	(2)		
	G.L.=1	G.L.=3	G.L.=3	
pH	F=14,2743 p=0,0002***	F=17,6289 p=0,0000***	F=3,6995 p=0,0134*	
a _w	F=0,7896 p=0,3758	F=112,7843 p=0,0000***	F=1,1200 p=0,3433	
Teor de cloretos	F=68,5734 p=0,0000***	F=654,5927 p=0,0000***	F=8,7854 p=0,0000***	
Humidade	F=17,7159 p=0,0001***	F=82,6480 p=0,0000***	F=0,2261 p=0,8780	
Proteína total	F=13,9144 p=0,0004***	F=35,7718 p=0,0000***	F=11,1418 p=0,0000***	
Matéria gorda	F=50,6448 p=0,0000***	F=44,4058 p=0,0000***	F=1,5445 p=0,2100	
Cinza total	F=43,8154 p=0,0000***	F=276,5707 p=0,0000***	F=7,5007 p=0,0002***	
ABVT	F=28,6942 p=0,0000***	F=406,1436 p=0,0000***	F=8,2726 p=0,0001***	
L*	F=0,0961 p=0,7571	F=5,8981 p=0,0009***	F=3,1686 p=0,0272*	
a*	F=0,5756 p=0,4496	F=1,5386 p=0,2085	F=1,3912 p=0,2493	
b*	F=6,4435 p=0,0125	F=1,1037 p=0,3508	F=8,2495 p=0,0001***	

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância - *significativo para p<0,05; ***significativo para p<0,001.

Os valores de pH por nós obtidos não diferem muito dos apresentados por vários autores que trabalharam com diferentes tipos de enchidos (Demeyer *et al.*, 1974; Acton e Dick, 1976; Stiebing e Rödel, 1988; Domínguez *et al.*, 1989; Rosário, 1989; Santamaría *et al.*, 1992; Chasco *et al.*, 1993; Marquina *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1993; San Martín, 1993; Molly *et al.*, 1996; Hierro *et al.*, 1997; López, 1997; Zalacain *et al.*, 1997a; Fernández, 2000; Patarata, 2002; Zanardi *et al.*, 2002; Salavessa e Barreto, 2004; Santos *et al.*, 2004; Turubatovic *et al.*, 2004; Ulmer e Fischer, 2004). Vários investigadores (Domínguez, 1988; López, 1997; Demeyer *et al.* 2000; Muguerza *et al.*, 2004) atribuem as pequenas variações encontradas entre os dados de uns e outros autores a factores como, o uso ou não de açúcar, a quantidade e o tipo de açúcar, a utilização ou não de culturas de arranque e as condições ambientais ao longo do fabrico dos enchidos.

San Martín (1993) opina que no início do processo de fabrico dos enchidos a produção de ácidos pode encontrar resistência devido à capacidade tampão da massa (proteínas, aminoácidos, compostos azotados de carácter básico, entre outros). Esta será

uma possível explicação para a ligeira subida do pH (de 5,92 para 5,99) das massas preparadas na fábrica B, entre as fases 1 (massa não condimentada) e 2 (pré-enchimento).

Quadro 50 – Processo de fabrico de paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para variáveis físico-químicas registadas em 2 fábricas (A e B) e ao longo de 4 fases de fabrico (1, 2, 3 e 4).

Variáveis	Fábrica A				Fábrica B			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
pH	6,02a ±0,18	5,77a ±0,28	5,36bA ±0,40	5,45bA ±0,43	5,92 ±0,21	5,99 ±0,18	5,71B ±0,34	5,74B ±0,24
a _w	0,970a ±0,020	0,946a ±0,018	0,921b ±0,019	0,821c ±0,054	0,973a ±0,015	0,949a ±0,018	0,895b ±0,052	0,818c ±0,060
Cloretos (%NaCl)	0,18a ±0,06	2,87bA ±0,22	3,86cA ±0,48	5,02dA ±0,41	0,28a ±0,24	3,48bB ±0,44	5,26cB ±0,65	5,97dB ±0,47
Humidade (%)	50,81 ±7,12	53,53 ±1,51	35,33 ±8,20	27,21 ±3,29	57,53 ±5,84	59,29 ±7,56	42,70 ±10,22	31,48 ±3,90
Proteína total (%)	14,88a ±1,94	13,28aA ±0,24	15,46aA ±1,39	20,75b ±0,94	16,36a ±1,96	16,35aB ±1,20	18,47abB ±2,60	18,70b ±1,62
Matéria gordura (%)	35,20 ±6,30	26,27 ±1,73	39,66 ±5,74	48,38 ±4,43	24,77 ±7,55	20,83 ±8,03	26,28 ±6,01	40,14 ±4,59
Cinza total (%)	0,69a ±0,08	3,68b ±0,20	4,92cA ±0,41	6,04dA ±0,80	0,85a ±0,10	4,18b ±0,46	6,87cB ±1,56	7,87dB ±0,95
ABVT (mgNH ₃ /100gproduto)	9,30a ±0,62	10,30a ±0,91	64,53bA ±13,18	101,21c ±7,67	18,26a ±4,12	19,64 ^a ±1,65	94,57bB ±18,79	100,53b ±13,18
L*	44,78 ±10,26	41,67 ±2,86	43,95 ±5,43	40,42 ±4,21	49,56a ±7,01	39,88b ±5,00	39,71b ±6,44	43,12ab ±6,53
a*	18,06 ±3,23	18,80 ±3,46	20,54 ±5,11	17,81 ±5,11	20,16 ±4,01	18,09 ±3,96	18,08 ±5,81	16,39 ±3,97
b*	10,90a ±4,76	18,44b ±3,74	18,13bA ±7,67	13,77ab ±5,91	15,48 ±1,93	12,61 ±2,81	10,09B ±2,36	13,16 ±7,36

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes; para a mesma fase e na mesma linha, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

No final do processo de cura houve um ligeiro acréscimo do pH em relação à fase anterior. Vários autores atribuem o referido acréscimo à acção proteolítica das bactérias, eventualmente também de bolores, ou das próprias enzimas endógenas, ou das enzimas exógenas resultantes da lise de microrganismos, com a consequente formação de péptidos, aminoácidos livres, aminas e amoníaco, aumentando deste modo a concentração de substâncias tampão (Cantoni *et al.*, 1973; Dierick *et al.*, 1974; Klement *et al.*, 1974; Verplaetse *et al.*, 1989; San Martín, 1993; López, 1997; Fernández, 2000; Gimeno *et al.*, 2001a,b; Ojeda *et al.*, 2002). Para Demeyer *et al.* (1974) e López (1997), a perda de água verificada com o decurso da cura provoca uma diminuição da dissociação dos electrólitos presentes, o que também contribui para o aumento do pH. Não obstante, o aumento do pH pode dever-se também à oxidação do lactato pelos bolores, formando-se CO₂ e H₂O. Este facto foi observado por Fox *et al.* (1990) em queijos curados com bolores na sua superfície. Para López (1997) a diminuição da acidez na superfície dos enchidos por acção dos bolores originaria um gradiente de pH que produziria a difusão do lactato desde o centro até ao exterior, o que resultaria num ligeiro acréscimo do pH.

Por outro lado, também é conhecido que a libertação de aminas, frequentemente ocasionada por leveduras e bolores, produz um aumento do pH nas fases avançadas do processo de cura (Lücke 1985; Bover-Cid *et al.*, 2001a; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2003).

Apesar das diferenças nos processos de fabrico das duas fábricas, os valores de a_w tiveram uma evolução muito semelhante.

Como seria de esperar, os valores da actividade da água diminuíram progressivamente com a evolução da cura do paio. Apesar dos valores finais semelhantes, entre os produtos de ambas as fábricas, a actividade da água diminuiu mais rapidamente nos paios produzidos na fábrica B, consequência da temperatura mais elevada e humidade relativa do ar mais baixa que usualmente se verificam nesta fábrica (capítulos 9.2.6.1 a 9.2.6.4).

No final do processo de fabrico, os valores médios da a_w registados nos produtos finais das fábricas A e B foram de, respectivamente, 0,821 e 0,818. Deste modo fica assegurada a possibilidade de conservação destes produtos à temperatura ambiente, pelo efeito isolado da reduzida a_w , conforme a classificação de produtos cárneos proposta por Leistner e Rödel (1976).

De acordo com San Martín (1993), o cloreto de sódio em concentrações próximas de 3% reduz a actividade da água inicial da massa de carne para valores de 0,96-0,97. Estes valores de a_w retardam o crescimento de muitas bactérias alterantes e patogénicas e favorecem a multiplicação de lactobacilos e micrococáceas. Troller e Christian (1978) e Greer e Dilts (2004) referem como valores mínimos da a_w para que ocorra crescimento de bactérias Gram-negativas de alteração o intervalo entre 0,94 e 0,96. Para Lücke (1985) e Selgas *et al.* (1988) no decurso da fermentação dos enchidos a a_w deverá baixar para valores entre 0,93 e 0,95, suficientes para a inibição das bactérias Gram-negativas e adequados para a instalação de lactobacilos e micrococáceas.

De acordo com Selgas (1985) e Työpponen *et al.* (2003), é correntemente aceite que valores de a_w abaixo de 0,98 impedem o crescimento de bactérias Gram-negativas, típicas da alteração de produtos frescos de origem animal. Para a ICMSF (1983) e Garcia-Varona *et al.*, (2000), valores de a_w compreendidos entre 0,98 e 0,93 são favoráveis ao crescimento de *Lactobacillaceae*, *Bacillaceae* e *Micrococcaceae*. De acordo com Troller e Christian (1978), valores de a_w entre 0,98 e 0,93 previnem o crescimento da maioria das bactérias patogénicas causadoras de toxi-infecções alimentares (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus*). Para Cruz (1980) e Frazier e Westhoff (1993), a maior parte das bactérias responsáveis por alterações pejorativas dos alimentos não cresce em substratos com valores de a_w inferiores a 0,91, enquanto que os bolores se desenvolvem com a_w de 0,80. Quanto às bactérias responsáveis por toxi-infecções alimentares, *Staphylococcus aureus* desenvolve-se em substratos cuja actividade da água é, pelo menos, de 0,86; no entanto esta espécie não produz enterotoxinas quando o valor da a_w é inferior a 0,92. Apesar dos valores indicados, a a_w óptima para o crescimento de *S. aureus* situa-se entre 0,990 e 0,995, ainda de acordo com aqueles autores. Os bolores apresentam diferenças importantes quanto à sua a_w óptima e quanto ao intervalo de a_w dentro do qual germinam os esporos. Em alguns bolores a a_w mínima para a germinação dos esporos é de 0,62 (Frazier e Westhoff, 1993).

Em enchidos crus fermentados espanhóis, Sanz *et al.* (1988) encontraram uma redução progressiva da a_w desde 0,95-0,96 (no enchimento) a 0,90, aos 10 dias de cura e 0,87 ao cabo de 40 dias de cura. Em salsichões espanhóis, Rubio (1994) encontrou valores de a_w no início do processo que variaram entre 0,96 e 0,97; no produto acabado registou valores compreendidos entre 0,86 e 0,87. Num outro trabalho em que também foram usados salsichões espanhóis, Alvarez (1994) encontrou valores iniciais (pré-enchimento) de

a_w de 0,97; aos 12 dias de cura os resultados foram próximos de 0,94 e no produto final obteve valores dentro do intervalo 0,86-0,87, teores de a_w idênticos aos obtidos por Rubio (1994). Num tipo de paio espanhol Fernández (2000) encontrou, logo após a formulação, valores de a_w de 0,99 e no produto final, com 23 dias de cura aqueles valores variaram entre 0,81-0,82. Astiasarán *et al.* (1990) mediram a a_w de paios espanhóis curados e encontraram valores de 0,89 para os produtos cuja massa era composta por porções maiores (miga grossa) e de 0,83 para os paios produzidos com miga fina. Valores semelhantes a estes têm sido apresentados por outros autores (Lücke, 1986; Ziegler *et al.*, 1987; Sanz *et al.*, 1988; Domínguez *et al.*, 1989; Beriain *et al.*, 1993; Hierro *et al.*, 1997; Samelis *et al.*, 1998; Beriain *et al.*, 2000a,b; Zanardi *et al.*, 2002; Paparella *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Turubatovic *et al.*, 2004).

A concentração de cloreto de sódio aumentou significativamente ao longo do processo de fabrico, devido à desidratação dos enchidos. As diferenças encontradas entre as fábricas não são atribuídas a diferentes graus de desidratação dos enchidos mas, principalmente, a diferenças na formulação, usando-se na fábrica B teores de sal mais elevados. Em todo o caso, em ambas as fábricas os teores de NaCl são superiores aos encontrados em grande parte da bibliografia para diversos tipos de enchidos (Novelli *et al.*, 1998; Demeyer *et al.*, 2000; Gimeno *et al.*, 2000; Byun *et al.*, 2001; Zanardi *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Zanardi *et al.*, 2004).

De um modo geral, o consumo de sódio em muitos dos países industrializados excede os valores indicados nas recomendações nutricionais. Por outro lado, é sabido que o consumo excessivo de sódio está fortemente correlacionado com a ocorrência de hipertensão, doença coronária e morte prematura (Tuomilehto *et al.*, 2001; Ruusunen e Puolanne, 2004). A principal fonte de sódio na dieta humana é o cloreto de sódio. Por esta razão, muitos investigadores têm estudado a possibilidade de reduzir os teores de cloreto de sódio, ou da sua substituição parcial por outros sais como cloretos de potássio, de magnésio, de lítio e de cálcio e por ascorbato de cálcio na formulação de enchidos (Gimeno *et al.*, 1999a,b, 2001a,b; Elias *et al.*, 2004). Contudo, o relevante papel do sal na solubilização e formação de geles de proteínas e a sua acção no sabor dos alimentos torna difícil não só a sua substituição como também a redução das quantidades usadas na formulação de enchidos (Gimeno *et al.*, 2001b).

Quanto aos valores obtidos para a humidade, em ambas as fábricas verificou-se um aumento entre as fases 1 (massa não condimentada) e 2 (pré-enchimento), explicado pela adição de água às massas, não só durante a operação de mistura mas também durante a maturação das massas. As diferenças entre os resultados obtidos numa e noutra fábrica dever-se-ão fundamentalmente aos diferentes teores de humidade das massas iniciais (Quadro 50) e não tanto às condições ambientais em que decorreu a cura. No entanto, o pH mais baixo dos enchidos produzidos na fábrica A terá também contribuído para a elevada perda de água destes enchidos.

Em trabalhos que realizou utilizando um tipo de salsichão espanhol Alvarez (1994) obteve, imediatamente após a formulação, valores de humidade próximos de 60%, descendo durante os 28 dias de cura até valores finais que variaram entre 40 e 45%. Segundo este autor, a desidratação ocorreu de forma mais intensa durante a segunda e terceira semanas de cura, quando a temperatura e a humidade relativa do ar da câmara foram de 12°C e 75%, respectivamente. Este comportamento coincidiu com o observado por outros autores (Incze, 1987; Stiebing e Rödel, 1988; Pérez-Alvarez *et al.*, 1999). Teores de humidade no produto final igualmente superiores aos que obtivemos foram apresentados por Mendoza *et al.* (1983), Genigeorgis *et al.* (1986), Vignolo *et al.* (1989), Astiasarán *et al.* (1990), Beriain *et al.* (1993), Lizaso *et al.* (1999), Zanardi *et al.* (2002). Outros autores encontraram, no produto final, valores de humidade semelhantes aos que registámos

(Serrano Moreno, 1979; Lücke, 1984; Samelis *et al.*, 1993; Stahnke, 1995b; Beriaín *et al.*, 2000b; Fernández, 2000), que observaram no produto acabado teores inferiores a 30%. Bover-Cid *et al.* (2001b) encontraram teores de humidade de 32,97% num enchido espanhol fermentado pela microbiota espontânea, com 21 dias de cura, e teores que variaram entre 36,04% e 46,03% em enchidos idênticos que foram inoculados com estirpes de *Lactobacillus curvatus* e *Staphylococcus xylosus*.

As variáveis proteína, gordura e cinza vão aumentando ao longo da cura, consequência da perda de água dos enchidos. No entanto, tanto a proteína como a gordura apresentaram uma redução nos seus teores entre as fases 1 e 2. Este facto resulta da adição de água às massas de carne.

Num trabalho em que recorreu a um tipo de salsichão espanhol, Alvarez (1994) obteve teores de matéria gorda na fase de pré-enchimento de, aproximadamente, 23% e no produto final, com 28 dias de cura, registou teores que variaram entre 35 e 39%. Considerando que o teor de matéria gorda dos enchidos depende da formulação utilizada, na bibliografia consultada é encontrado um intervalo amplo para os teores de matéria gorda (Acton e Dick, 1976; Melo *et al.*, 1986; Incze, 1987; Melgar *et al.*, 1990; Astiasarán *et al.*, 1993; Beriaín *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1993; Patarata, 2002; Santos *et al.*, 2004).

Rubio (1994), em salsichão curado espanhol encontrou teores de cinza que variaram entre 8,99 e 9,43%, valores um pouco superiores aos nossos. Ferrer e Arboix (1986), em salsichão francês, encontraram valores de cinza ainda superiores. Novelli *et al.* (1998) em salame de Milão encontraram teores de cinza inferiores aos obtidos por nós. Por outro lado, os teores que registámos no produto acabado são semelhantes aos encontrados por Acton e Dick (1976), Barranco *et al.* (1985), Domínguez *et al.* (1988), Cid *et al.* (1992), Zanardi *et al.* (2002). As variações nos resultados apresentados poderão dever-se, entre outras razões, a diferenças na formulação dos enchidos

A desaminação dos aminoácidos produz a libertação de amoníaco, cuja extensão pode ser estimada mediante o doseamento do azoto básico volátil total (Demeyer, 1992).

O azoto básico volátil total aumentou de forma significativa ao longo da cura, resultado dos fenómenos proteolíticos inerentes à cura. Na fase 3 os valores de ABVT dos enchidos da fábrica B foram significativamente superiores aos da fábrica A, resultados que poderão ser explicados pelas temperaturas mais elevadas dos fumeiros da fábrica B, comparativamente às câmaras de cura da fábrica A, o que resultará numa proteólise mais intensa nos produtos daquela fábrica.

Garriga *et al.* (1988) observaram que a quantidade de amoníaco dos enchidos se correlacionava significativamente com os teores em lactobacilos e micrococos. Por outro lado, é sabido que em meio alcalino o amoníaco se dissipa, enquanto em meios ácidos, como é o caso dos enchidos que estudámos, fica retido. Rubio (1994) sugere que os lactobacilos desaminam os aminoácidos livres de forma intensa durante o seu crescimento logarítmico.

O aumento dos valores do ABVT ao longo da cura dos enchidos é uma situação normal e que ocorre na generalidade dos enchidos (Dierick *et al.*, 1974; Cantoni *et al.*, 1975; Lois *et al.*, 1987; Domínguez, 1988; Garriga *et al.*, 1988; Díaz *et al.*, 1992, 1993; Rubio, 1994; Díaz *et al.*, 1996; López, 1997; Santos *et al.* 2004).

Durante a maturação dos enchidos as proteínas sofrem uma série de modificações, consequência da acção de diferentes enzimas proteolíticas, quer endógenas, conduzindo à degradação inicial das proteínas musculares em péptidos, quer microbianas, responsáveis pela degradação subsequente (Toldrá e Flores, 1998; Fadda *et al.*, 1999; Hierro *et al.*, 1999). Sendo o pH um dos principais factores que condicionam a actividade daquelas

enzimas e considerando que os valores daquele parâmetro foram superiores nos produtos da fábrica B, onde se registaram valores de ABVT mais elevados nas primeiras 3 fases de fabrico, parece ter havido o envolvimento de enzimas que perdem actividade a valores de pH mais reduzidos (Patarata, 2002).

Demeyer *et al.* (1986) consideram que a fermentação de aminoácidos é responsável por cerca de 10% do ácido pirúvico produzido no enchido, a partir do α-cetoácido formado no processo de desaminação (Demeyer, 1992). Esta eventual utilização da cadeia carbonada de aminoácidos na produção de energia, tendo como composto intermédio o ácido pirúvico, sem que, no entanto, estejam presentes a frutose-1,6-difosfato e triosesfosfato, pode levar ao desvio do processo para uma fermentação ácida mista, com síntese concomitante de ácido acético. Estas considerações poderiam justificar, também, os mais elevados teores de ABVT em produtos mais ácidos. Contudo, Christensen *et al.* (1999) opinam existir um grande desconhecimento das vias envolvidas no catabolismo de aminoácidos pelas bactérias ácido lácticas e nas estudadas por estes autores a utilização da cadeia carbonada na produção de ácido pirúvico não é habitual.

Quanto aos parâmetros de medição da cor L* e a* tendem a baixar ao longo do processo de fabrico; a cor vermelha mais intensa da carne fresca (índice do processo) vai ficando mais carregada. Deste modo, baixam os valores da luminosidade (L*) e do parâmetro a* (valores positivos mais elevados correspondem a tonalidades vermelhas mais intensas). O parâmetro b* (valores positivos correspondem à tonalidade amarela) poderá relacionar-se com o grau de autoxidação da gordura intramuscular (uma vez que as medições foram feitas na parte magra das massas), não se tendo verificado, em nenhuma das fábricas, diferenças significativas entre valores de b* registados no início e no fim do processo de fabrico.

Chizzolini *et al.* (1996) mediram a cor nos músculos *Semimembranosus* e *Biceps femoris* de pernas frescas (24 h *post mortem*) destinadas ao fabrico de presunto de Parma. Fizeram medições de cor, nos mesmos músculos, nos presuntos, resultantes daquelas pernas, com 12 meses de cura. No músculo *Semimembranosus* das pernas frescas obtiveram valores de L*, a* e b* de, respectivamente, 51,32; 10,40 e 6,56. Os valores daqueles parâmetros no músculo *Biceps femoris* foram, seguindo a mesma ordem, 49,96; 11,75 e 7,37. Nos presuntos curados os valores registados para o músculo *Semimembranosus* foram 42,30; 14,19 e 4,78, respectivamente para L*, a* e b*. No músculo *Biceps femoris* obtiveram 42,93; 16,06 e 4,65.

Zanardi *et al.* (1999) mediram a cor no músculo *Semimembranosus* de pernas para fabrico de presunto e em presunto com 15 meses de cura. Para as pernas os valores de L*, a* e b* registados foram, respectivamente, 52,18; 9,89 e 5,87. Nos presuntos os valores obtidos foram 39,13 para L*, 16,99 para a* e 6,56 para b*.

Paparella *et al.* (2004) estudaram a evolução da cor num produto de salsicharia tradicional italiano, designado por "lonza", obtido pela cura e secagem de lombo de porco. Ao longo da cura, com cerca de 2 meses, aqueles autores verificaram ter havido um decréscimo nos valores da luminosidade (L*) enquanto que o índice de cromaticidade (a*/b*) aumentou. Os autores atribuíram aqueles resultados à perda de água e à progressiva formação de pigmentos da carne. Sanabria *et al.* (2004), em estudos sobre presunto de porco Ibérico, encontraram correlações positivas significativas entre o parâmetro de cor luminosidade e o teor de humidade do produto. Outros valores para aqueles parâmetros da cor foram obtidos por vários autores (Gago *et al.*, 1992; Ansorena *et al.*, 1997; Üren e Babayigit, 1997; Gimeno *et al.*, 1999b; Pérez-Alvarez *et al.*, 1999; Gimeno *et al.*, 2000; Muguerza *et al.*, 2003; Hoz *et al.*, 2004).

11. 2 - Perfil de ácidos gordos

A análise de variância para os resultados do perfil de ácidos gordos (Quadro 51) mostrou haver diferenças significativas, entre enchidos das duas fábricas, para os ácidos gordos láurico ($p<0,05$), palmitoleico ($p<0,001$), linoleico ($p<0,01$), linolénico ($p<0,01$) e gadoleico ($p<0,001$).

Considerando o factor fase do fabrico, foram encontradas diferenças significativas para os ácidos gordos mirístico ($p<0,05$), palmítico ($p<0,01$), oleico ($p<0,01$) e heneicosenoico ($p<0,001$).

Foram encontradas interacções significativas entre os factores fábrica x fase de fabrico para os ácidos mirístico ($p<0,05$), palmítico ($p<0,05$), palmitoleico ($p<0,01$), oleico ($p<0,01$), gadoleico ($p<0,01$) e heneicosenoico ($p<0,001$).

Quadro 51 – Processo de fabrico de paio de porco Alentejano: análise de variância para resultados do perfil de ácidos gordos considerando os factores fábrica (A e B) e fase de fabrico (1, 2, 3 e 4).

Ácido gordo	Factores		Interacção 1x2
	Fábrica	Fase	
	(1)	(2)	
	G.L.=1	G.L.=3	G.L.=3
Láurico (12:0)	$F=4,5205$ $p=0,0376^*$	$F=1,6052$ $p=0,1976$	$F=1,7738$ $p=0,1618$
Mirístico (14:0)	$F=0,0316$ $p=0,8595$	$F=3,5171$ $p=0,0204^*$	$F=2,7813$ $p=0,0486^*$
Palmítico (16:0)	$F=1,6586$ $p=0,2027$	$F=4,9633$ $p=0,0038^{**}$	$F=3,7515$ $p=0,0155^*$
Palmitoleico (16:1)	$F=31,2298$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,7629$ $p=0,5193$	$F=4,6026$ $p=0,0058^{**}$
Margárico (17:0)	$F=0,2611$ $p=0,6113$	$F=1,6853$ $p=0,1797$	$F=1,0429$ $p=0,3802$
Margaroleico (17:1)	$F=0,7791$ $p=0,3809$	$F=1,4169$ $p=0,2467$	$F=0,8271$ $p=0,4841$
Esteárico (18:0)	$F=0,1767$ $p=0,6758$	$F=2,6696$ $p=0,0556$	$F=2,5706$ $p=0,0625$
Oleico (18:1)	$F=0,0030$ $p=0,9566$	$F=5,0591$ $p=0,0034^{**}$	$F=5,3561$ $p=0,0025^{**}$
Linoleico (18:2)	$F=10,5278$ $p=0,0019^{**}$	$F=0,6400$ $p=0,5923$	$F=2,4353$ $p=0,0735$
Linolénico (18:3)	$F=8,6166$ $p=0,0047^{**}$	$F=0,5016$ $p=0,6826$	$F=2,6685$ $p=0,0556$
Gadoleico (20:1)	$F=20,1774$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,5845$ $p=0,6275$	$F=5,5087$ $p=0,0021^{**}$
Heneicosenoico (21:1)	$F=0,3245$ $p=0,5711$	$F=5,0996$ $p=0,0033^{**}$	$F=7,9651$ $p=0,0001^{***}$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade. Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Os ácidos gordos que apresentaram diferenças significativas para o factor fábrica (láurico, palmitoleico, linoleico, linolénico e gadoleico), para a mesma fase de fabrico têm sempre teores mais elevados nos produtos da fábrica A, constituindo excepção o ácido palmitoleico (Quadro 52).

Quadro 52 – Processo de fabrico de paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para o perfil de ácidos gordos (% do total de ésteres metílicos identificados), considerando 2 fábricas (A e B) e 4 fases de fabrico (1, 2, 3 e 4).

Ácidos gordos	Fábrica A				Fábrica B			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Láurico (12:0)	0,08 ±0,01	0,07 ±0,01	0,08 ±0,02	0,08 ±0,01	0,07 ±0,01	0,07 ±0,01	0,07 ±0,01	0,07 ±0,01
Mirístico (14:0)	1,23 ±0,04	1,17 ±0,04	1,29 ±0,06	1,29 ±0,04	1,15a ±0,20	1,30ab ±0,01	1,23ab ±0,12	1,32b ±0,11
Palmitólico (16:0)	22,96ab ±0,47	21,56a ±0,53	23,93ab ±0,62	23,94b ±0,78	22,52a ±2,44	24,04ab ±0,28	23,06ab ±1,40	24,61b ±1,61
Palmitoleico (16:1)	2,69 ±0,15	2,39A ±0,05	2,67 ±0,30	2,75 ±0,18	2,80 ±0,42	3,26A ±0,16	3,09 ±0,22	2,99 ±0,35
Margárico (17:0)	0,25 ±0,04	0,24 ±0,01	0,26 ±0,03	0,25 ±0,03	0,31 ±0,15	0,23 ±0,02	0,27 ±0,03	0,24 ±0,03
Margaroleico (17:1)	0,26 ±0,04	0,25 ±0,00	0,25 ±0,06	0,26 ±0,05	0,31 ±0,14	0,27 ±0,05	0,25 ±0,05	0,25 ±0,03
Esteárico (18:0)	10,87 ±0,61	10,47 ±0,66	11,57 ±0,47	11,39 ±0,91	10,74 ±1,63	11,50 ±0,22	10,51 ±0,93	12,02 ±1,30
Oleico (18:1)	51,86ab ±1,74	53,91aA ±1,05	50,16b ±0,93	49,73b ±1,20	52,43 ±2,75	50,37B ±0,64	52,69 ±1,98	50,28 ±2,43
Linoleico (18:2)	7,79 ±0,59	7,92 ±0,14	7,97 ±0,78	8,20 ±0,87	7,79 ±1,41	7,27 ±0,02	7,03 ±0,25	6,50 ±1,29
Linolénico (18:3)	0,53 ±0,11	0,61 ±0,03	0,52 ±0,10	0,65 ±0,11	0,52 ±0,20	0,49 ±0,02	0,48 ±0,10	0,44 ±0,13
Gadoleico (20:1)	1,12ab ±0,12	1,22aA ±0,05	1,01b ±0,07	1,09ab ±0,03	1,02 ±0,18	0,90B ±0,01	1,02 ±0,03	1,01 ±0,12
Heneicosenoíco (21:1)	0,38a ±0,08	0,25b ±0,04	0,28b ±0,09	0,38aA ±0,05	0,33 ±0,07	0,33 ±0,03	0,30 ±0,01	0,28B ±0,04
Rácio P/S*	0,24	0,26	0,23	0,24	0,24	0,21	0,22	0,18

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes; para a mesma fase e na mesma linha, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

*Calculado pela razão entre o somatório dos ácidos gordos linoleico (18:2) e linolénico (18:3) e o somatório dos ácidos gordos láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0) e esteárico (18:0).

Os teores de ácido palmítico no final do processo são superiores aos da fase 1, embora de forma significativa apenas na fábrica B.

O ácido oleico, o mais representativo de todos os ácidos gordos da gordura de porco, evidencia uma tendência para diminuir ao longo da cura, facto já observado por vários autores (Cerise *et al.*, 1973; Paleari-Bianchi *et al.*, 1985; Astiasarán *et al.*, 1993; Alvarez,

1994). Porém, o aumento do teor daquele ácido com o decurso da cura também já foi testemunhado por outros autores (Santos *et al.*, 2004; Zanardi *et al.*, 2004).

Os ácidos gordos maioritários no paio de porco Alentejano são, por ordem quantitativa decrescente, o oleico, palmítico, esteárico e linoleico. Esta ordem é confirmada tanto nos lípidos da carne e da gordura de porco (Lee e Kauffman, 1974; Flores e Nieto, 1985; Girard e Touraille, 1985; Girard *et al.*, 1988; Mourot *et al.*, 1994; Secondi, 1997; Neves, 1998; Hoz *et al.*, 2004; Neves *et al.*, 2004) como em produtos de salsicharia que usem como matérias-primas a carne e a gordura de porco (Niinivaara e Antila, 1973; Cantoni *et al.*, 1977; Rosário 1989; Farelo, 1993; Ansorena e Astiasarán, 2004a,b; Hoz *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Zanardi *et al.*, 2004).

Farelo (1993), a propósito da composição da gordura do porco da raça Ibérica, indica para o ácido oleico teores que variam entre 46,6 e 58,4%, atribuindo à alimentação a que os animais foram sujeitos a principal razão das variações encontradas. Para os restantes ácidos gordos aquele autor indica os seguintes valores: palmítico (18,4-25,9%), esteárico (7,7-14,0%), linoleico (3,1-8,6%), mirístico (1,5-2%), linolénico (0,1-2,1%). Num trabalho recente, Neves *et al.* (2004) estudaram a composição do toucinho de porcos da raça Alentejana abatidos com diferentes pesos. Os teores de ácidos gordos encontrados para os animais abatidos aos 40 e 100 kg de peso vivo foram, respectivamente, 41,75% e 47,11%, para o ácido oleico; 22,02% e 24,92%, para o palmítico; 11,41% e 12,29%, para o esteárico; 13,60% e 8,65%, para o linoleico; 1,46% e 1,51%, para o mirístico; 1,02% e 0,74%, para o ácido linolénico. Ainda a propósito deste trabalho, os autores verificaram que a elevada actividade adipogénica no toucinho, logo nas primeiras fases do desenvolvimento dos animais, foi acompanhada por alterações significativas no perfil de ácidos gordos. Entre os 40 e os 70 kg de peso vivo houve um aumento no total de ácidos gordos saturados e monoinsaturados e um decréscimo nos teores totais de ácidos gordos polinsaturados. Entre os 70 e os 100 kg de peso vivo as diferenças encontradas na composição em ácidos gordos não foram suficientemente importantes para alterar a qualidade global da gordura subcutânea dos porcos. Rhee (1992), considerando a gordura do tecido muscular de porco, apresentou como ácido gordo maioritário o oleico, com 45,55%, seguido do palmítico (24,39%) e do esteárico (11,95%). Para o toucinho os valores indicados por aquele autor foram, respectivamente, 43,14%, 24,92% e 14,14%. Ainda segundo este autor, a gordura do tecido muscular de porco é menos saturada e mais monoinsaturada que o toucinho, sendo bastante equivalentes os teores em ácidos gordos polinsaturados. De acordo com Alvarez (1994) o toucinho de porco (referindo-se o autor a raças precoces de um modo geral) é constituído quase na sua totalidade por triacilglicéridos, enquanto que a gordura do tecido muscular, ainda que constituída maioritariamente por triacilglicéridos (62-80%), contém uma percentagem elevada de fosfolípidos (16-34%). Em ambos os casos (toucinho e gordura do tecido muscular) cerca de 40% dos ácidos gordos são saturados (de entre estes cerca de 33% é ácido esteárico), 50% são monoinsaturados (fundamentalmente ácido oleico) e 10% são polinsaturados.

No nosso trabalho, de um modo geral, ao longo da cura verificou-se um aumento dos teores dos ácidos gordos saturados e uma redução nos teores dos ácidos gordos insaturados. Evolução idêntica foi encontrada por Rosário (1989) quando trabalhou com salpicão de Vila Real, usando como matérias-primas principais carne e gordura de porcos de raças precoces.

Num trabalho em que foi estudada a evolução do perfil de ácidos gordos no “painho de Portalegre”, um enchido fumado tradicional do Alentejo, feito também com carne e gordura de porco da raça Alentejana e com características muito semelhantes ao paio objecto do nosso estudo, Santos *et al.* (2004) encontraram, nas amostras recolhidas logo no início do processo, teores importantes de ácidos gordos livres, 707 mg/ 100 g de gordura.

De entre estes, C18:1, C16:0 e C18:0 são os predominantes, com valores de 276,5 mg, 144,7 mg e 112,9 mg/ 100 g de gordura, respectivamente, mantendo-se esta ordem durante todo o período de cura. O ácido linoleico é o 4º ácido mais representativo (80,6 mg/ 100 g de gordura), sendo o único ácido gordo polinsaturado detectado nesta fase do processo de fabrico. Todos os outros ácidos gordos apareceram em concentrações muito inferiores. No decurso do desenvolvimento da fermentação, que nas condições em que estes produtos são fabricados ocorre sensivelmente durante os primeiros 6 dias de fumagem, a lipólise endógena e microbiana intensifica-se e prossegue continuamente até final da cura, passando o teor de ácidos gordos livres de 1053 mg/ 100 g de gordura, no período de fermentação, para 4187 mg/ 100 g de gordura, no produto final com 55 dias de cura. O rácio ácidos gordos saturados/ ácidos gordos monoinsaturados, que no início da fermentação é de 1,3, no final da cura é de 0,63.

López (1997) em trabalhos que realizou com um tipo de chouriço espanhol feito com matérias-primas principais procedentes de raças porcinas precoces encontrou, também, como ácidos gordo maioritário o ácido oleico, com percentagens que variaram entre os 28 e os 41%. Beriain *et al.* (1993) indicaram valores entre 33% e 43% em salsichões espanhóis; Domínguez e Zumalacárregui (1991) obtiveram valores de 43 – 50% em chouriço de León. No estudo de López (1997) o segundo ácido mais importante, em termos percentuais, foi o ácido linoleico (24 – 35%), seguido dos ácidos palmítico (16 – 20%), esteárico (8 – 11%) e palmitoleico (2 – 3%).

A libertação maioritária dos ácidos oleico e linoleico está relacionada com a distribuição dos ácidos gordos nos triacilglicéridos da gordura de porco (Brokerhoff, 1966; Neves, 1998). Segundo os estudos de Alford *et al.* (1971), as lipases que actuam nos enchidos apresentam especificidade para as posições de esterificação externas da molécula de triacilglicérido (sn-1 e sn-3). Por outro lado, é sabido que nos triacilglicéridos da gordura de porco a maior parte do ácido esteárico (cerca de 60%) encontra-se esterificado na posição sn-1 do glicerol; o ácido palmítico, na sua maioria (60-80%) está esterificado na posição sn-2 e os ácidos octadecenóicos encontram-se preferencialmente (50-60%) na posição sn-3 (Brokerhoff, 1966; Fernández, 2000). Por esta razão o grau mais intenso de lipólise deve conduzir à libertação de ácidos com 18 átomos de carbono (Demeyer *et al.*, 1974; Naes *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 1995; Fernández, 2000). Em estudos que realizou com um tipo de salsichão espanhol, acompanhado ao longo de 28 dias de cura, Alvarez (1994) encontrou como ácido gordo maioritário o oleico (com valores entre 30,46 e 34,89%), seguido dos ácidos linoleico (24,97-27,73%), palmítico (17,53-20,29%), esteárico (8,33-11,85%), linolénico (3,54-6,40%), palmitoleico (3,70-6,28%) e mirístico (1,17-3,63%). Em trabalhos realizados com enchidos espanhóis Hierro *et al.* (1997) ordenaram, por ordem decrescente os seguintes ácidos gordos: oleico, palmítico, esteárico, linoleico e palmitoleico. Samelis *et al.* (1993) trabalharam com enchidos gregos e encontraram uma ordenação parecida. Neste caso, o terceiro ácido foi o linoleico e o quarto o esteárico, mantendo-se ordem idêntica para os restantes ácidos.

A interacção de *Staphylococci* e *Lactobacillus* spp. com a oxidação de ácidos gordos polinsaturados foi estudada, em culturas puras, por Talon *et al.* (1998) e verificaram que as estirpes em estudo não apresentaram actividade pró-oxidante. Algumas estirpes de *Staphylococci* inibem a oxidação do ácido linoleico, mas não do ácido linolénico (Demeyer *et al.*, 2000). Contudo, segundo estes mesmos autores, concentrações de Mn de 0,05 g/l no meio de cultura permitem a *S. xylosus* e *S. carnosus* uma forte inibição da oxidação do ácido linolénico. Na presença de Mn algumas espécies de *Lactobacillus* inibem também a oxidação do ácido linoleico. As propriedades antioxidantes de *Staphylococci* podem ser explicadas pela sua capacidade de síntese de catalase e Mn superóxido dismutase. Relativamente a *Lactobacillus*, a eliminação de radicais superóxido é, provavelmente,

causada pelas elevadas concentrações intracelulares de Mn, naqueles microrganismos. (Demeyer *et al.*, 2000).

Ao longo dos últimos 30 anos vários trabalhos têm sido realizados sobre diferentes enchidos europeus (Cerise *et al.*, 1973; Demeyer *et al.*, 1974; Bianchi *et al.*, 1985; Nagy *et al.*, 1989; Rosário, 1989; Melgar *et al.*, 1990; Berian *et al.*, 1993; López, 1997; Chizzolini *et al.*, 1998; Ansorena e Astiasarán, 2004a,b; Zanardi *et al.*, 2004).

Zanardi *et al.* (2002) estudaram o perfil de ácidos gordos ao longo da cura (4 meses) de salame de Milão e não encontraram diferenças entre a composição em ácidos gordos do salame no início do processo e no produto curado. Neste produto e neste estudo os ácidos gordos saturados representaram 40% do total, os monoinsaturados 47% e os polinsaturados os restantes 13%.

Os dois principais parâmetros correntemente usados para avaliar a qualidade nutricional da fracção lipídica dos alimentos são os rácios P/S (ácidos gordos polinsaturados/ ácidos gordos saturados) e n - 6/ n - 3 (ácidos gordos cuja dupla ligação dista 3 ou 6 átomos de carbono da extremidade não carboxílica) (Enser *et al.*, 2000; Höglberg *et al.*, 2003; Ansorena e Astiasarán, 2004b). Actualmente, o rácio P/S recomendado deve ser superior a 0,4 – 0,5 (Enser, 2001; Wood *et al.*, 2004) de forma a prevenir tanto o excesso de ácidos gordos saturados, com efeitos negativos nos níveis plasmáticos de LDL colesterol, assim como o excesso de ácidos gordos polinsaturados, alguns dos quais poderosos agentes coagulantes, estando também envolvidos na etiologia de alguns cancros (Ansorena e Astiasarán, 2004b). Foi estimado que o rácio n - 6/ n - 3 na dieta humana do Paleolítico era de 1 – 2 (Bengmark, 1998); começou a aumentar, principalmente, desde a segunda metade do século 19, atingindo actualmente valores de 20 – 30 (Simopoulos, 1994), ou mesmo 50 (Bengmark, 1998) nas sociedades mais industrializadas. Na alimentação humana correcta aquele rácio deverá baixar para 5 ou mesmo 4 (British Nutrition Foundation, 1992; Wood *et al.*, 2004), de modo a evitar estados pró-trombóticos e pró-agregatórios, induzidos por níveis elevados de ácidos gordos polinsaturados da série n - 6. De acordo com Hoz *et al.* (2004), o rácio n - 6/ n - 3 está altamente correlacionado com a mortalidade causada por acidentes vasculares cerebrais. Portanto, o equilíbrio no rácio n - 6/ n - 3 na dieta é essencial para a diminuição da ocorrência de doenças cardiovasculares e outras doenças coronárias, mas também contribui para o normal crescimento e desenvolvimento do ser humano e para a manutenção da saúde mental (Simopoulos, 1999). Enser *et al.* (2000) sustentam que um potencial benefício de uma dieta rica em ácido α - linolénico, pertencente à série n - 3, resulta do facto da sua deposição no tecido adiposo conduzir ao aumento dos teores de ácidos gordos da série n - 3, especialmente os ácidos eicosapentaenoico (20:5) e docosahexaenoico (22:6), envolvidos no decréscimo da ocorrência de processos trombóticos. São ainda atribuídos efeitos preventivos aos ácidos gordos insaturados da série n - 3 na ocorrência dos cancros da mama e do cólon (Rose e Connolly, 1999) e de doenças como a artrite reumatóide e processos inflamatórios intestinais (Alexander, 1998). Múltiplos mecanismos estão envolvidos nestas actividades quimioprotectoras. Contudo, a maioria dos trabalhos realizados relacionam estes efeitos protectores com a redução da produção de eicosanóides a partir do ácido araquidónico (Hoz *et al.*, 2004). No entanto, a produção de eicosanóides a partir dos ácidos gordos polinsaturados da série n - 3, ácidos eicosapentaenoico (20:5) e docosahexaenoico (22:6), é muito menos potente a causar respostas biológicas, 10 a 100 vezes menos do que os produzidos a partir dos ácidos gordos insaturados da série n - 6, resultando daqui benefícios para a saúde (Rose e Connolly, 1999).

Os ácidos gordos que identificámos não nos permitem calcular o rácio n-6/ n-3. Contudo, calculámos o rácio P/S (Quadro 52), seguindo a metodologia indicada por Enser

et al. (2000). Os valores que encontrámos foram inferiores nos produtos da fábrica B, com um mínimo de 0,18, para o produto final (fase 4) e um máximo de 0,24, obtido no início do processo (fase 1). Na fábrica A aquele rácio variou entre 0,23 (fase 3) e 0,26 (fase 2). Em todo o caso os valores que obtivémos estão aquém dos valores mínimos recomendados para aquele rácio: 0,4-0,5 (Enser, 2001; Wood *et al.*, 2004).

11.3 - Análises microbiológicas

Quanto aos resultados das análises microbiológicas realizadas ao longo do processo de fabrico, a análise de variância (Quadro 53) revelou, para o factor fábrica, diferenças significativas para a maioria das variáveis (microrganismos psicrotróficos totais, *Lactobacillus* spp., bactérias ácido lácticas, esporos de bactérias aeróbias, *Streptococci* do grupo D, bactérias coliformes e *Escherichia coli*).

Quadro 53 – Processo de fabrico de paio de porco Alentejano: análise de variância para resultados de análises microbiológicas, considerando os factores fábrica (A e B) e fase de fabrico (1, 2, 3 e 4).

Análise microbiológica	Factores		Interacção 1x2
	Fábrica (1)	Fase (2)	
	G.L.=1	G.L.=3	G.L.=3
Mesófilos totais	$F=1,3622$ $p=0,2483$	$F=0,9044$ $p=0,4451$	$F=1,8587$ $p=0,1476$
Psicrotróficos totais	$F=6,9312$ $p=0,0113*$	$F=1,8436$ $p=0,1516$	$F=2,1362$ $p=0,1076$
Bolores	$F=0,0657$ $p=0,7987$	$F=0,4931$ $p=0,6885$	$F=2,8083$ $p=0,0481*$
Leveduras	$F=2,7603$ $p=0,0,1025$	$F=1,1829$ $p=0,0,3251$	$F=8,4204$ $p=0,0001***$
<i>Lactobacillus</i> spp.	$F=12,8183$ $p=0,0007***$	$F=46,6413$ $p=0,0000***$	$F=12,9109$ $p=0,0000***$
Bactérias Ácido Lácticas	$F=7,3027$ $p=0,0094**$	$F=29,3745$ $p=0,0000***$	$F=10,8965$ $p=0,0000***$
<i>Micrococcaceae</i>	$F=0,2627$ $p=0,6104$	$F=3,7513$ $p=0,0161*$	$F=0,8573$ $p=0,4689$
Esporos de bactérias aeróbias	$F=126,3302$ $p=0,0000***$	$F=11,1461$ $p=0,0000***$	$F=2,2129$ $p=0,0971$
<i>Enterobacteriaceae</i>	$F=0,0006$ $p=0,9801$	$F=93,9788$ $p=0,0000***$	$F=1,1168$ $p=0,3504$
<i>Streptococci</i> do grupo D	$F=11,4260$ $p=0,0014**$	$F=8,1650$ $p=0,0001***$	$F=1,4428$ $p=0,2405$
Esporos de <i>Clostridia</i> sulfito-redutores	$F=2,1863$ $p=0,1464$	$F=2,9495$ $p=0,0430*$	$F=6,1822$ $p=0,0013**$
Bactérias coliformes	$F=62,7973$ $p=0,0000***$	$F=115,2079$ $p=0,0000***$	$F=9,7120$ $p=0,0000***$
<i>Escherichia coli</i>	$F=30,9604$ $p=0,0000***$	$F=82,9032$ $p=0,0000***$	$F=5,5206$ $p=0,0026**$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Quando considerado o factor fase de fabrico, apenas as variáveis microrganismos mesófilos totais, psicrotróficos totais, bolores e leveduras não variaram significativamente entre as fases de fabrico.

A maioria das interacções apresenta-se significativa denotando evoluções microbianas distintas, numa e noutra fábrica, ao longo do fabrico dos paios de porco Alentejano.

De um modo geral, existem microrganismos em maior número nos paios da fábrica A (Quadro 54), onde os produtos não são sujeitos a fumagem.

Quadro 54– Processo de fabrico de paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas considerando 2 fábricas e 4 fases de fabrico (1, 2, 3 e 4).

Análise microbiológica	Fábrica A				Fábrica B			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Mesófilos totais (log UFC/g)	6,63 ±0,22	6,24 ±0,36	5,92 ±0,89	6,60 ±0,65	6,37 ±0,92	6,09 ±1,03	6,24 ±0,83	5,86 ±0,35
Psicrotróficos totais (log UFC/g)	6,41 ±0,17	5,28 ±0,61	5,30 ±1,23	5,73 ±0,80	5,15 ±1,07	5,57 ±1,14	4,84 ±1,54	4,41 ±0,69
Bolores (log UFC/g)	0,00aA ±0,00	1,73b ±2,08	0,45ab ±1,27	1,36ab ±1,80	2,12B ±1,96	0,54 ±1,21	0,54 ±1,21	0,76 ±1,39
Leveduras (log UFC/g)	4,49 ±0,23	4,23 ±0,46	5,64A ±0,80	5,05A ±1,31	4,92 ±0,05	5,31 ±0,43	3,98B ±0,86	3,68B ±0,59
Lactobacillus spp. (log UFC/g)	5,07a ±0,28	4,94a ±0,78	7,85bA ±0,15	7,82bA ±0,70	5,59 ±0,64	5,23 ±0,66	6,24B ±0,78	6,32B ±0,51
Bactérias ácido lácticas (log UFC/g)	4,96a ±0,14	5,06a ±0,78	7,87bA ±0,24	7,68bA ±0,70	5,42 ±0,70	5,68 ±1,09	6,28B ±0,69	6,18B ±0,60
Micrococcaceae (log UFC/g)	5,20 ±0,16	5,71 ±0,23	5,76 ±0,71	5,98 ±0,76	5,66 ±0,35	5,38 ±0,81	5,83 ±0,37	6,12 ±0,58
Esporos de bactérias aeróbias (log n°)	2,35 ±1,22	4,74 ±0,43	4,42 ±0,45	4,23 ±0,92	0,40 ±0,89	2,38 ±0,38	0,86 ±1,18	1,01 ±1,07
Enterobacteriaceae (log UFC/g)	4,96 ±0,66	3,95 ±0,64	1,30 ±1,52	0,14 ±0,53	5,03 ±0,81	4,31 ±0,31	0,52 ±1,16	0,47 ±1,11
Streptococci do grupo D (log UFC/g)	2,98 ±0,35	2,72 ±0,33	1,09 ±1,18	0,82 ±1,02	1,08 ±1,58	1,51 ±1,68	0,72 ±1,05	0,31 ±1,09
Esporos de Clostridia sulfito-redutores▲	1,00 ±0,00	2,00 ±0,89	1,00A ±0,00	1,00 ±0,00	1,20 ±0,45	1,20 ±0,45	2,20B ±0,84	1,33 ±0,65
Bactérias coliformes▲	5,80aA ±0,45	5,33aA ±0,82	3,83bA ±0,98	1,00c ±0,00	4,00aB ±0,00	3,60aB ±0,55	1,60bB ±1,34	1,00b ±0,00
Escherichia coli▲	5,40aA ±0,55	5,17aA ±0,75	2,50b ±1,22	1,00c ±0,00	3,60aB ±0,55	3,40aB ±0,55	1,60b ±1,34	1,00b ±0,00

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes; para a mesma fase e na mesma linha, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

▲Resultados para esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *E. coli*.

Classe 1: < 1 esporo/bactéria g⁻¹

Classe 2: > 1 e < 10 esporos/bactérias g⁻¹

Classe 3: > 10 e < 100 esporos/ bactérias g⁻¹

Classe 4: > 100 e < 1000 esporos/ bactérias g⁻¹

Classe 5: > 1000 e < 10 000 esporos/ bactérias g⁻¹

Classe 6: > 10 000 e < 100 000 esporos/ bactérias g⁻¹

A contagem de microrganismos mesófilos, cuja origem e comportamento das populações nos enchidos é muito heterogénea, por si só não constitui um indicador seguro da contaminação microbiana dos alimentos. Pode incluir microrganismos indesejáveis, capazes de produzir alterações depreciativas nos alimentos e microrganismos responsáveis por toxo-infecções alimentares, juntamente com microrganismos de interesse tecnológico, onde se incluem as bactérias lácticas e bactérias da família *Micrococcaceae*.

Para Lücke (1986) a carne fresca obtida em condições higiénicas contém, geralmente, um teor de microrganismos mesófilos totais na superfície próximo de 4 log ufc/cm². Mano (1997), na superfície do músculo *Longissimus dorsi* de porco encontrou contagens de microrganismos mesófilos totais que variaram entre 3 e 5 log ufc/cm².

Ao trabalhar com enchidos artesanais e industriais da região espanhola de León, San Martín (1993) encontrou, no início do processo, uma população mesófila próxima de 8 log ufc/g nos enchidos industriais e de cerca de 7,5 log ufc/g nos enchidos artesanais. Os produtos industriais tiveram valores máximos de 10 log ufc/g aos 11 dias de cura e nos artesanais registaram-se contagens máximas de 9,3 log ufc/g aos 25 dias de cura. No produto final, com 32 dias de cura, os enchidos industriais tinham uma população mesófila total de 9,2 log ufc/g e os artesanais de 8,2 log ufc/g. O mesmo autor comparou enchidos fumados com não fumados, igualmente procedentes da região de León e concluiu não haver diferenças significativas entre as contagens de microrganismos mesófilos totais num e outro tipo de produtos. Em salsichão espanhol, Rubio (1994) registou, no início do processo, valores entre 6 e 7 log ufc/g. Aos 3 dias de cura, depois de ocorrida a fermentação (nestes sistemas de produção ocorre de forma rápida: 20-28°C de temperatura; 90-95% de humidade relativa; durante 24-48 horas), as contagens de microrganismos mesófilos totais foram de cerca de 8,5 log ufc/g, valores que se mantiveram relativamente constantes até ao final do processo, aos 25 dias de cura.

Para vários autores (López-Lorenzo *et al.*, 1962; San Martín, 1993; Alvarez, 1994; Rubio, 1994; Lizaso *et al.*, 1999; Coppola *et al.*, 2000) a carga inicial de microrganismos mesófilos totais de uma massa destinada à produção de enchidos é próxima de 6-7 log ufc/g. Estes valores aumentariam até próximo de 8-9 log ufc/g, mantendo-se durante algum tempo e decrescendo depois, suavemente, até ao final do processo de cura (Sanz *et al.*, 1988; Selgas *et al.*, 1988; Nychas e Arkoudelos, 1990; Alvarez, 1994; Lizaso *et al.*, 1999; Roig-Sagués *et al.*, 1999; Fernández, 2000).

Valores de microrganismos mesófilos totais para vários tipos de enchidos foram apresentados por diferentes autores (Sesma e Rodríguez, 1976; Mendoza *et al.*, 1983; Gökalp e Ockerman, 1985; Lücke, 1986; Incze, 1987; Sanz *et al.*, 1988; Selgas *et al.*, 1988; Rosário, 1989; Ordóñez *et al.*, 1995; Lizaso *et al.*, 1999; Ordóñez *et al.*, 1999; Patarata, 2002; Elias *et al.*, 2004), exceptuando Sanz *et al.* (1988) e Selgas *et al.* (1988), todos os outros observaram um decréscimo naquele grupo microbiano nos últimos dias do processo de cura, atribuindo estes resultados, fundamentalmente, às variações do pH e da a_w dos enchidos.

Em muitos trabalhos, as contagens de bactérias lácticas foram praticamente idênticas às de microrganismos mesófilos totais, indicando que estes microrganismos eram constituídos quase exclusivamente por bactérias lácticas (Selgas, 1985; Rubio, 1994; Ordóñez *et al.*, 1999; Coppola *et al.*, 2000; Fernández, 2000; Pexara *et al.*, 2002).

A interpretação do termo psicrotrófico nem sempre é unânime, contudo o critério mais adoptado, e aquele que nós seguimos, é o apresentado por Kraft e Rey (1979), que considera psicrotróficos os microrganismos que, apesar de terem temperaturas óptimas de

crescimento semelhantes às dos microrganismos mesófilos, formam colónias visíveis a temperaturas compreendidas entre 0 e 10°C em 7 – 10 dias.

Os géneros de bactérias psicrotróficas mais frequentemente implicados na alteração da carne fresca são *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* e *Aeromonas*. Também podem encontrar-se espécies anaeróbias facultativas como *Shewanella putrefaciens* (Gill e Newton, 1978; Buchanan e Palumbo, 1985; Frazier e Westhoff, 1993) e microrganismos Gram-positivos como bactérias lácticas e *Brochothrix thermosphacta* (Dainty e Hibbard, 1980; Borch *et al.*, 1996; Björkroth e Korkeala, 1997; Mano, 1997). Vários autores (Ingram e Simonsen, 1980; Lücke, 1985; San Martín, 1993; Sanz *et al.*, 1997; Lizaso, *et al.*, 1999; Castaño *et al.*, 2002) consideram que a microbiota da carne fresca armazenada sob refrigeração, em condições de aerobiose, é formada, principalmente, por bacilos Gram-negativos, oxidase positivos e psicrotróficos, maioritariamente *Pseudomonas* e *Flavobacterium*. Microrganismos como *Acinetobacter*, enterobactérias psicrotróficas, lactobacilos, micrococáceas e *Brochothrix thermosphacta*, entre outros, existirão também, embora em menor número. O grau de alteração da carne não depende apenas do número de microrganismos presentes mas também do tipo de microrganismos e da sua capacidade para, a partir de substratos como a glucose, o ácido láctico ou aminoácidos, produzirem compostos odoríferos como ácido sulfídrico, aminas voláteis, ésteres, acetoína e compostos amoniacais, entre outros. Para que o desagradável aroma destas substâncias se detecte é necessário que os microrganismos que as produzem existam em número próximo de 7 log ufc/g. No nosso trabalho a média mais elevada de microrganismos psicrotróficos totais foi de 6,41 log, correspondendo ao início do processo (fase 1), na fábrica A. Para além destes valores não atingirem os anteriormente referidos, nada indica que os microrganismos por nós contados sejam maioritariamente produtores daquelas substâncias voláteis.

A evolução da microbiota na superfície da carne mantida em refrigeração varia com as condições de armazenamento. No entanto, por regra geral, as pseudomonas começam a predominar a partir dos 4 dias e ao termo de 7 dias, sob refrigeração, aqueles microrganismos podem representar 95%, ou mesmo mais, de toda a população microbiana (Gill e Newton, 1977; Dainty *et al.*, 1983; Gill, 1983; Eribo e Jay, 1985; Mano, 1997).

As leveduras aeróbias proliferaram inicialmente na massa de carne, antes do enchimento, e depois na zona superficial do enchido. Contribuem para a lipólise e auxiliam, com a formação de aldeídos de cadeia longa, a gerar aromas. Podem também favorecer a actividade proteolítica e metabolizar parte do lactato (Lücke, 1985; Leistner, 1987; Lizaso *et al.*, 1999; Bover-Cid *et al.*, 2001b).

Ao acompanhar o processo de fabrico de enchidos tradicionais espanhóis, San Martín (1993) encontrou no início do processo contagens de leveduras próximas de 4 log ufc/g. De um modo geral as leveduras multiplicaram-se até à segunda semana de cura, atingindo 5 log ufc/g. A partir da terceira semana de cura as contagens foram diminuindo e ao cabo de 32 dias (produto final), as contagens foram de 1,75 log ufc/g. Ainda a propósito deste estudo, o calibre do enchido afectou significativamente a evolução das leveduras, com valores mais elevados para os enchidos de menor calibre. O uso de fumo não influenciou de modo significativo a evolução destes microrganismos.

Boissonet *et al.* (1994) verificaram que o número de leveduras diminuiu acentuadamente no decurso da cura de salsichões franceses de fabrico artesanal e industrial. Por outro lado, Samelis *et al.* (1994) num trabalho em que pretendiam quantificar e caracterizar as populações micrbianas associadas a um tipo de paio grego, verificaram que a contagem de leveduras se manteve abaixo de 6 log ufc/g ao longo de todo o processo. Trabalhos efectuados por Buzzini e Haznedari (1995), com enchidos acabados,

produzidos na região italiana da Umbria, revelaram um espectro quantitativo variável entre 2 e 4 log ufc/g, em função dos diferentes tipos de enchidos analisados.

Dias (2000) caracterizou a microbiota de dois enchidos tradicionais alentejanos, o chouriço de carne e a morcela, produzidos por dois fabricantes ao longo de três fases de fabrico: pré-enchimento; fase intermédia da cura e produto final. Não registou a presença de bolores, o que atribuiu ao reduzido teor de oxigénio no interior das massas. As contagens de leveduras variaram entre 2 e 5 log ufc/g, encontrando-se na morcela os valores mais elevados, na fase de pré-enchimento, e os mais baixos, no produto final. No chouriço de carne, as contagens decresceram muito ligeiramente ao longo da cura, com teores que variaram entre 3,80 e 2,50 log ufc/g. As espécies de leveduras predominantes neste trabalho foram *Candida zeylanoides* (38%), *Candida famata* (27%), espécies do género *Rhodotorula* spp. (11%) e *Candida intermedia* (5%).

Ao estudar um tipo de chouriço espanhol, Fernández (2000) encontrou contagens de leveduras de 4 log ufc/g no início do processo, valores que foram baixando até 3 unidades logarítmicas ufc/g no fim da cura, ao 23º dia. Aquele autor, tal como Geisen (1992), entendem que este decréscimo é esperado considerando que se trata de uma microbiota principalmente aeróbia e que ao longo da cura cada vez é menor o teor de oxigénio que permanece no interior das massas dos enchidos. Tal situação não significa que aquela microbiota chegue a desaparecer. Com efeito, provavelmente o número de leveduras, e também de bolores, estabilizar-se-ia quando todas as células estivessem na forma esporulada. Samelis *et al.* (1998) estudaram a microbiologia do salame tradicional grego e encontraram um aumento não significativo na população de leveduras durante o período de cura, com contagens no produto curado inferiores a 5 log ufc/g.

Os microrganismos com interesse tecnológico (*Lactobacillus* spp., bactérias ácido lácticas e *Micrococcaceae*) apresentam uma tendência para se multiplicarem desde o início até ao fim do processo de fabrico. Esta microbiota tem um papel decisivo no desenvolvimento das fermentações que caracterizam estes enchidos e os resultados obtidos no nosso trabalho revelam uma boa adaptação desta microbiota autóctone, tanto aos substratos que utilizam como às condições ambientais que lhes proporcionam as matrizes de fabrico adoptadas.

Aqueles microrganismos, juntamente com as leveduras, poderão ser os responsáveis pelas variações relativamente pequenas nas contagens de microrganismos mesófilos totais, desde o início até final do processo.

Lactobacillus e *Pediococcus* são os principais géneros de microrganismos fermentativos da microbiota dos enchidos; fermentam os glúcidos pela via Embden-Meyerhoff (Kandler, 1983; Garvie, 1984; Tetlow e Hoover, 1988; Bredholt *et al.*, 2001), produzindo maioritariamente ácido láctico a partir do piruvato. As micrococáceas utilizam também esta via, contudo no caso destes microrganismos o piruvato é incluído no ciclo de Krebs (Strasters e Winckler, 1963; Blumental, 1972; Alvarez, 1994; Garcia-Varona, 2000).

Vários autores consideram que os lactobacilos homofermentativos constituem a população dominante ao longo da cura dos enchidos (Coretti, 1958; Hoffman e Scharner, 1980; Sanz *et al.*, 1988; Rubio, 1994; Gimeno *et al.*, 2000; Lemay *et al.*, 2000; Messi *et al.*, 2001; Mataragas *et al.*, 2003), devido principalmente ao seu efeito inibidor sobre outras bactérias. No nosso trabalho, indiscutivelmente, a população de *Lactobacillus* spp. e de bactérias ácido lácticas foi dominante ao longo de todo o processo de fabrico do paio de porco Alentejano.

San Martín (1993) refere que os diferentes fenómenos que sofrem as proteínas musculares durante o processo de cura dos enchidos (desnaturação, desidratação,

proteólise, entre outros) dependem de factores como o pH, temperatura, teor de cloreto, a_w e a actividade dos microrganismos. De entre estes o autor destaca as bactérias ácido lácticas que, mediante a produção de ácido, participam na coagulação das proteínas, influenciando a consistência do produto.

San Martín (1993), ao trabalhar com vários enchidos produzidos na região de León (Espanha), encontrou no início do processo valores médios para as contagens de bactérias ácido lácticas de 6,58 log UFC/g. Estes valores foram subindo progressivamente ao longo da cura, até 9,14 log UFC/g aos 25 dias de cura, decrescendo as contagens para 8,85 log UFC/g aos 32 dias de cura. Valores semelhantes, e com evolução também semelhante, foram encontrados por Alvarez (1994) quando estudou um tipo de salsichão espanhol. Ao comparar produtos fumados com não fumados, San Martín (1993) não encontrou diferenças significativas entre as contagens de bactérias ácido lácticas.

Rubio (1994), também em salsichão espanhol, encontrou no início do processo de fabrico valores de bactérias lácticas que variaram entre 2 e 6 log UFC/g. Aos 3 dias de cura, após a fermentação, registaram valores de cerca de 8,5 log UFC/g, que de um modo geral se mantiveram até ao final do processo de cura. Valores próximos a estes foram encontrados por Samelis *et al.* (1998), quando estudou a evolução da população microbiana ao longo da cura do salame tradicional grego.

Patarata (2002), a partir de amostras de vários enchidos tradicionais dos distritos de Bragança e Vila Real, recolhidas em diferentes fases de fabrico, encontrou contagens em meio MRS de cerca de 9 log UFC/g, valores um pouco superiores aos obtidos por nós mas dentro dos limites habitualmente observados em enchidos fermentados (Lücke, 1985; Demeyer *et al.*, 2000; Gasparik – Reichardt *et al.*, 2004; Kröckel, 2004) e outros produtos cárneos (Qvist e Liberski, 1986; Borch *et al.*, 1996; Holley, 1997).

Contagens de bactérias ácido lácticas semelhantes às obtidas por nós, principalmente a partir dos paios da fábrica A, foram registadas por Patarata (2002) quando analisou linguiça tradicional transmontana com 30 dias de cura, produzida com carne e gordura de animais da raça Bísara. Valores ligeiramente superiores a 8 log UFC/g, tanto para *Lactobacillus* spp. como para bactérias ácido lácticas, foram obtidos por Elias *et al.* (2003) quando analisaram paios curados idênticos aos estudados neste trabalho.

As bactérias da família *Micrococcaceae* presentes nos enchidos pertencem aos géneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*. De um modo geral, os primeiros crescem melhor em anaerobiose, razão pela qual são mais abundantes que *Micrococcus* nos enchidos (Fischer e Schleifer, 1980; Rubio, 1994; Garcia-Varona, 2000).

A evolução da população de *Micrococcaceae* ao longo da cura dos enchidos não é geradora de consensos. Com efeito, uns autores observaram um aumento progressivo das contagens até se atingir uma estabilização (Smith e Palumbo, 1973; Palumbo e Smith, 1976; Selgas, 1985). Outros autores (Sesma e Rodriguez, 1976; Mendoza *et al.*, 1983; Roig-Sagués *et al.*, 1999) detectaram um aumento significativo daqueles microrganismos nos primeiros tempos de fabrico, seguido de um decréscimo continuado ao longo da cura. Por outro lado, Fernández (2000) obteve em enchidos, ao longo da cura, contagens de micrococáceas sempre decrescentes, desde o início do processo e há outros autores (Parejo *et al.*, 1979; Selgas, 1985; Samelis *et al.*, 1998) que observaram taxas similares durante todo o processo de cura.

Durante a fase de fermentação as micrococáceas experimentam um incremento prévio ao que se produz nos lactobacilos (Rozier, 1969; Burgos, 1981; Selgas *et al.*, 1988; Alvarez, 1994; Sanz *et al.*, 1997), mantendo-se, ou por vezes descendo, estes valores no decurso da cura (DeKeteleare *et al.*, 1974; Sanz *et al.*, 1997). Somente no caso de enchidos

preparados com muitos nitratos e poucos hidratos de carbono estes microrganismos podem chegar a ser a microbiota maioritária (Ayroulet e Fournaud, 1976; Sarra *et al.*, 1982), o que se deve ao facto de não serem capazes de se desenvolver em meios com baixos valores de pH, como os que se atingem, após a fermentação, em enchidos aos quais normalmente se adicionam hidratos de carbono (Lücke, 1984).

Os resultados que registámos no nosso trabalho para as contagens de *Micrococcaceae* estão de acordo com as ideias defendidas no parágrafo anterior, embora se tenha verificado uma tendência para os valores destes microrganismos aumentarem ao longo da cura. Este crescimento terá resultado do facto do pH dos paioas não ter sido muito baixo, uma vez que não houve adição de açúcares às massas.

Há uma importante associação de algumas espécies de *Staphylococcus* (família *Micrococcaceae*) à pele dos humanos e dos animais de interesse zootécnico, designadamente *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. conhi*, *S. ciuri* e *S. xylosus* (Schleifer e Kloos, 1975; Frazier e Westhoff, 1993), o que justifica a sua ocorrência habitual em enchidos e em outros produtos alimentares.

A origem de estirpes da família *Micrococcaceae* em enchidos não inoculados poderá não ser somente devida ao homem ou aos animais. Com efeito, o sal, principalmente de origem marinha, pode contaminar os enchidos com elementos daquela família, como verificaram Cordero e Zumalacarregui (2002).

As contagens de *Micrococcaceae*, que no início do processo de fabrico eram muito semelhantes às de *Lactobacillus* spp., nas fases 3 e 4 foram inferiores, particularmente na fábrica A. Esta diferença poderá dever-se ao carácter preferencialmente aeróbio de *Micrococcaceae* e também à acção competitiva com a microbiota láctica que pode comprometer o seu desenvolvimento, uma vez que as bactérias lácticas, por serem microaerófilas, encontram no interior do enchido condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

Vários autores (Obradovic *et al.*, 1989; Lizaso *et al.*, 1999; Patarata, 2002) observaram um decréscimo no número de ufc/g de *Micrococcaceae* durante o período de maturação das massas a baixa temperatura, situação não confirmada por nós.

Selgas (1985) estudou dois tipos de paio espanhol ao longo de 40 dias de cura e obteve contagens de micrococáceas relativamente constantes ao longo de todo o processo, com valores próximos de 5 log ufc/g.

San Martín (1993), em paioas artesanais espanhóis, não fumados, fabricados na região de León, encontrou uma população máxima de *Micrococcaceae* de 6,3 e 6,2 log ufc/g, respectivamente no 3º e 11º dias de cura. Neste mesmo trabalho, paioas submetidos a fumagem tiveram a sua população de *Micrococcaceae* reduzida durante aquele processo, que decorreu entre o 3º e o 11º dias de cura, de 5,6 para 5,0 log ufc/g e alcançaram as contagens mais elevadas aos 18 dias de cura (6,4 log ufc/g), antes que o pH do enchido fosse inferior a 5,0.

Ao estudar enchidos tradicionais dos distritos de Braçança e Vila Real, em diferentes fases de fabrico, Patarata (2002) obteve contagens de *Micrococcaceae* entre 3 e 6 log ufc/g. Valores parecidos com os nossos e com os observados por Coppola *et al.* (1997) em enchidos italianos e por Samelis *et al.* (1998) em enchidos gregos.

Em linguiça tradicional transmontana, Patarata (2002) obteve contagens de *Micrococcaceae* decrescentes ao longo das fases de fabrico atingindo o valor de 0,00 log ufc/g no fim do processo, decorridos 30 dias de cura.

No nosso trabalho, verificou-se um acréscimo entre as fases 1 e 2, especialmente na fábrica A, de bolores, esporos de bactérias aeróbias e de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores. Deste modo, levanta-se a hipótese daquele aumento poder resultar de microrganismos veiculados às massas de carne através da adição de condimentos (embora os resultados das análises feitas às matérias-primas subsidiárias para aqueles três grupos de microrganismos, apresentados no capítulo 10, apenas mereçam destaque as contagens de esporos de bactérias aeróbias, com valores próximos de 3 log ufc/g) ou do contacto das massas de carne com equipamento contaminado.

Num trabalho em que acompanhou a evolução da cura do salame tradicional grego Samelis *et al.* (1998) recolheram amostras aos 0, 7 e 28 dias de cura para análise de esporos de *Clostridia* sulfito redutores e obtiveram resultados sempre inferiores a 1 log nº de esporos/g.

No âmbito de um trabalho já referido neste capítulo, San Martín (1993) encontrou em enchidos tradicionais espanhóis, no início do processo, contagens de esporos de bactérias aeróbias entre 5,73 e 7,12 log nº de esporos/g. Tal como nós, este autor verificou um incremento do número de esporos durante o período de maturação das massas. Ainda a propósito do trabalho de San Martín (1993), as contagens de esporos de bactérias aeróbias no produto final (cerca de 7,5 log nº de esporos/g) foi superior à registada no início do processo. Não foram encontradas diferenças significativas quando o autor comparou enchidos fumados com outros não fumados.

As contagens de bolores, esporos de bactérias aeróbias, *Streptococci* do grupo D e esporos de *Clostridia* sulfito redutores que nós obtivemos são comuns em enchidos tradicionais alentejanos, como o comprovam outros trabalhos já realizados (Chouriço, 1999; Silvano, 1999; Barbosa, 2000; Ferreira, 2000; Serrano, 2003).

Os valores de *Enterobacteriaceae*, bactérias coliformes e *Escherichia coli*, particularmente estes dois últimos, registados no início do processo (fase 1) põem em evidencia as deficientes condições de higiene das massas de carne, principalmente na fábrica A. Para alguns autores (Palumbo, 1986; Varnam e Evans, 1991; Brody, 1996), *E. coli* enterotoxigénica cresce e produz toxina a 4°C, enquanto outros consideram que a sua multiplicação começa a 7°C (Mead *et al.*, 1996). Para Buchanan e Doyle (1997) e Bredholt *et al.* (1999) *E. coli* O157:H7 é capaz de crescer a temperaturas ≤ 10°C. Não obstante, os processos de fabrico utilizados são eficazes na redução daqueles microrganismos para valores compatíveis com a sua utilização na alimentação humana. O decréscimo significativo dos teores de bactérias coliformes e de *E. coli* ao longo da cura dos enchidos de cura prolongada é uma constante em todos os trabalhos consultados, com resultados inferiores ao limiar de detecção dos métodos utilizados em vários deles (Rosário, 1989; Chouriço, 1999; Silvano, 1999; Barbosa, 2000; Ferreira, 2000; Serrano, 2003).

Contagens iniciais de *Enterobacteriaceae* compreendidas entre 3 e 6 log ufc/g foram observadas em vários tipos de enchidos fermentados no início do processo de fabrico (Mendoza *et al.*, 1983; Domínguez *et al.*, 1989; San Matín, 1993; Fontan *et al.*, 1998; Samelis *et al.*, 1998; Ayhan *et al.*, 1999; Lizaso *et al.*, 1999; Castaño *et al.*, 2002). Mano (1997) encontrou, no músculo *Longissimus dorsi* retirado de carcaças de animais abatidos no dia anterior, valores de *Enterobacteriaceae* entre 1 log ufc/cm² e 3,4 log ufc/cm². No nosso trabalho, este grupo de microrganismos decresceu sempre ao longo do processo de fabrico; com valores já muito reduzidos na fase 3 (meio da cura) e estando praticamente ausentes no produto final. Esta redução é característica nos enchidos fermentados e foi observada por vários autores (San Martín, 1993; Diaferia *et al.*, 1995; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 1998; Roig *et al.*, 1998; Samelis *et al.*, 1998; Lizaso *et al.* (1999); Gimeno *et al.*, 2000; Castaño *et al.*, 2002; Patarata, 2002). Provavelmente, o efeito conjunto da ocorrência de

fenómenos competitivos e da redução do pH e da actividade da água conduziram à diminuição desta microbiota Gram-negativa (Incze, 1992; Borch *et al.*, 1996). No entanto Bover-Cid *et al.* (2001b) num enchido espanhol curado durante 21 dias encontraram contagens de *Enterobacteriaceae* relativamente constantes ao longo de todo o processo, com valores próximos de 3 log ufc/g.

San Martín (1993) estudou a evolução de *Enterobacteriaceae* ao longo da cura de enchidos tradicionais espanhóis e encontrou valores significativamente inferiores nos produtos fumados, quando comparados com produtos idênticos que não haviam sido sujeitos a fumagem. No mesmo trabalho, aquele autor encontrou também contagens de *Enterobacteriaceae* significativamente superiores em enchidos de menor calibre, comparativamente a outros de maior calibre. Estes resultados poderão dever-se a práticas de higiene inadequadas e associadas à redução de tamanho das porções de carne que constituem as massas dos enchidos de menor calibre.

Chouriço (1999) estudou a evolução de *Enterobacteriaceae* ao longo da cura de um paio tradicional de porco alentejano, designado por “chouriço grosso”, produzido em 4 fábricas. Encontrou contagens iniciais que variaram entre 2,0 log ufc/g e 5,0 log ufc/g. A meio da cura, em uma das fábricas os resultados foram inferiores ao limiar de detecção do método utilizado e no produto final os resultados foram idênticos para duas fábricas. Nas outras duas fábricas os resultados médios para as contagens de *Enterobacteriaceae* no produto final foram de 1,7 e 3,0 log ufc/g. Serrano (2003) estudou, em cinco produtores, a microbiota do “painho de Portalegre” ao longo cura. Neste enchido de porco Alentejano as contagens de *Enterobacteriaceae* no início do fabrico variaram entre 2,0 e 5,2 log ufc/g. A meio da cura os resultados variaram entre 2,1 e 5,4 log ufc/g e no produto final as médias das contagens variaram entre 1,4 e 6,5 log ufc/g. No produtor em que foi obtido este resultado, houve um acréscimo muito significativo entre as contagens de *Enterobacteriaceae* registadas a meio da cura e as obtidas para o produto final.

12 - Conservação do paio de porco Alentejano

Para o estudo sobre a conservação de paio de porco Alentejano, foram embalados sob vácuo e sob um tipo de atmosfera modificada (20% CO₂, 80% N₂), recomendada por Rönner (1994) para a conservação de enchidos, produtos finais de ambas as fábricas, que se mantiveram à temperatura ambiente durante os 9 meses de duração do ensaio. Com o recurso ao vácuo e a este tipo de atmosfera modificada procurou-se retardar a ocorrência de reacções químicas, enzimáticas ou microbiológicas que alterassem de forma indesejável os enchidos. Foram recolhidas amostras aos 3, 6 e 9 meses de conservação. Deste modo, procurou-se estudar a possibilidade da conservação daqueles enchidos em condições de temperatura extrema, sem recurso à refrigeração e, consequentemente, sem consumo de energia eléctrica.

12.1 – Análises físico-químicas

A análise de variância para os resultados das análises físico-químicas realizadas ao longo do estudo da conservação é apresentada na Quadro 55. Assim, verifica-se que para o factor fábrica, apenas não são encontradas diferenças significativas para o parâmetro de cor L*.

Por outro lado, o modo de conservação (vácuo ou atmosfera modificada) não teve influência em nenhum dos resultados obtidos para aquelas variáveis, já que nenhuma delas apresenta diferenças significativas quando considerado o factor modo de conservação.

Todas as variáveis físico-químicas foram influenciadas pelo tempo de conservação, tendo todas elas apresentado diferenças altamente significativas ($p<0,001$) quando considerado aquele factor.

A interacção fábrica x modo de conservação, apenas foi significativa ($p<0,05$) para a acidez da gordura e para o parâmetro de cor a*. A interacção modo de conservação x tempo de conservação, apenas foi significativa para a variável ABVT.

Deste modo, e como súmula da observação do Quadro 55, poderemos dizer que as variáveis físico-químicas estudadas apresentaram diferenças entre fábricas, não foram influenciadas pelo modo de conservação e variaram de forma altamente significativa ($p<0,001$) com o tempo de conservação.

Pela observação dos valores das médias das variáveis físico-químicas (Quadros 56.1 e 56.2), verifica-se que o pH, nos produtos da fábrica A, sobe entre o início do estudo (tempo 0) e o tempo 3, possivelmente devido à continuação da actividade proteolítica, resultando daí aminoácidos livres com poder tampão. Entre os 3 e os 9 meses de conservação o pH baixa gradualmente, talvez por acção de alguma microbiota láctica que encontra condições favoráveis à sua multiplicação em ambientes de microaerofilia.

Na fábrica B os valores de pH mantiveram-se bastante estáveis, podendo a acção bacteriostática e bactericida do fumo ter alguma relação com estes resultados.

Quadro 55 – Conservação do paio de porco Alentejano: análise de variância para resultados de análises físico-químicas, considerando os factores fábrica (A e B), modo de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e tempo de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

Variáveis	Factores			Interacções		
	Fábrica (1)	Modo Conserv. (2)	Tempo Conserv. (3)	1x2	1x3	2x3
	G.L.=1	G.L.=3	G.L.=3	G.L.=3	G.L.=3	G.L.=9
pH	$F=7,7252$ $p=0,0061^{**}$	$F=1,3559$ $p=0,2460$	$F=7,4273$ $p=0,0001^{***}$	$F=0,0003$ $p=0,9848$	$F=7,4663$ $p=0,0001^{***}$	$F=0,3361$ $p=0,7992$
a_w	$F=5,2418$ $p=0,0234^{*}$	$F=0,0128$ $p=0,9101$	$F=11,9029$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,0026$ $p=0,9598$	$F=0,4999$ $p=0,6829$	$F=0,8109$ $p=0,4896$
Teor de cloretos	$F=332,8525$ $p=0,0,0000^{***}$	$F=2,7245$ $p=0,1015$	$F=13,8864$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,1173$ $p=0,7326$	$F=2,1575$ $p=0,0967$	$F=1,1291$ $p=0,3402$
ABVT	$F=66,67$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,6157$ $p=0,4345$	$F=66,5005$ $p=0,0000^{***}$	$F=2,1203$ $p=0,1484$	$F=7,600$ $p=0,0001^{***}$	$F=8,8859$ $p=0,0000^{***}$
Acidez da gordura	$F=141,0506$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,0000$ $p=0,9976$	$F=306,9133$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,1889$ $p=0,6649$	$F=41,6627$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,2167$ $p=0,8846$
L*	$F=0,0065$ $p=0,9359$	$F=1,1116$ $p=0,2937$	$F=21,0005$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,1584$ $p=0,6913$	$F=1,5368$ $p=0,2082$	$F=0,4816$ $p=0,6957$
a*	$F=21,6796$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,0395$ $p=0,8427$	$F=16,2287$ $p=0,0000^{***}$	$F=4,3022$ $p=0,0401^{*}$	$F=2,6683$ $p=0,0504$	$F=0,4303$ $p=0,7316$
b*	$F=29,2527$ $p=0,0000^{***}$	$F=0,3193$ $p=0,5730$	$F=21,2247$ $p=0,0000^{***}$	$F=1,5537$ $p=0,2149$	$F=5,6504$ $p=0,0011^{**}$	$F=0,2067$ $p=0,8916$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade; Modo Conserv. – Modo de conservação; Tempo Conserv. – Tempo de conservação.

Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

A actividade da água decresce ao longo do tempo de conservação. Com efeito, a película multicamada da embalagem utilizada, tem alguma permeabilidade ao vapor de água, permitindo que o produto continue a desidratar, embora lentamente. Rosário (1989) registou um valor de a_w de 0,82 quando embalou salpicão tradicional de Vila Real sob vácuo. Aos 15 dias de conservação os valores subiram para 0,90 e aos 150 dias os valores registados foram de 0,87. Elias e Carrascosa (2000) estudaram a conservação sob vácuo de porções de presunto de porco Alentejano. Na altura em que os presuntos, com 12 meses de cura, foram embalados tinham um valor de a_w de 0,839. Aos 2, 5 e 8 meses de conservação à temperatura de 6 - 7°C, os valores registados foram, respectivamente, 0,914; 0,894 e 0,892. Também neste estudo foi evidente a subida dos valores da a_w entre o momento da embalagem e as primeiras medições efectuadas após esta operação. Entre outras possíveis razões, a permeabilidade da película que serviu de embalagem, a acção microbiana e a ocorrência de fenómenos proteolíticos poderão ter tido influência naqueles resultados. Rubio *et al.* (2004) estudaram a conservação da “cecina de Leon” (carne de vaca salgada, desidratada e fumada), embalada sob vácuo e sob um tipo de atmosfera modificada (20% CO₂; 80% N₂), mantida a 6°C até aos 210 dias. Os valores de pH e de a_w mantiveram-se relativamente constantes durante o estudo, não tendo sido encontradas diferenças para estes parâmetros entre as amostras conservadas sob vácuo e sob atmosfera modificada. Os valores registados variaram entre 5,8 e 6,1, para o pH, e 0,878 e 0,903, para a a_w , valores estes típicos dos alimentos de humidade intermédia.

Quadro 56.1 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados de análises físico-químicas considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	pH	a_w	Cloreto (%NaCl)	ABVT (mgNH ₃ /100g produto)
Fábrica A	Vácuo	0 m	5,43 ±0,43	0,820 ±0,063	5,02 ±0,41	101,23 ±6,81
		3 m	5,84 ±0,25	0,777 ±0,073	4,83 ±0,44	176,35 ±9,79
		6 m	5,76 ±0,04	0,783 ±0,015	4,63 ±0,13	237,20 ±9,13
		9 m	5,27 ±0,08	0,725 ±0,024	4,21 ±0,07	203,60 ±4,72
	Atmosfera Modificada	0 m	5,43 ±0,43	0,820 ±0,063	5,02 ±0,41	101,23 ±6,81
		3 m	5,91 ±0,24	0,786 ±0,058	4,51 ±0,41	195,55 ±18,02
		6 m	5,67 ±0,14	0,758 ±0,038	4,24 ±0,14	158,63 ±6,16
		9 m	5,50 ±0,22	0,738 ±0,041	4,41 ±0,18	219,47 ±18,93
	Vácuo	0 m	5,76 ±0,26	0,828 ±0,068	5,97 ±0,49	97,25 ±19,32
		3 m	5,70 ±0,17	0,803 ±0,076	5,81 ±0,01	140,10 ±49,96
		6 m	5,64 ±0,13	0,803 ±0,046	5,72 ±0,29	139,14 ±34,49
		9 m	5,70 ±0,09	0,762 ±0,039	5,80 ±0,04	155,10 ±22,23
Fábrica B	Atmosfera Modificada	0 m	5,76 ±0,26	0,828 ±0,068	5,97 ±0,49	97,25 ±19,32
		3 m	5,80 ±0,19	0,814 ±0,031	5,81 ±0,01	133,97 ±35,84
		6 m	5,78 ±0,14	0,771 ±0,033	5,57 ±0,53	128,51 ±30,94
		9 m	5,67 ±0,10	0,777 ±0,044	5,62 ±0,28	184,90 ±35,43

Quadro 56.2 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados de análises físico-químicas considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	Acidez da gordura (%ácido oleico na gordura do produto)			
				L*	a*	b*
Fábrica A	Vácuo	0 m	6,55 ±1,02	40,42 ±4,21	17,81 ±5,11	13,77 ±5,91
		3 m	14,35 ±0,40	39,19 ±7,54	15,29 ±5,78	14,21 ±9,57
		6 m	23,30 ±1,79	46,40 ±1,79	14,77 ±1,73	12,29 ±0,60
		9 m	41,67 ±4,93	51,72 ±1,97	25,78 ±0,45	31,53 ±1,29
	Atmosfera Modificada	0 m	6,55 ±1,02	40,42 ±4,21	17,81 ±5,11	13,77 ±5,91
		3 m	14,65 ±0,94	42,31 ±8,12	17,02 ±3,32	14,90 ±4,55
		6 m	22,60 ±0,89	48,87 ±3,72	20,62 ±1,69	22,83 ±1,21
		9 m	41,00 ±4,73	48,86 ±1,88	24,22 ±2,32	27,90 ±4,46
Fábrica B	Vácuo	0 m	5,64 ±1,67	43,12 ±6,53	16,39 ±3,97	12,83 ±7,68
		3 m	10,37 ±0,54	37,10 ±3,19	15,47 ±2,91	10,08 ±3,16
		6 m	16,93 ±5,66	49,68 ±8,55	17,41 ±2,85	17,38 ±7,30
		9 m	22,50 ±4,88	45,83 ±5,34	17,52 ±2,97	14,07 ±3,94
	Atmosfera Modificada	0 m	5,64 ±1,67	43,12 ±6,53	16,39 ±3,97	12,83 ±7,68
		3 m	11,57 ±0,63	39,14 ±8,34	11,78 ±3,16	8,48 ±3,76
		6 m	17,54 ±4,09	46,78 ±7,16	13,98 ±2,60	9,79 ±0,98
		9 m	21,77 ±3,37	52,77 ±2,82	19,68 ±1,45	20,40 ±3,91

O teor de cloretos apresenta tendência para baixar ao longo do tempo de conservação. Rosário (1989) ao trabalhar com salpicão tradicional de Vila Real encontrou também um decréscimo no teor de cloretos quando embalou sob vácuo salpicões com 56 dias de cura e os analisou aos 15 e 150 dias de conservação.

A distribuição salina depende do teor de humidade da carne e ocorre por difusão, capilaridade e osmose, associados a fenómenos de transporte de líquidos e modificações em proteínas (Carrascosa e Cornejo, 1989). Assim, colocamos a hipótese de ter ocorrido perda de água dos paiois, durante a sua conservação, que se acumulou parcialmente entre o produto e a película usada como embalagem o que terá resultado no transporte de parte de NaCl para o exterior do produto.

No nosso trabalho, os teores de azoto básico volátil total foram tendencialmente subindo ao longo do tempo de conservação sugerindo que a actividade proteolítica persistiu. O envolvimento de enzimas peptidásicas de origem bacteriana, como demonstraram Fadda *et al.* (1999), para *Lactobacillus* spp., e Selgas *et al.* (1993) e Bover-Cid *et al.* (1999a,b), para *Micrococcaceae*, pode estar associado a teores mais elevados de azoto não proteico (Patarata, 2002). Com efeito, os valores de ABVT são uma consequência directa dos teores de azoto não proteico, na medida em que o catabolismo dos aminoácidos é tanto mais facilitado quanto maior for a hidrólise prévia das proteínas (Verplaetse *et al.*, 1992) ou estar associado a uma maior actividade catabólica bacteriana, para obtenção de energia, dada a escassez de glúcidios nestes produtos (Christensen *et al.*, 1999). Esta actividade enzimática será tanto mais elevada quanto maior for o pH do meio, uma vez que tem o seu óptimo a valores de pH neutro (Montel *et al.*, 1995).

Em trabalhos realizados com o salsichão de Vichy, Ferrer e Arboix (1986) obtiveram valores de ABVT de 99 mg NH₃/100 g de produto, aos 2 meses de cura, e de 303 mg NH₃/100 g de produto, aos 12 meses de cura.

Num trabalho já citado neste capítulo sobre presunto de porco Alentejano conservado sob vácuo e mantido em refrigeração, Elias (1993) obteve teores de ABVT de 205,67 mg NH₃/100 g no momento em que embalou as amostras. O teor de ABVT após 2 meses de conservação foi de 128,22 mg NH₃/100 g. Os valores subiram para 165,56 mg NH₃/100g decorridos 5 meses de conservação e para 183,95 mg NH₃/100 g no final do estudo, quando foram concluídos 8 meses de conservação.

Cilla *et al.* (2004) realizaram um trabalho que relacionou a aceitabilidade com a conservação de presunto inteiro à temperatura ambiente, foi demonstrado que a aceitabilidade daquele produto por um painel de provadores diminuiu de modo significativo entre os 22 e os 26 meses de maturação. Os autores atribuíram aqueles resultados a um aumento da adesividade do presunto, medidos tanto de forma sensorial como instrumental. Por sua vez estas alterações nas propriedades físicas do presunto resultaram, segundo os autores, de um excesso de proteólise, medido através dos teores de azoto não proteico.

A acidez da gordura é um indicador do grau de lipólise. No nosso estudo a acidez da gordura aumentou sempre com o tempo de conservação. Deste modo, supõe-se que, apesar das condições de microaerofilia, ou mesmo ausência de oxigénio, em que decorreu este estudo, a actividade lipolítica perdurou durante todo o período de conservação, embora de modo mais intenso nos paiois da fábrica A.

No presente trabalho encontrámos no produto final, antes de ser embalado (tempo 0), valores para a acidez da gordura de 6,55 e 5,64 % de ácido oleico, respectivamente para os paiois da fábrica A e da fábrica B. Para linguiça tradicional transmontana Patarata (2002) refere valores próximos de 4% de ácido oleico na gordura. Para enchidos fermentados

existem várias referências a valores próximos aos que nós obtivémos (Lois *et al.*, 1987; Fernandez e Rodriguez, 1991; Johansson *et al.*, 1994; Rubio, 1994; Quintanilla *et al.*, 1996).

De entre os microrganismos que estudámos a partir dos paios de porco Alentejano, provavelmente as leveduras e *Micrococcaceae* serão os grupos com maior actividade lipolítica. Porém, as primeiras diminuíram bastante ao longo do tempo de conservação e as segundas existiram em maior número nos paios da fábrica B, onde os valores da acidez da gordura foram menores. Até porque o relativamente baixo pH dos paios não será muito favorável à actividade das enzimas eventualmente produzidas pelas *Micrococcaceae* (Rubio, 1994; Talon *et al.*, 1995; Sorensen, 1997; Rosenstein e Gotz, 2000). Contudo, não descartamos a possibilidade de, na fábrica A, a população de *Enterobacteriaceae* que foi detectada na fase 4 (produto final) ter tido alguma relação com o acréscimo da acidez da gordura verificado naquela fábrica entre as fases 3 (meio da cura) e 4.

Deste modo, admitimos que o aumento progressivo da lipólise ao longo da conservação dos paios se deveu essencialmente a enzimas endógenas da carne, nomeadamente à lipase ácida, que encontra condições favoráveis à sua actividade no intervalo de pH encontrado na generalidade dos enchidos fermentados (Ordoñez, 1999).

Apesar de se associar a acção microbiana sobre os lípidos a fenómenos de hidrólise enzimática, fundamentalmente, Talon *et al.* (2000) demonstraram que algumas estirpes de *Staphylococcus* spp., nomeadamente *S. xylosus* e *S. carnosus*, poderiam contribuir para a inibição da oxidação de ácidos gordos insaturados.

Os parâmetros de cor L*, a* e b* revelaram uma tendência para aumentar durante o período de conservação. Durante este período houve perda da tonalidade vermelho carregado que caracteriza os produtos curados, o que terá levado ao aumento dos valores tanto de L* como de a*. A subida nos valores de b* ao longo do tempo resultam do amarelecimento da gordura, consequência dos processos oxidativos.

Elias e Carrascosa (2000) embalaram sob vácuo porções de presunto de porco Alentejano e fizeram a medição da cor da carne em superfícies de corte que criaram no momento em que procederam às medições. Os valores que obtiveram para os parâmetros L*, a* e b* no início do estudo, antes da embalagem, foram, respectivamente, 39,9; 12,0 e 4,2. Ao cabo de 8 meses de conservação sob refrigeração (6 -7°C) registaram 41,5; 10,0 e 5,4, respectivamente para L*, a* e b*.

No trabalho também já referido neste capítulo, sobre “cecina de Leon” conservada sob vácuo e sob um tipo de atmosfera modificada (20% CO₂; 80% N₂), Rubio *et al.* (2004) não encontraram diferenças significativas nem entre as modalidades de conservação (vácuo e atmosfera modificada) nem ao longo dos 210 dias de conservação para os parâmetros de cor L* e b*. Por outro lado, o parâmetro de cor a*, usado como indicador da estabilidade da cor, tanto da carne como dos seus produtos transformados, mostrou alterações indesejáveis a partir dos 15 dias, para as amostras conservadas sob vácuo, e dos 2 meses para as amostras conservadas em atmosfera modificada.

Considerando agora as interacções de 1^a ordem que foram significativas, a Figura 17 apresenta, para a variável pH, o resultado da interacção fábrica x tempo de conservação.

Os valores de pH no início do estudo de conservação (tempo 0) foram significativamente diferentes entre as duas fábricas. Na fábrica A, os valores médios do pH registados aos 3 e 6 meses foram significativamente superiores aos registados aos 9 meses. Contudo não houve diferenças significativas entre os valores de pH obtidos no início (tempo 0) e fim do estudo (9 meses). Na fábrica B não houve diferenças significativas entre os valores obtidos ao longo do estudo.

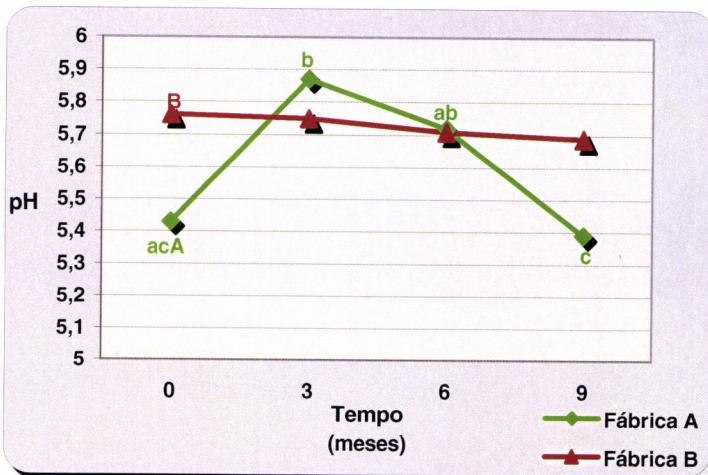


Figura 17 – Conservação de paio de porco Alentejano - pH: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

A Figura 18 mostra que o aumento do ABVT foi significativo em ambas as fábricas, quando comparados os valores iniciais com os obtidos aos 9 meses de conservação, e que o grau de proteólise foi sempre significativamente superior na fábrica A.

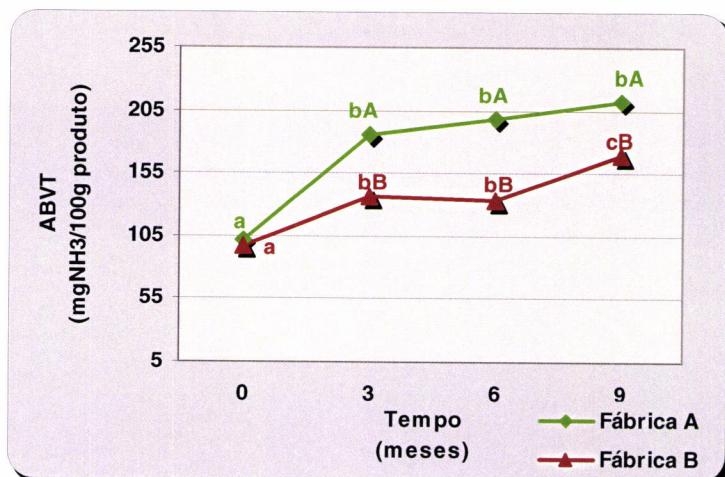


Figura 18 - Conservação de paio de porco Alentejano – azoto básico volátil total (ABVT): representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Ainda acerca da variável ABVT e considerando a interacção modo de conservação x tempo de conservação (Figura 19) verificou-se que apenas aos 6 meses os valores dos produtos conservados sob vácuo foram significativamente superiores aos dos conservados em atmosfera modificada. Constatou-se também através daquela figura que os valores do ABVT, tanto dos enchidos conservados sob vácuo como em atmosfera modificada, aos 3 meses de conservação já eram significativamente superiores aos registados no tempo 0.

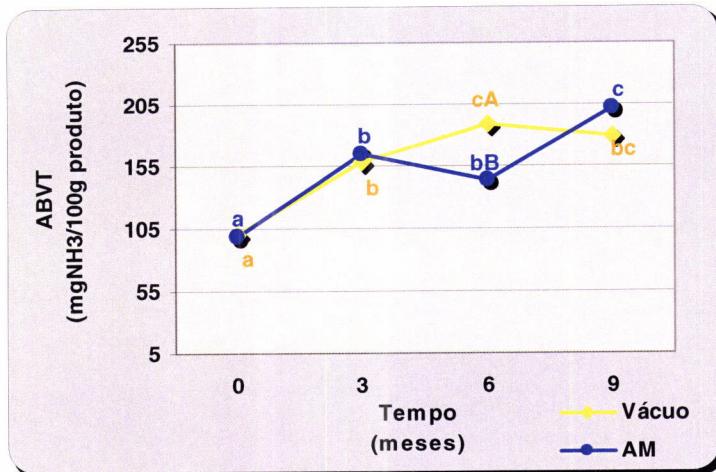


Figura 19 - Conservação de paio de porco Alentejano - azoto básico volátil total (ABVT): representação gráfica da comparação de médias para para a interacção modo de conservação x tempo de conservação.

Nota: para o mesmo modo de conservação, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Por seu lado a acidez da gordura aumentou sempre de forma significativa, em ambas as fábricas, desde o início ao fim do estudo (Figuras 20 e 21). A partir dos 6 meses, inclusive, os enchidos produzidos na fábrica A tiveram uma acidez significativamente superior aos da outra fábrica.

A Figura 21 mostra que nos produtos da fábrica A conservados sob atmosfera modificada o parâmetro de cor a^* teve valores mais elevados que os da mesma fábrica conservados sob vácuo e significativamente mais elevados que os paio produzidos na fábrica B e conservados também em atmosfera modificada.

A propósito do parâmetro de cor b^* (Figura 22), na fábrica A o valor medido no termo do estudo (9 meses) foi significativamente superior ao de todos os outros tempos. Apesar dos valores de b^* serem sempre superiores nos produtos da fábrica A, somente após 9 meses de conservação aqueles valores foram significativamente superiores aos da fábrica B. Os valores superiores do parâmetro de cor b^* nos produtos da fábrica A são explicados pelos valores da acidez, superiores também nos produtos desta fábrica (Figura 20). Com efeito, o maior grau de oxidação da gordura intamuscular dos paio da fábrica A será responsável por maiores colorações amareladas, traduzidas por valores de b^* mais elevados.

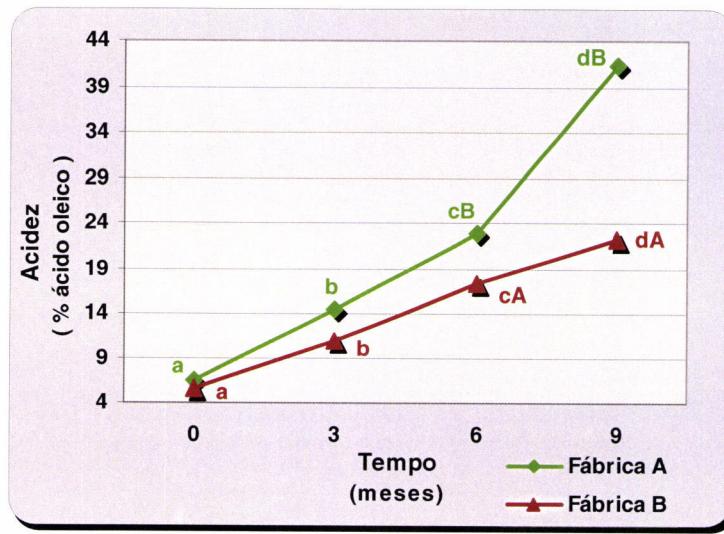


Figura 20 - Conservação de paio de porco Alentejano – Acidez da gordura do produto: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

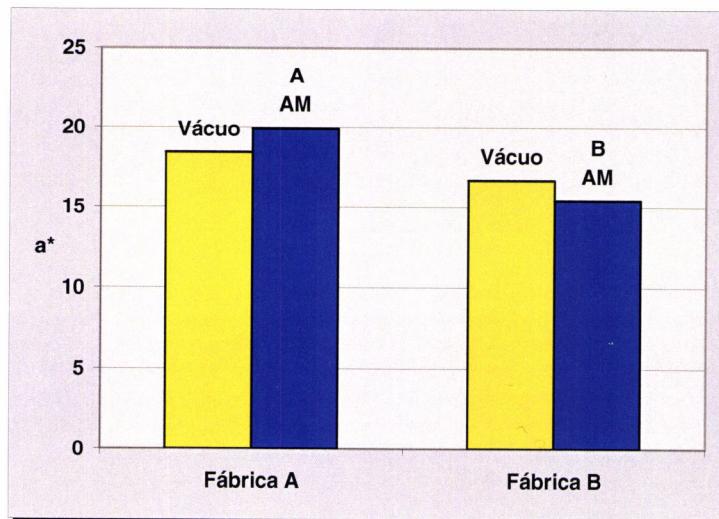


Figura 21 - Conservação de paio de porco Alentejano – parâmetro de cor a^* : representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x modo de conservação.

Nota: para o mesmo modo de conservação, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

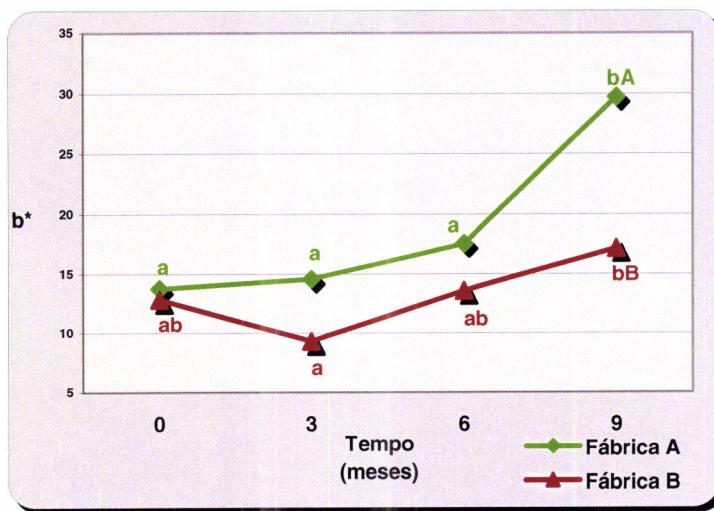


Figura 22 – Conservação de paio de porco Alentejano – parâmetro de cor b^* : representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

12.2 - Perfil de ácidos gordos

Quanto ao estudo da evolução do perfil de ácidos gordos ao longo do período de conservação, a análise de variância apresentada no Quadro 57 esclarece que para o factor fábrica foram encontradas diferenças significativas para os ácidos gordos palmitoleico ($p<0,001$), margaroleico ($p<0,001$), oleico ($p<0,05$) e linolénico ($p<0,05$). Quando considerado o factor modo de conservação apenas os ácidos margárico e esteárico mostraram diferenças significativas ($p<0,05$). A análise do factor tempo de conservação revela haver diferenças significativas para todos os ácidos gordos.

No que concerne à apreciação das interacções, a interacção fábrica x modo de conservação não apresentou qualquer diferença significativa, a interacção fábrica x tempo de conservação só não foi significativa para o ácido láurico e a interacção modo de conservação x tempo de conservação somente foi significativa para os ácidos margárico e esteárico.

Uma vez mais, o factor tempo de conservação mostrou-se como sendo o principal causador da variabilidade encontrada. O modo de conservação, uma vez mais, também foi o factor em que houve menos diferenças significativas, não sendo, por conseguinte, responsável pelas alterações que se verificaram no perfil dos ácidos gordos durante o período de conservação.

Quadro 57 – Conservação do paio de porco Alentejano: análise de variância para resultados do perfil de ácidos gordos, considerando os factores fábrica, modo de conservação e tempo de conservação.

Variáveis	Factores			Interacções		
	Fábrica	Modo Conserv.	Tempo Conserv.	1x2	1x3	2x3
	(1)	(2)	(3)	G.L.=1	G.L.=3	G.L.=3
Láurico (12:0)	F=0,0706 p=0,7910	F=0,5887 p=0,4444	F=5,1544 p=0,0022**	F=1,3608 p=0,2457	F=1,6652 p=0,1781	F=1,3947 p=0,2477
Mirístico (14:0)	F=1,5307 p=0,2184	F=0,0098 p=0,9212	F=7,6029 p=0,0001***	F=0,1252 p=0,7241	F=5,6707 p=0,0011**	F=0,4856 p=0,6929
Palmítico (16:0)	F=3,3814 p=0,0684	F=0,5435 p=0,4624	F=6,8771 p=0,0003***	F=0,6046 p=0,4383	F=12,3312 p=0,0000***	F=0,5645 p=0,6394
Palmitoleico (16:1)	F=24,9511 p=0,0000***	F=0,0479 p=0,8270	F=4,1651 p=0,0076**	F=0,1351 p=0,7138	F=3,1297 p=0,0282*	F=0,4419 p=0,7235
Margárico (17:0)	F=1,5589 p=0,2142	F=6,1768 p=0,0143*	F=5,3143 p=0,0018**	F=0,0071 p=0,9329	F=3,1569 p=0,0273*	F=5,3720 p=0,0017**
Margaroleico (17:1)	F=14,5484 p=0,0002***	F=2,5860 p=0,1104	F=31,0723 p=0,0000***	F=0,8704 p=0,3527	F=12,5424 p=0,0000***	F=1,8535 p=0,1411
Esteárico (18:0)	F=0,0268 p=0,8701	F=5,1781 p=0,0246*	F=5,9686 p=0,0008***	F=1,3002 p=0,2564	F=10,3625 p=0,0000***	F=3,8415 p=0,0114*
Oleico (18:1)	F=4,9629 p=0,0277*	F=1,8951 p=0,1712	F=4,6213 p=0,0043**	F=1,9988 p=0,1600	F=7,5726 p=0,0001***	F=2,4026 p=0,0709
Linoleico (18:2)	F=8,7538 p=0,0037**	F=0,2224 p=0,6381	F=6,1575 p=0,0006***	F=0,4395 p=0,5086	F=7,3985 p=0,0001***	F=0,5827 p=0,6275
Linolénico (18:3)	F=5,7941 p=0,0176*	F=1,4633 p=0,2287	F=15,6535 p=0,0000***	F=0,2024 p=0,6536	F=12,2193 p=0,0000***	F=2,3093 p=0,0798
Gadoleico (20:1)	F=0,1522 p=0,6971	F=0,0025 p=0,9599	F=17,8988 p=0,0000***	F=0,0062 p=0,9376	F=14,1304 p=0,0000***	F=0,9743 p=0,4074
Heneicosenoíco (21:1)	F=0,1287 p=0,7204	F=0,2642 p=0,6082	F=35,6956 p=0,0000***	F=0,1953 p=0,6594	F=24,7885 p=0,0000***	F=0,4757 p=0,6998

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade; Modo Conserv. – Modo de conservação; Tempo Conserv. – Tempo de conservação. Níveis de Significância - *significativo para p<0,05; **significativo para p<0,01; ***significativo para p<0,001.

De um modo geral, os valores dos ácidos gordos mantiveram-se na sua maioria relativamente constantes, na fábrica B, enquanto na fábrica A houve variações mais evidentes (Quadros 58.1, 58.2 e 58.3). Assim, nesta fábrica os ácidos láurico, mirístico, palmítico e palmitoleico, de um modo geral apresentam um decréscimo seguido de uma subida, ao longo do tempo de conservação. Os ácidos margárico, margaroleico e esteárico evidenciam uma tendência para teores mais elevados à medida que aumenta o tempo de conservação. Os teores de ácido oleico subiram desde o tempo 0 ao tempo 6, para depois decrescerem e atingirem valores próximos dos iniciais ao termo de 9 meses de conservação. Ainda em relação aos paios da fábrica A, os teores dos ácidos linoleico,

linolénico, gadoleico e heneicosenóico revelaram uma clara tendência para decrescerem com o tempo de conservação.

Quadro 58.1 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados do perfil de ácidos gordos (% do total de ésteres metílicos identificados), considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	Láurico (12:0)	Mirístico (14:0)	Palmítico (16:0)	Palmitoleico (16:1)
Fábrica A	Vácuo	0 m	0,08 ±0,01	1,29 ±0,04	23,94 ±0,78	2,75 ±0,18
		3 m	0,07 ±0,01	1,22 ±0,07	23,10 ±0,33	2,40 ±0,05
		6 m	0,06 ±0,01	1,12 ±0,01	21,45 ±0,23	2,59 ±0,02
		9 m	0,08 ±0,01	1,40 ±0,03	26,19 ±0,54	2,94 ±0,03
	Atmosfera Modificada	0 m	0,08 ±0,01	1,29 ±0,04	23,94 ±0,78	2,75 ±0,18
		3 m	0,07 ±0,00	1,20 ±0,07	22,93 ±1,02	2,58 ±0,22
		6 m	0,07 ±0,00	1,20 ±0,01	22,97 ±0,35	2,50 ±0,47
		9 m	0,08 ±0,01	1,37 ±0,02	26,48 ±0,22	2,89 ±0,04
	Vácuo	0 m	0,07 ±0,01	1,32 ±0,11	24,61 ±1,61	2,99 ±0,35
		3 m	0,07 ±0,01	1,29 ±0,12	24,75 ±1,87	2,96 ±0,29
		6 m	0,07 ±0,01	1,25 ±0,12	24,22 ±2,07	2,88 ±0,21
		9 m	0,07 ±0,00	1,27 ±0,07	23,93 ±1,20	2,95 ±0,21
Fábrica B	Vácuo	0 m	0,07 ±0,01	1,32 ±0,11	24,61 ±1,61	2,99 ±0,35
		3 m	0,07 ±0,01	1,29 ±0,11	24,72 ±1,80	2,94 ±0,31
		6 m	0,07 ±0,01	1,25 ±0,13	24,36 ±1,89	2,84 ±0,21
		9 m	0,07 ±0,02	1,26 ±0,25	23,78 ±2,89	2,89 ±0,49
	Atmosfera Modificada	0 m	0,07 ±0,01	1,29 ±0,11	24,72 ±1,80	2,94 ±0,31
		3 m	0,07 ±0,01	1,25 ±0,13	24,36 ±1,89	2,84 ±0,21

Ansorena e Astiasarán (2004b) estudaram o perfil de ácidos gordos em chouriço de Pamplona (um enchido fermentado tradicional de Espanha), curado durante 30 dias, após o que foi embalado sob vácuo e mantido sob refrigeração (4°C) até os enchidos serem analisados, aos 2 e 5 meses de conservação. Os teores dos ácidos gordos monoinsaturados (oleico e palmitoleico) mantiveram-se praticamente inalterados entre os 2 e os 5 meses, com resultados de 44,95 e 44,59 g/ 100 g de ácidos gordos. A concentração de ácidos gordos saturados baixou ligeiramente, 37,39 g/ 100 g de ácidos gordos aos 2

meses e 36,37 g/ 100 g de ácidos gordos aos 5 meses de conservação. Consequentemente os níveis de ácidos gordos polinsaturados subiram de 16,1 g/ 100 g de ácidos gordos, aos 2 meses, para 18,19 g/ 100 g de ácidos gordos aos 5 meses.

Quadro 58.2 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados do perfil de ácidos gordos (% do total de ésteres metílicos identificados), considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	Margárico (17:0)	Margaroleico (17:1)	Esteárico (18:0)	Oleico (18:1)
Fábrica A	Vácuo	0 m	0,25 ±0,03	0,26 ±0,05	11,39 ±0,91	49,73 ±1,20
		3 m	0,26 ±0,01	0,23 ±0,01	11,95 ±0,15	51,35 ±0,38
		6 m	0,23 ±0,01	0,29 ±0,01	10,14 ±0,13	55,96 ±0,14
		9 m	0,27 ±0,02	0,36 ±0,03	13,21 ±0,73	50,81 ±0,78
	Atmosfera Modificada	0 m	0,25 ±0,03	0,26 ±0,05	11,39 ±0,91	49,73 ±1,20
		3 m	0,25 ±0,03	0,23 ±0,02	11,16 ±1,20	52,28 ±2,16
		6 m	0,26 ±0,01	0,29 ±0,03	12,24 ±0,06	52,15 ±0,20
		9 m	0,31 ±0,01	0,38 ±0,02	14,97 ±0,10	48,98 ±2,10
Fábrica B	Vácuo	0 m	0,24 ±0,03	0,25 ±0,03	12,02 ±1,30	50,28 ±2,43
		3 m	0,26 ±0,04	0,26 ±0,03	12,33 ±1,53	49,69 ±2,86
		6 m	0,25 ±0,03	0,26 ±0,07	11,82 ±1,83	50,76 ±3,40
		9 m	0,23 ±0,02	0,25 ±0,06	11,39 ±1,60	50,97 ±2,80
	Atmosfera Modificada	0 m	0,24 ±0,03	0,25 ±0,03	12,02 ±1,30	50,28 ±2,43
		3 m	0,24 ±0,03	0,25 ±0,03	12,16 ±1,49	50,10 ±2,68
		6 m	0,27 ±0,05	0,28 ±0,01	12,37 ±1,42	49,63 ±2,94
		9 m	0,28 ±0,05	0,31 ±0,05	12,04 ±1,66	51,75 ±3,72

Quadro 58.3 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados do perfil de ácidos gordos (% do total de ésteres metílicos identificados), considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	Linoleico (18:2)	Linolénico (18:3)	Gadoleico (20:1)	Heneicosenoico (21:1)
Fábrica A	Vácuo	0 m	8,20 ±0,87	0,65 ±0,11	1,09 ±0,03	0,38 ±0,05
		3 m	7,35 ±0,19	0,57 ±0,01	1,15 ±0,04	0,33 ±0,03
		6 m	6,59 ±0,03	0,43 ±0,03	0,99 ±0,01	0,20 ±0,02
		9 m	6,21 ±0,13	0,39 ±0,01	0,78 ±0,03	0,20 ±0,03
	Atmosfera Modificada	0 m	8,20 ±0,87	0,65 ±0,11	1,09 ±0,03	0,38 ±0,05
		3 m	7,38 ±0,24	0,54 ±0,05	1,06 ±0,07	0,34 ±0,04
		6 m	6,83 ±0,08	0,49 ±0,06	1,07 ±0,05	0,16 ±0,03
		9 m	6,08 ±0,08	0,23 ±0,03	0,80 ±0,10	0,21 ±0,06
Fábrica B	Vácuo	0 m	6,50 ±1,29	0,44 ±0,13	1,01 ±0,12	0,28 ±0,04
		3 m	6,49 ±1,35	0,46 ±0,17	1,02 ±0,09	0,30 ±0,07
		6 m	6,81 ±0,59	0,45 ±0,08	0,96 ±0,16	0,27 ±0,08
		9 m	6,87 ±0,65	0,46 ±0,06	0,99 ±0,10	0,26 ±0,04
	Atmosfera Modificada	0 m	6,50 ±1,29	0,44 ±0,13	1,01 ±0,12	0,28 ±0,04
		3 m	6,38 ±1,32	0,47 ±0,14	1,02 ±0,09	0,29 ±0,05
		6 m	6,99 ±0,83	0,46 ±0,10	0,95 ±0,13	0,27 ±0,09
		9 m	5,97 ±1,51	0,38 ±0,16	1,01 ±0,14	0,27 ±0,08

Passando a apreciar as interacções que se revelaram significativas, relativamente à interacção fábrica x tempo de conservação, para o ácido mirístico (Figura 23), em nenhum tempo de conservação considerado os teores daquele ácido nos produtos de uma fábrica foram diferentes dos da outra. Na fábrica A os teores de ácido mirístico aos 6 meses foram significativamente inferiores aos registados nos tempos 0 e 9 meses, não havendo diferenças significativas entre estes dois últimos. Na fábrica B não houve diferenças significativas entre os valores de ácido mirístico registados ao longo do tempo de conservação.

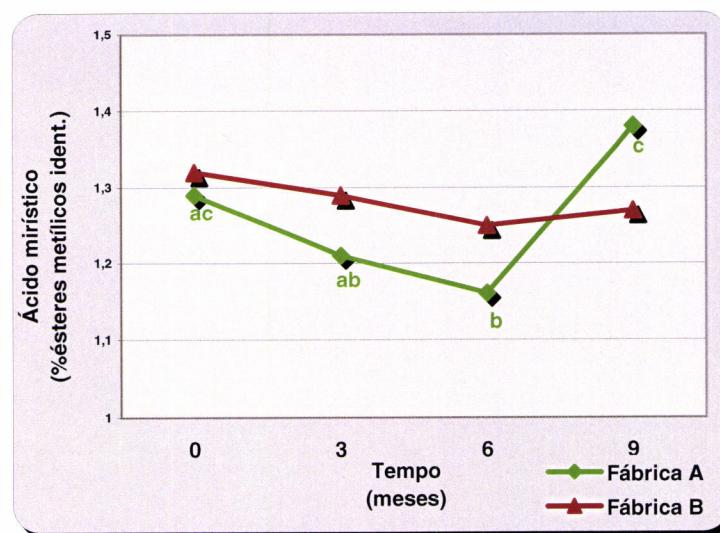


Figura 23 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido mirístico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Os teores de ácido palmítico nos enchidos da fábrica A foram significativamente inferiores aos da fábrica B nos tempos 3 e 6 meses (Figura 24). Aos 9 meses os produtos da fábrica A apresentaram valores de ácido palmítico significativamente superiores aos da fábrica B. Na fábrica A os teores daquele ácido aos 9 meses foram significativamente diferentes dos de todos os outros tempos, não apresentando estes diferenças entre si. Na fábrica B não houve qualquer diferença entre os valores registados ao longo do tempo.

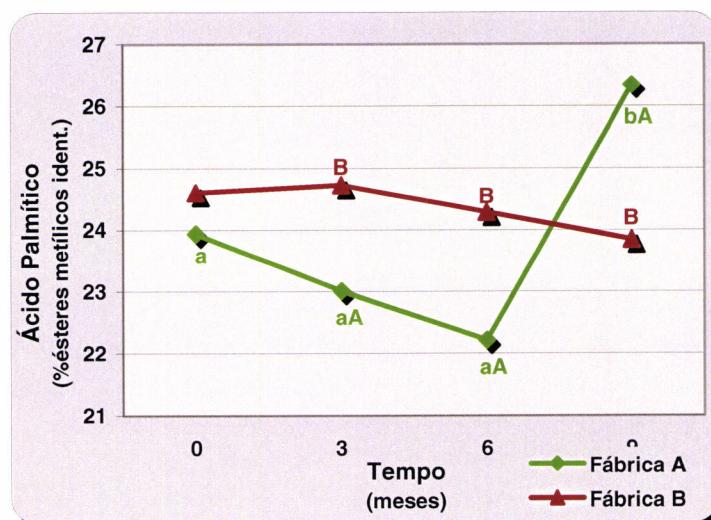


Figura 24 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido palmítico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Considerando os valores obtidos para o ácido palmitoleico, os registos obtidos de produtos da fábrica A foram sempre inferiores aos da outra fábrica, excepto no tempo 9 em que foram coincidentes (Figura 25). Contudo, apenas aos 3 meses os valores da fábrica A foram significativamente inferiores aos da fábrica B. Os registos feitos a partir dos produtos da fábrica A aos 9 meses de conservação foram significativamente superiores aos realizados aos 3 e 6 meses. Uma vez mais, não houve diferenças significativas entre os valores registados ao longo do tempo para os produtos da fábrica B.

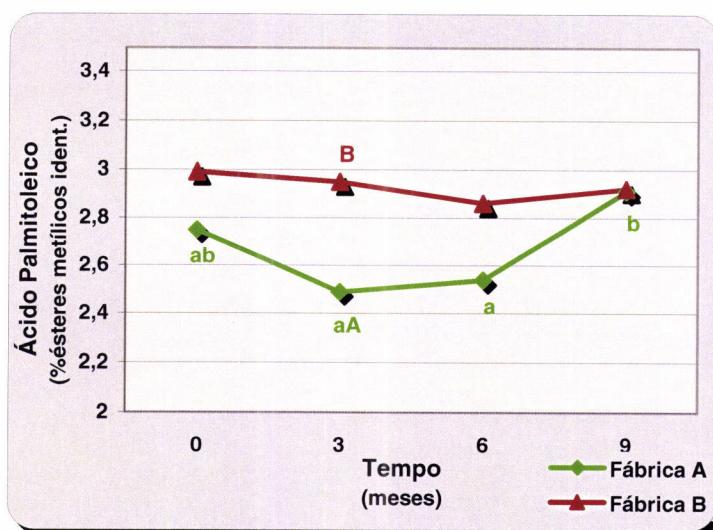


Figura 25 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido palmitoleico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Em nenhum dos tempos de conservação considerados os teores de ácido margárico dos paios de uma e outra fábrica foram significativamente diferentes entre si (Figura 26). Na fábrica A, os teores registados aos 9 meses de conservação foram significativamente superiores aos dos restantes tempos.

Ainda a propósito do ácido margárico e considerando agora os valores da interacção modo de conservação x tempo de conservação (Figura 27), apenas aos 9 meses de conservação os teores daquele ácido nos produtos conservados sob atmosfera modificada, foram significativamente diferentes (superiores) dos teores dos paios mantidos sob vácuo. Ao longo do tempo, apenas os produtos conservados em atmosfera modificada apresentaram diferenças significativas. Os teores em ácido margárico aos 9 meses foram significativamente superiores aos dos tempos 0 e 3.

Os teores em ácido margaroleico aos 9 meses, foram significativamente superiores nos enchidos da fábrica A (Figura 28). Nesta mesma fábrica, os teores em ácido margaroleico registados aos 9 meses foram significativamente superiores aos registados em todos os outros tempos.

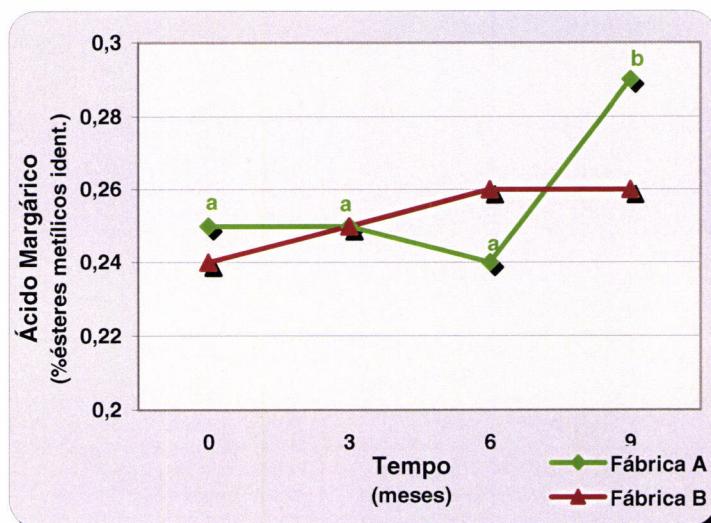


Figura 26 - Conservação de paio de porco Alentejano - ácido margárico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes

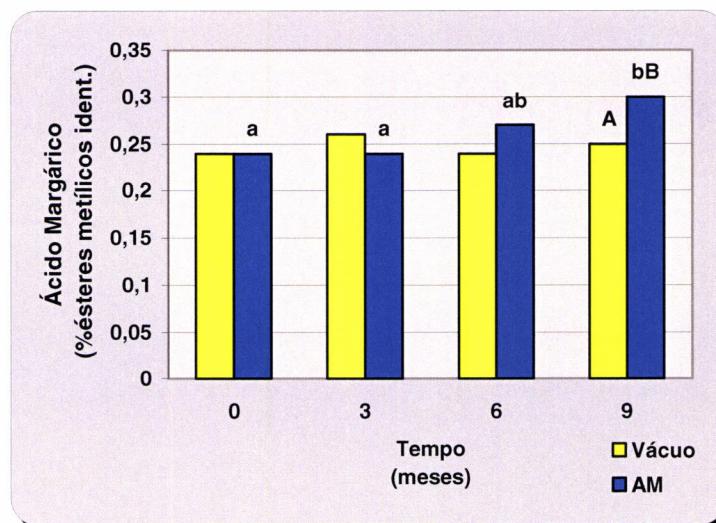


Figura 27 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido margárico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção modo de conservação x tempo de conservação.

Nota: para o mesmo modo de conservação, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

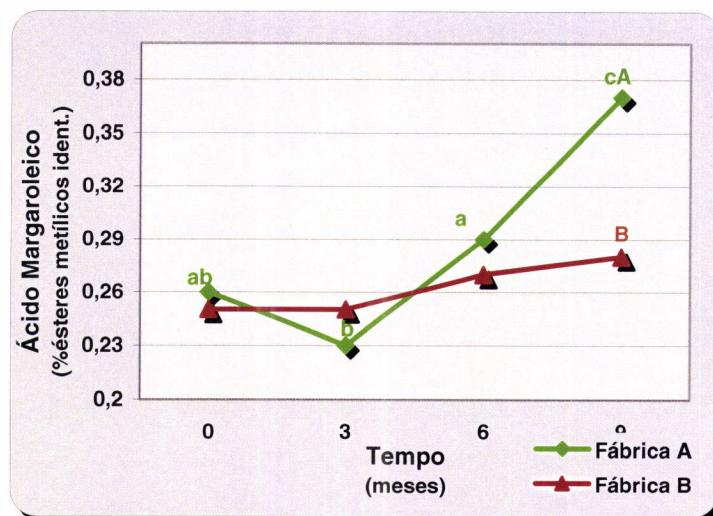


Figura 28 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido margaroleico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes

No que respeita ao ácido esteárico, uma vez mais os valores registados a partir dos produtos da fábrica A, aos 9 meses de conservação, foram significativamente superiores aos da fábrica B (Figura 29). Também neste caso, os teores dos produtos da fábrica A aos 9 meses foram significativamente superiores aos dos outros tempos. Os teores em ácido esteárico não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo para os produtos mantidos sob vácuo (Figura 30). Os mantidos em atmosfera modificada apresentaram, aos 9 meses, teores significativamente superiores aos dos tempos 0 e 3.

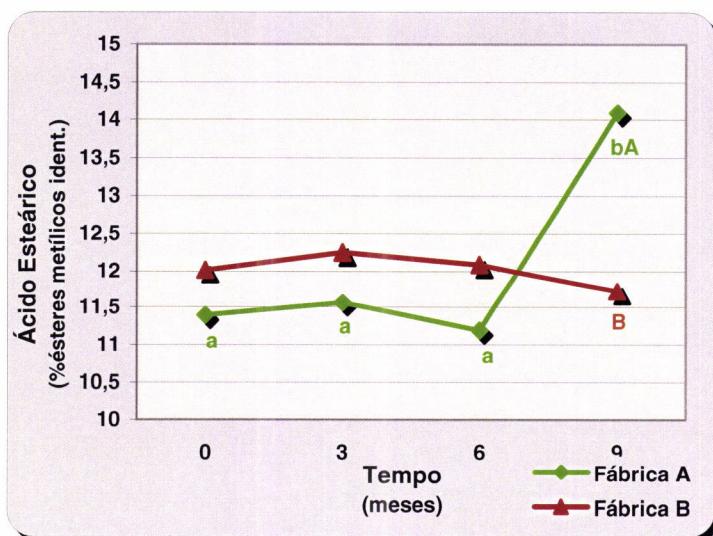


Figura 29 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido esteárico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

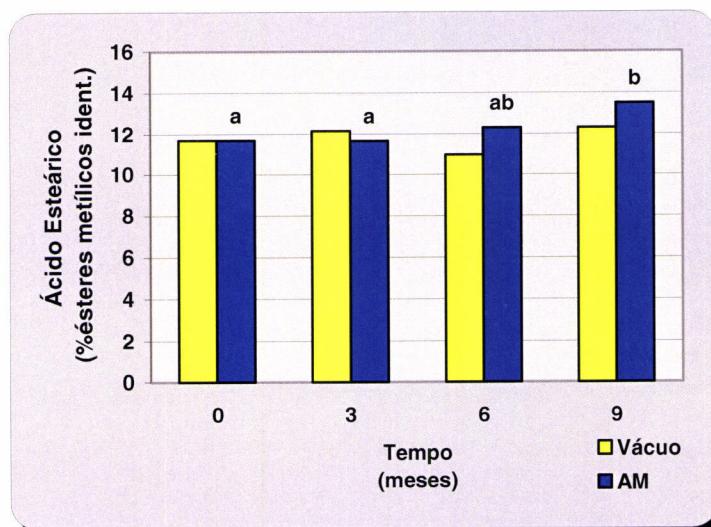


Figura 30 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido esteárico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção modo de conservação x tempo de conservação.

Nota: para o mesmo modo de conservação, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Quanto aos teores em ácido oleico, nos produtos da fábrica A os valores subiram até aos 6 meses, sendo o valor correspondente a este tempo significativamente superior aos dos tempos 0 e 9 meses e estes sem diferirem significativamente entre si (Figura 31).

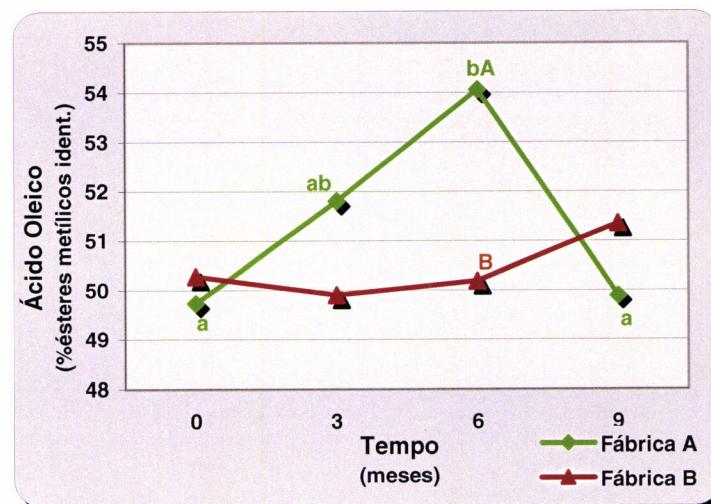


Figura 31 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido oleico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Aqueles teores, nos enchidos da fábrica B, manifestaram uma tendência para subir ao longo do tempo, contudo de modo não significativo. Comparando os valores médios de cada um dos tempos de conservação verificou-se que apenas aos 6 meses os teores em ácido oleico dos produtos da fábrica A foram significativamente diferentes (superiores) dos da fábrica B.

Na fábrica A os registos dos ácidos linoleico e linolénico baixaram sempre ao longo do tempo e na fábrica B mostraram tendência para a estabilidade (Figuras 32 e 33). Apenas no início do estudo os teores daquele ácido foram significativamente diferentes entre os produtos das duas fábricas.

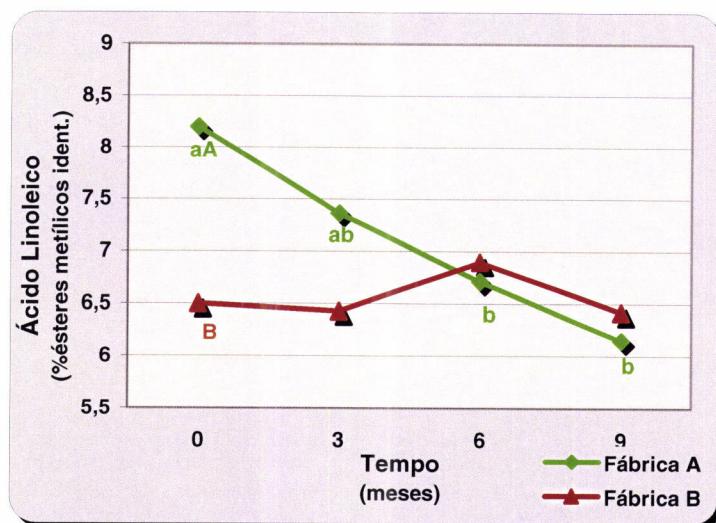


Figura 32 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido linoleico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

O ácido gadoleico apresentou sempre valores superiores nos produtos da fábrica A até aos 6 meses de conservação (Figura 34), invertendo-se depois a situação, de modo que aos 9 meses os teores nos produtos da fábrica A foram significativamente inferiores aos outros.

Na fábrica A, aos 9 meses os enchidos apresentaram um teor em ácido gadoleico significativamente inferior ao de todos os outros tempos. No que concerne ao ácido heneicosenoíco (Figura 35), no tempo 0 os seus teores foram significativamente superiores nos enchidos da fábrica A e aos 6 e 9 meses foram significativamente superiores nos enchidos da fábrica B. Nesta fábrica os teores daquele ácido mantiveram-se relativamente constantes enquanto que para os produtos da fábrica A os valores registados aos 6 e 9 meses foram significativamente inferiores aos registados aos 0 e 3 meses.

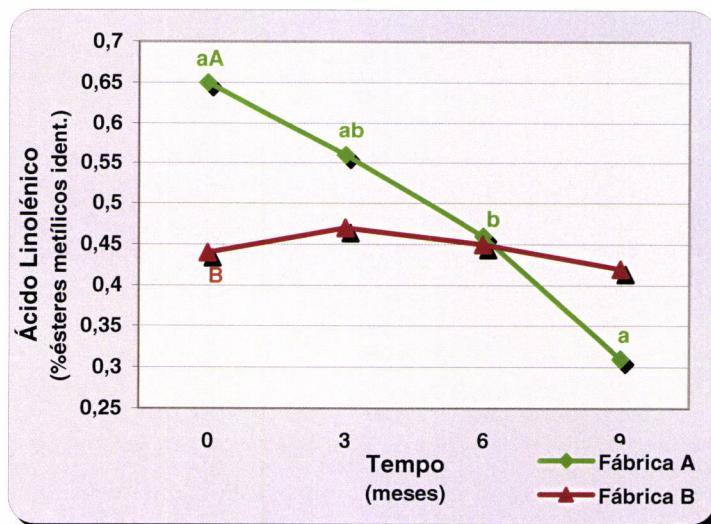


Figura 33 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido linolénico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

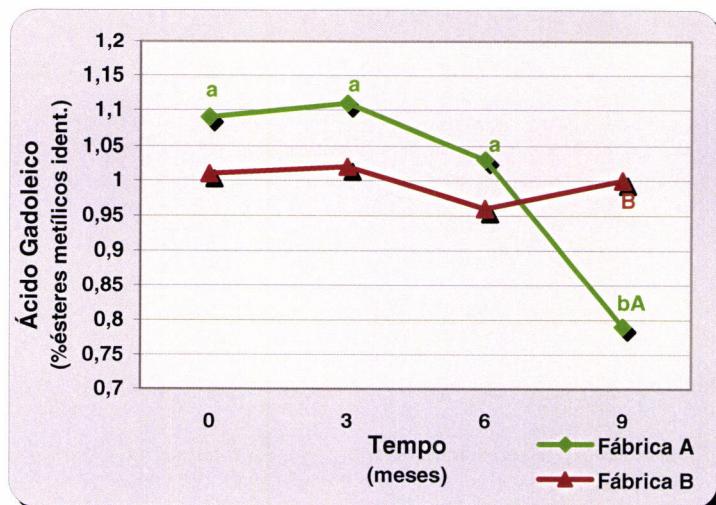


Figura 34 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido gadoleico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

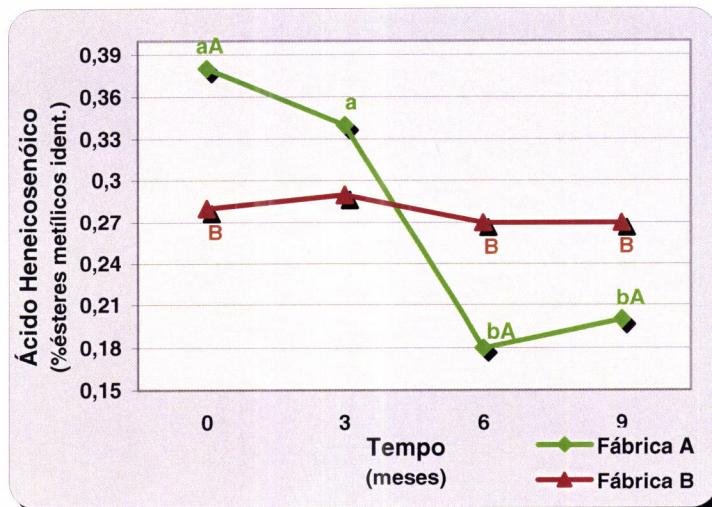


Figura 35 – Conservação de paio de porco Alentejano – ácido heneicosenoico: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica e tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

A título de resumo das informações retiradas das interacções de 1^a ordem efectuadas sobre os dados da análise do perfil de ácidos gordos parece-nos oportuno salientar algumas ideias. Assim, considerando a interacção fábrica x tempo de conservação, nos produtos da fábrica A houve sempre diferenças entre os tempos de conservação para todos os ácidos gordos estudados. Por outro lado, nos paios produzidos na fábrica B, nenhum dos ácidos gordos apresentou teores com diferenças significativas ao longo do tempo. No que respeita à interacção modo de conservação x tempo de conservação, significativa apenas para os ácidos gordos margárico e esteárico, observou-se que os paios mantidos sob vácuo nunca apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo.

12.3 - Análise do perfil de textura e força e trabalho de corte

A análise de variância realizada sobre os dados obtidos da análise do perfil de textura e da força e do trabalho de corte (Quadro 59) evidencia, uma vez mais, que o factor modo de conservação foi o que menos variações causou nas propriedades reológicas dos enchidos. Com efeito, para aquele factor apenas a coesividade ($p<0,05$) e a resiliência ($p<0,01$) apresentaram diferenças significativas. Para o factor fábrica, apenas a variável elasticidade (“springiness”) não apresentou diferenças significativas e quando considerado o factor tempo de conservação, mastigabilidade foi a única variável a não apresentar diferenças significativas. Desta forma, os factores fábrica e tempo de conservação foram os responsáveis pelas principais alterações verificadas na análise do perfil de textura e na força e no trabalho de corte durante a conservação do paio de porco Alentejano.

A interacção fábrica x modo de conservação nunca foi significativa, a interacção fábrica x tempo de conservação apenas não foi significativa para as variáveis coesividade e

elasticidade (“springiness”) e a interacção modo de conservação x tempo de conservação apenas foi significativa para a variável dureza.

Quadro 59– Conservação do paio de porco Alentejano: análise de variância para resultados da análise do perfil da textura e da força e do trabalho de corte, considerando os factores fábrica, modo de conservação e tempo de conservação.

Variáveis	Factores			Interacções		
	Fábrica (1)	Modo Conserv. (2)	Tempo Conserv. (3)	1x2	1x3	2x3
	G.L.=1	G.L.=1	G.L.=3	G.L.=1	G.L.=3	G.L.=3
Dureza	$F=34,2039$ $p=0,0000***$	$F=1,3344$ $p=0,2507$	$F=3,9704$ $p=0,0101*$	$F=3,2146$ $p=0,0759$	$F=7,5557$ $p=0,0001***$	$F=2,7829$ $p=0,0446*$
Coesividade	$F=31,9436$ $p=0,0000***$	$F=4,6813$ $p=0,0328*$	$F=5,0356$ $p=0,0027**$	$F=0,0172$ $p=0,8958$	$F=1,2751$ $p=0,2868$	$F=1,0103$ $p=0,3914$
Elasticidade	$F=1,9526$ $p=0,1653$	$F=1,5331$ $p=0,2184$	$F=3,8379$ $p=0,0119*$	$F=0,0002$ $p=0,9889$	$F=0,8629$ $p=0,4629$	$F=0,2734$ $p=0,8444$
Resiliência	$F=31,7591$ $p=0,0000***$	$F=10,9144$ $p=0,0013**$	$F=9,8764$ $p=0,0000***$	$F=0,1188$ $p=0,7310$	$F=5,6869$ $p=0,0012**$	$F=1,3244$ $p=0,2705$
Gomosidade	$F=36,9306$ $p=0,0000***$	$F=1,6376$ $p=0,2035$	$F=3,3598$ $p=0,0216*$	$F=2,8775$ $p=0,0928$	$F=6,7125$ $p=0,0003***$	$F=2,6038$ $p=0,0558$
Masticabilidade	$F=36,5984$ $p=0,0000***$	$F=1,6617$ $p=0,2002$	$F=2,5889$ $p=0,0569$	$F=2,4800$ $p=0,1183$	$F=6,1151$ $p=0,0007***$	$F=2,4485$ $p=0,0678$
Força de corte	$F=149,6043$ $p=0,0000***$	$F=1,7502$ $p=0,1879$	$F=24,1734$ $p=0,0000***$	$F=1,5940$ $p=0,2088$	$F=15,8558$ $p=0,0000***$	$F=0,4684$ $p=0,7048$
Trabalho de corte	$F=131,4506$ $p=0,0000***$	$F=3,3814$ $p=0,0680$	$F=25,3292$ $p=0,0000***$	$F=1,5286$ $p=0,2183$	$F=14,1376$ $p=0,0000***$	$F=1,5336$ $p=0,2083$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade; Modo Conserv. – Modo de conservação; Tempo Conserv. – Tempo de conservação.

Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

As médias e os desvios-padrão para a análise do perfil de textura e para a força e trabalho de corte são apresentados nos Quadros 60.1 e 60.2.

A dureza mede a força necessária para alcançar uma determinada deformação. No tempo 0 (produto final antes de embalado), os enchidos da fábrica B apresentaram valores de dureza muito superiores aos da fábrica A. Estas diferenças poderiam dever-se a uma mais intensa desidratação, devido às temperaturas mais elevadas durante a cura, na fábrica B, ou a uma proteólise mais intensa nos produtos da fábrica A. Contudo, as análises físico-químicas realizadas ao longo do processo de fabrico (capítulo 11.1) não permitem confirmar estas hipóteses. A acção coagulante do fumo sobre as proteínas e o mais elevado teor em gordura (8 pontos percentuais) dos produtos da fábrica A, sendo esta gordura fortemente monoinsaturada e, consequentemente, com ponto de fusão relativamente baixo, são outras duas hipóteses que nos permitimos adiantar. Uma outra explicação para aqueles resultados, poderá ser o facto dos paio da fábrica A estarem, por apreciação sensorial, menos curados que os da outra fábrica.

Quadro 60.1 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados da análise do perfil de textura (dureza, coesividade, elasticidade, resiliência), considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	Dureza (g)	Coesividade	Elasticidade	Resiliência
Fábrica A	Vácuo	0 m	1173,48 ±821,10	0,666 ±0,078	0,756 ±0,050	0,269 ±0,037
		3 m	1397,64 ±804,01	0,690 ±0,063	0,768 ±0,082	0,248 ±0,027
		6 m	1217,60 ±446,46	0,660 ±0,039	0,761 ±0,121	0,236 ±0,024
		9 m	519,04 ±155,18	0,551 ±0,064	0,650 ±0,108	0,188 ±0,032
	Atmosfera Modificada	0 m	1173,48 ±821,10	0,666 ±0,078	0,756 ±0,050	0,296 ±0,037
		3 m	907,46 ±278,72	0,693 ±0,040	0,825 ±0,077	0,267 ±0,033
		6 m	841,12 ±191,52	0,668 ±0,019	0,698 ±0,061	0,265 ±0,019
		9 m	944,92 ±274,67	0,651 ±0,085	0,740 ±0,148	0,240 ±0,039
Fábrica B	Vácuo	0 m	2535,51 ±1001,50	0,733 ±0,066	0,753 ±0,064	0,296 ±0,029
		3 m	1269,48 ±396,25	0,724 ±0,018	0,803 ±0,084	0,251 ±0,026
		6 m	1260,29 ±752,51	0,690 ±0,140	0,711 ±0,142	0,300 ±0,080
		9 m	2045,28 ±481,47	0,699 ±0,041	0,763 ±0,066	0,257 ±0,030
	Atmosfera Modificada	0 m	2535,51 ±1001,50	0,733 ±0,066	0,753 ±0,064	0,296 ±0,029
		3 m	1162,04 ±203,24	0,749 ±0,042	0,796 ±0,030	0,271 ±0,021
		6 m	1860,16 ±370,76	0,749 ±0,023	0,803 ±0,052	0,345 ±0,021
		9 m	3590,33 ±2530,53	0,713 ±0,043	0,763 ±0,078	0,273 ±0,048

Quadro 60.2 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados da análise do perfil de textura (gomosidade, masticabilidade) e força e trabalho de corte, considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4do tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	Gomosidade (g)	Masticabilidade (g)	Força de corte (g)	Trabalho de corte (g/mm)
Fábrica A	Vácuo	0 m	807,76 ±609,45	615,06 ±462,53	77,92 ±16,76	197,37 ±39,16
		3 m	959,78 ±553,53	750,50 ±482,89	46,43 ±11,98	110,53 ±22,37
		6 m	797,48 ±276,35	585,42 ±143,33	32,45 ±14,92	81,71 ±36,74
		9 m	291,02 ±109,70	191,15 ±89,95	24,20 ±13,48	59,82 ±31,67
	Atmosfera Modificada	0 m	807,76 ±609,45	615,06 ±463,53	77,92 ±16,76	197,37 ±39,16
		3 m	635,17 ±223,06	528,01 ±206,26	35,62 ±15,30	90,32 ±35,09
		6 m	561,51 ±125,64	387,69 ±73,81	37,54 ±14,56	91,69 ±30,26
		9 m	630,40 ±237,08	491,01 ±265,84	30,82 ±6,73	94,10 ±27,33
Fábrica B	Vácuo	0 m	1868,85 ±781,68	1422,13 ±642,22	105,87 ±32,53	275,28 ±71,60
		3 m	918,92 ±285,16	735,66 ±224,46	57,42 ±20,32	132,62 ±50,52
		6 m	954,53 ±746,92	765,56 ±747,25	70,52 ±27,10	183,28 ±83,97
		9 m	1439,79 ±411,42	1103,62 ±344,66	107,96 ±15,75	266,43 ±60,97
	Atmosfera Modificada	0 m	1868,85 ±781,68	1422,13 ±642,22	105,87 ±32,53	275,28 ±71,60
		3 m	871,09 ±163,13	693,93 ±138,41	73,71 ±22,29	180,84 ±44,74
		6 m	1397,98 ±317,96	1123,88 ±269,98	74,18 ±30,19	180,75 ±55,87
		9 m	2624,34 ±1913,38	1993,31 ±1393,44	125,91 ±44,33	343,45 ±159,74

Nos produtos da fábrica A conservados sob vácuo, a dureza baixa de forma contínua a partir dos 3 meses de conservação. Os produtos da fábrica B têm um decréscimo nos valores da dureza entre os tempos 0 e 3 (nos paio embalados em vácuo há uma estabilização entre os tempos 3 e 6), seguido de aumento dos valores até ao tempo 9. Nos produtos conservados em atmosfera modificada os valores da dureza aos 9 meses são superiores aos registados no tempo 0 em mais de 1000 g.

A coesividade é um parâmetro que mede a força das ligações internas que garantem a estrutura da amostra. Mede o grau de deformação de um corpo antes de atingir o seu ponto de fractura.

No tempo 0 os valores da coesividade dos produtos da fábrica B foram superiores aos da fábrica A. Considerando o conjunto dos enchidos produzidos em cada uma das fábricas (tanto os embalados sob vácuo como os mantidos em atmosfera modificada), os paios da fábrica B apresentaram uma coesividade significativamente superior à dos paios produzidos na fábrica A, o que na prática significa uma melhor ligação das massa nos paios da fábrica B.

Ao longo do tempo de conservação aquele parâmetro de textura manteve-se relativamente estável.

Por outro lado, os produtos conservados em atmosfera modificada apresentaram valores de coesividade significativamente superiores aos dos mantidos sob vácuo.

A elasticidade (“springiness”) mede o grau de recuperação das dimensões iniciais de um corpo após a acção da força deformadora.

Os valores médios da elasticidade (“spriginess”) não variaram de forma significativa nem entre as fábricas nem em função do modo de conservação. Contudo, ao longo do tempo houve variações neste parâmetro. A característica dominante foi o acréscimo de valores entre os tempos 0 e 3, normalmente seguido de um decréscimo.

A resiliência mede o modo como a amostra recupera da deformação em termos de velocidade.

Este parâmetro revela tendência para decrescer ao longo do tempo. Os valores dos produtos conservados sob atmosfera modificada são significativamente superiores aos dos produtos mantidos sob vácuo. Os enchidos da fábrica B apresentaram valores significativamente superiores aos da fábrica A.

A gomosidade avalia a energia requerida para desintegrar uma amostra semi-sólida até ao estado em que é deglutida. Considerando os valores obtidos para a dureza e coesividade, superiores nos produtos da fábrica B, facilmente se entende porque razão os valores da gomosidade são significativamente superiores nos produtos da fábrica B. Aliás, a determinação da gomosidade de uma amostra resulta da multiplicação do valor obtido para a dureza pelo da coesividade.

Nos paios da fábrica A os valores da gomosidade mostram tendência para baixar ao longo do tempo de conservação, sugerindo uma perda da sua estrutura, resultando daí produtos mais brandos que se podem desintegrar mais facilmente. Por outro lado, nos produtos da fábrica B os valores para aquele parâmetro baixaram entre os tempos 0 e 3, subindo depois até ao tempo 9. Nos paios produzidos na fábrica B e embalados sob atmosfera modificada, os valores registados após 9 meses de conservação foram notoriamente superiores aos registados no tempo 0. Uma possível explicação para estes resultados poderá basear-se no facto dos produtos finais da fábrica A serem menos curados (ou mais mal curados, como vulgarmente se diz) que os da fábrica B. Aqueles produtos, menos curados, e insuficientemente estabilizados, estarão sujeitos a alterações proteolíticas mais intensas que progressivamente vão degradando a estrutura tissular da parte magra dos enchidos. Aliás, tal como se mostrou no capítulo 12.1, os teores de ABVT durante a conservação, foram significativamente superiores nos produtos procedentes da fábrica A. Por outro lado, os produtos bem curados da fábrica B continuariam a perder água, o que contribuiria para que os valores da gomosidade aumentassem.

A masticabilidade simula a energia requerida para mastigar uma amostra de um alimento sólido até ao momento em que está pronto para ser engolido e obtém-se através da multiplicação entre os parâmetros dureza, coesividade e elasticidade (“springiness”). A discussão feita com base nos resultados obtidos para a gomosidade aplica-se aos valores obtidos para a masticabilidade.

A força de corte é a força máxima requerida para cortar uma amostra sob determinadas condições pré-definidas. O trabalho de corte traduz o trabalho necessário para cortar uma amostra sob condições pré-definidas.

Tanto a força máxima como o trabalho de corte foram significativamente superiores para os produtos da fábrica B.

A evolução da força e do trabalho de corte ao longo do tempo é semelhante à apresentada para a gomosidade e masticabilidade e está relacionada, sobretudo, com os valores da dureza e da coesividade. Contudo destaca-se a forma evidente como, nos paços oriundos da fábrica A, os valores daqueles parâmetros descem ao longo do tempo de conservação.

Fernández (2000) analisou a textura de um tipo de paio espanhol com 22 dias de cura e comprovou a acção proteolítica de enzimas, que adicionou intencionalmente aos enchidos, sobre as características texturais dos enchidos que estudou. Com efeito, os enchidos cuja formulação integrava proteases foram mais brandos, com menor elasticidade (“springiness”) e coesividade e mais fáceis de mastigar e cortar.

Rubio *et al.* (2004) não encontraram diferenças para os parâmetros de textura estudados (dureza, elasticidade (“springiness”), coesividade e masticabilidade) entre amostras de “cecina de Leon” conservadas sob vácuo e sob atmosfera modificada (20% CO₂; 80% N₂), à temperatura de 6°C durante 210 dias.

Elias *et al.* (2004) estudaram o efeito da redução do tamanho dos fragmentos de carne e gordura usados como massa para o fabrico do “painho de Portalegre”, um enchido de porco Alentejano com características muito semelhantes às do paço objecto do nosso trabalho. Naquele estudo, os paços produzidos com massas compostas por fragmentos de menor dimensão apresentaram valores para coesividade, elasticidade (“springiness”) e masticabilidade superiores que os paços fabricados com porções de maior tamanho. Os autores atribuíram estes resultados à melhor ligação das massas compostas por fragmentos menores, resultante da maior área de contacto entre os fragmentos; além do mais, este tipo de massas proporciona uma maior extracção de proteína solúvel, importante também para a ligação das massas.

Vários outros autores têm apresentado resultados sobre a análise da textura de enchidos (Ansorena *et al.*, 1998b; Elias *et al.*, 1999; Gimeno *et al.*, 1999a,b, 2000; Elias *et al.*, 2000; Muguerza *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004).

Considerando ainda os resultados da análise reológica e debruçando a nossa atenção para as interacções de 1^a ordem, que foram significativas, verificamos que para a interacção fábrica x tempo de conservação (Figura 36) a dureza dos produtos da fábrica B foi sempre superior.

Contudo, apenas no tempo 9 os paços da fábrica B apresentaram valores significativamente superiores aos da fábrica A. Nesta fábrica, apesar da tendência para valores decrescentes não houve diferenças significativas ao longo do tempo. Na fábrica B, os valores da dureza registados nos tempos 3 e 6 foram significativamente inferiores aos do tempo 9.

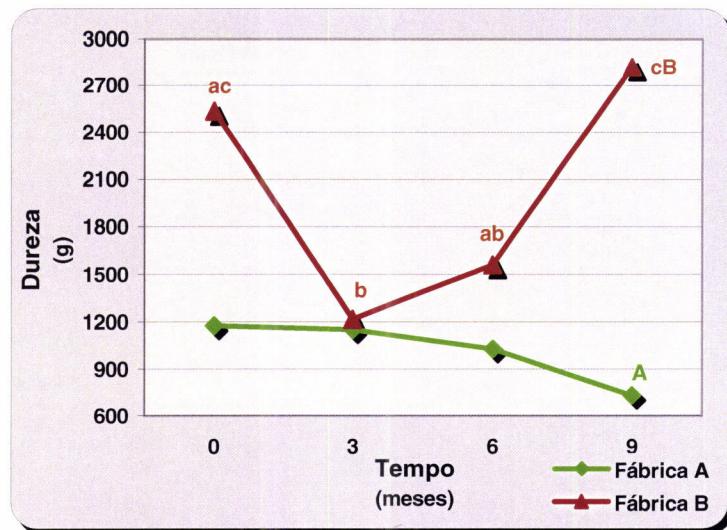


Figura 36 – Conservação de paio de porco Alentejano – dureza (g): representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Considerando ainda a dureza, a interacção modo de conservação x tempo de conservação mostra não haver diferenças significativas ao longo do tempo para os produtos conservados sob vácuo (Figura 37). Aos 9 meses de conservação a dureza dos paios conservados em atmosfera modificada foi significativamente superior à dos enchidos mantidos sob vácuo.

As restantes interacções de 1^a ordem significativas envolvem os factores fábrica e tempo de conservação.

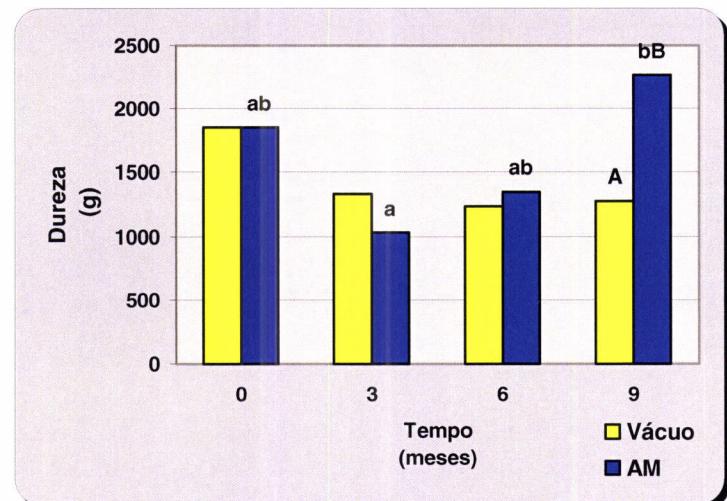


Figura 37 – Conservação de paio de porco Alentejano – dureza (g): representação gráfica da comparação de médias para a interacção modo de conservação x tempo de conservação.

Nota: para o mesmo modo de conservação, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Para cada um dos parâmetros resiliência, gomosidade e masticabilidade (Figuras 38, 39 e 40), os resultados obtidos no tempo 3 são muito semelhantes entre os paio de uma e outra fábrica. Em todos os outros tempos (0, 6 e 9 meses) os valores para aqueles três parâmetros foram superiores nos produtos da fábrica B. Na fábrica A, apesar da tendência para valores decrescentes ao longo do tempo de conservação, apenas houve diferenças significativas ao longo do tempo de conservação para a resiliência, tendo sido os resultados do tempo 9 significativamente inferiores ao do início do estudo (tempo 0).

Para a força e trabalho de corte (Figuras 41 e 42), os valores dos paio da fábrica B foram sempre significativamente superiores. A única exceção foi o tempo 3, para o trabalho de corte, em que não houve diferenças significativas entre os resultados dos enchidos de ambas as fábricas.

Ainda para aqueles parâmetros, na fábrica B os resultados nos tempos 3 e 6 foram significativamente inferiores aos dos tempos 0 e 9 e na fábrica A os resultados do tempo 0 foram significativamente superiores aos dos restantes tempos de conservação.

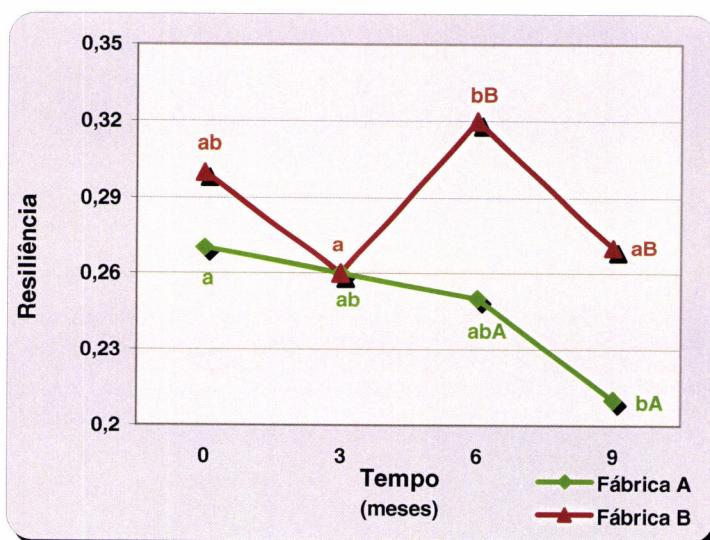


Figura 38 – Conservação de paio de porco Alentejano – resiliência: representação gráfica da comparação de médias para a interacção modo de conservação x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

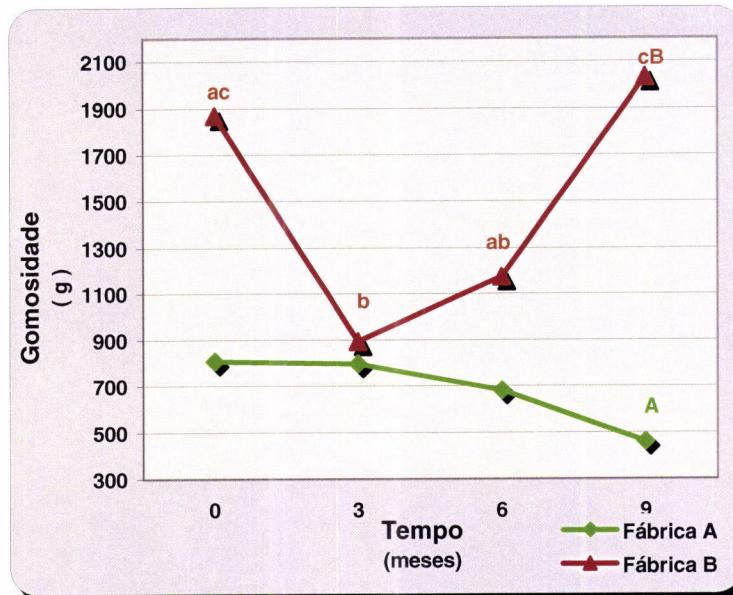


Figura 39 – Conservação de paio de porco Alentejano – gomosidade: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

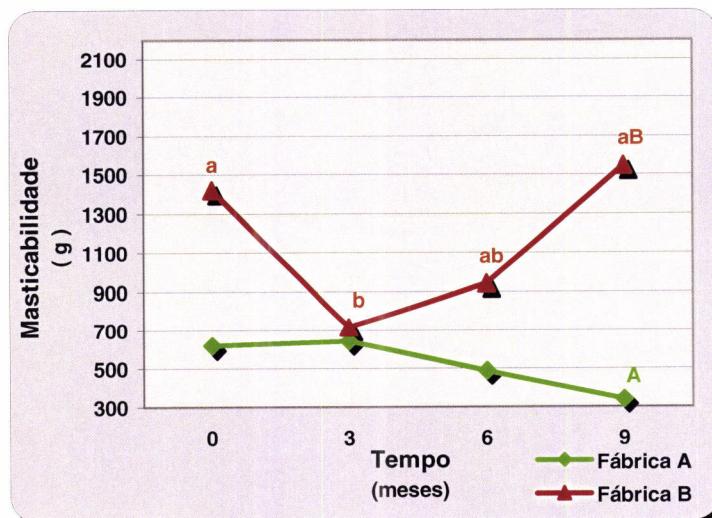


Figura 40 – Conservação de paio de porco Alentejano – masticabilidade: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

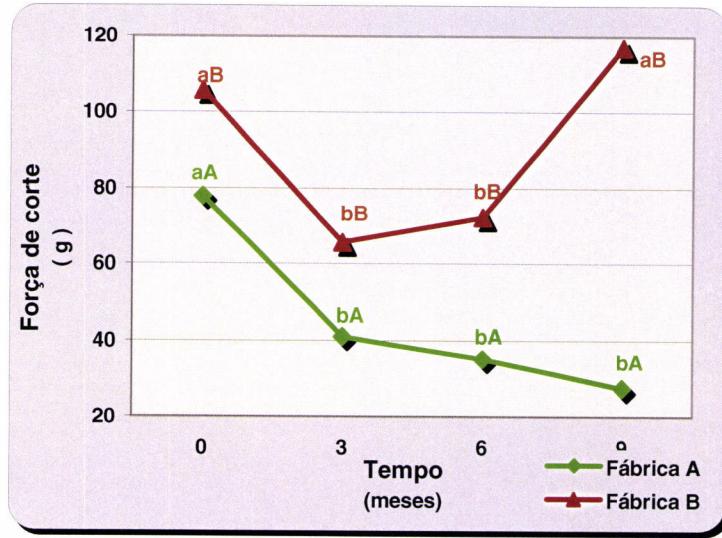


Figura 41 – Conservação de paio de porco Alentejano – força de corte: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

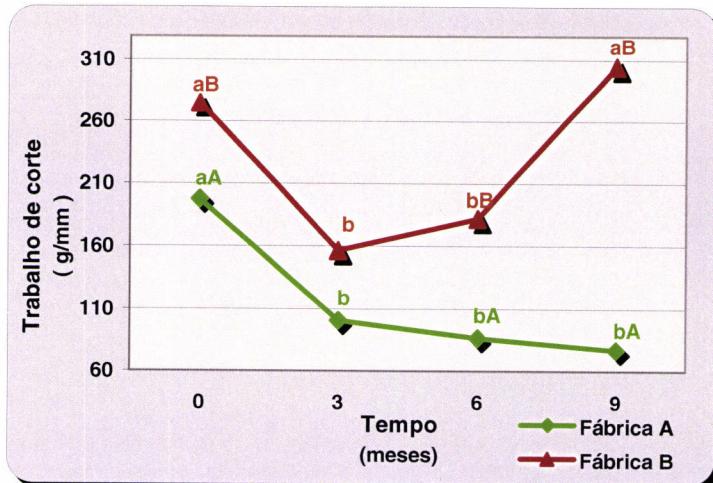


Figura 42 – Conservação de paio de porco Alentejano – trabalho de corte: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Como súmula da informação apresentada sobre a análise do perfil de textura e da força e do trabalho de corte, faz-se notar que para a totalidade dos parâmetros os resultados dos produtos da fábrica B foram quase sempre superiores. Estes resultados não significam uma pior qualidade destes produtos, antes pelo contrário, como poderá ser observado através dos resultados da análise sensorial (capítulo 12.5). Com efeito, o consumidor deseja para os enchidos um grau de consistência, de resistência à mastigação, mínimo, abaixo do qual deprecia o produto.

12.4 - Análises microbiológicas

A análise de variância efectuada com base nos resultados das análises microbiológicas realizadas ao longo do tempo de conservação dos enchidos (Quadro 61) mostra que o modo de conservação (vácuo ou atmosfera modificada) não interferiu de forma significativa naqueles resultados. Por outro lado, tanto o factor fábrica como o tempo de conservação foram determinantes nas alterações verificadas na população micobiana estudada.

Com efeito, nenhuma das variáveis apresentou diferenças significativas para o factor modo de conservação; para o factor fábrica apenas as contagens de bolores e de *Streptococci* do grupo D não mostraram diferenças significativas e para o factor tempo de conservação apenas a contagem de esporos de bactérias aeróbias não apresentou diferenças significativas. Quanto às interacções de 1^a ordem, fábrica x modo de conservação não foi significativa para nenhuma variável, fábrica x tempo de conservação apenas não foi significativo para as contagens de psicrotróficos totais, bolores e esporos de bactérias aeróbicas e a interacção modo de conservação x tempo de conservação apenas foi significativa para as contagens de microrganismos mesófilos totais.

As médias e os desvios-padrão dos resultados obtidos das análises microbiológicas realizadas aos paio ao longo do tempo de conservação são apresentados nos Quadros 62.1, 62.2 e 62.3.

De um modo geral, o número de microrganismos é significativamente superior nos enchidos da fábrica A. As excepções são a contagem de *Micrococcaceae* e a estimativa de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, cujos valores são significativamente superiores na fábrica B.

Como já havia sido referido a propósito da apresentação dos resultados do Quadro 61, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores para produtos conservados sob vácuo e em atmosfera modificada.

Quadro 61 – Conservação do paio de porco Alentejano: análise de variância para resultados de análises microbiológicas, considerando os factores fábrica, modo de conservação e tempo de conservação.

Variáveis	Factores			Interacções		
	Fábrica (1)	Modo Conserv. (2)	Tempo Conserv. (3)	1x2	1x3	2x3
		G.L.=1	G.L.=1	G.L.=3	G.L.=3	G.L.=3
Mesófilos totais	$F=129,7418$ $p=0,0000***$	$F=3,0252$ $p=0,0852$	$F=44,6770$ $p=0,0000***$	$F=0,0040$ $p=0,9497$	$F=25,3851$ $p=0,0000***$	$F=2,8929$ $p=0,0393*$
Psicrotróficos totais	$F=14,5037$ $p=0,0002***$	$F=2,2782$ $p=0,1347$	$F=206,1605$ $p=0,0000***$	$F=0,5610$ $p=0,4558$	$F=2,4032$ $p=0,0728$	$F=0,7178$ $p=0,5439$
Bolores	$F=1,0480$ $p=0,3085$	$F=0,1859$ $p=0,6673$	$F=4,9645$ $p=0,0030**$	$F=1,5110$ $p=0,2220$	$F=1,2037$ $p=0,3127$	$F=0,9203$ $p=0,4341$
Leveduras	$F=22,2871$ $p=0,0000***$	$F=0,3516$ $p=0,5546$	$F=30,8005$ $p=0,0000***$	$F=0,2346$ $p=0,6292$	$F=22,6313$ $p=0,0000***$	$F=0,1272$ $p=0,9438$
Lactobacillus spp.	$F=38,4902$ $p=0,0000***$	$F=1,3837$ $p=0,2424$	$F=150,2814$ $p=0,0000***$	$F=0,3906$ $p=0,5335$	$F=13,2858$ $p=0,0000***$	$F=1,2419$ $p=0,2989$
Bactérias Ácido Lácticas	$F=471,1224$ $p=0,0000***$	$F=1,9104$ $p=0,1703$	$F=446,6171$ $p=0,0000***$	$F=0,041$ $p=0,8341$	$F=125,4573$ $p=0,0000***$	$F=1,9334$ $p=0,1297$
Micrococcaceae	$F=57,6162$ $p=0,0000***$	$F=0,2253$ $p=0,6361$	$F=11,9189$ $p=0,0000***$	$F=0,9271$ $p=0,3380$	$F=7,5004$ $p=0,0001***$	$F=0,7565$ $p=0,5213$
Esporos de bactérias aeróbias	$F=239,3913$ $p=0,0000***$	$F=0,1924$ $p=0,6620$	$F=2,4369$ $p=0,0693$	$F=0,0420$ $p=0,8381$	$F=1,4198$ $p=0,2417$	$F=0,2697$ $p=0,8471$
Enterobacteriaceae	$F=37,4565$ $p=0,0000***$	$F=0,2640$ $p=0,6086$	$F=36,0010$ $p=0,0000***$	$F=0,2640$ $p=0,6086$	$F=46,9849$ $p=0,0000***$	$F=0,2447$ $p=0,8649$
Streptococci do grupo D	$F=3,2754$ $p=0,0735$	$F=1,6100$ $p=0,2076$	$F=6,5464$ $p=0,0004***$	$F=0,5606$ $p=0,4559$	$F=2,9144$ $p=0,0382*$	$F=1,0495$ $p=0,3744$
Esporos de Clostridia sulfito-redutores	$F=18,5110$ $p=0,0000***$	$F=0,0231$ $p=0,8797$	$F=3,5092$ $p=0,0188*$	$F=0,5765$ $p=0,4498$	$F=3,9493$ $p=0,0110*$	$F=0,7793$ $p=0,5088$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade; Modo Conserv. - Modo de conservação; Tempo Conserv. - Tempo de conservação.

Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Quadro 62.1 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas (log UFC/g), considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	Mesófilos totais	Psicrotróficos totais	Bolores	Leveduras
Fábrica A	Vácuo	0 m	6,60 ±0,65	5,73 ±0,80	1,36 ±1,80	5,05 ±1,31
		3 m	4,83 ±0,52	0,76 ±1,69	0,00 ±0,00	2,82 ±0,75
		6 m	5,38 ±0,07	0,54 ±1,21	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
		9 m	7,56 ±0,33	1,58 ±2,21	0,00 ±0,00	5,36 ±0,51
	Atmosfera Modificada	0 m	6,60 ±0,65	5,73 ±0,80	1,36 ±1,80	5,05 ±1,31
		3 m	5,05 ±0,79	0,00 ±0,00	1,66 ±1,61	3,22 ±1,39
		6 m	4,69 ±0,17	0,40 ±0,89	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
		9 m	6,94 ±1,44	0,70 ±1,56	0,00 ±0,00	5,08 ±0,56
	Vácuo	0 m	5,86 ±0,35	4,41 ±0,69	0,76 ±1,39	3,68 ±0,59
		3 m	4,01 ±1,10	0,60 ±1,34	0,00 ±0,00	0,40 ±0,89
		6 m	4,75 ±1,44	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	2,45 ±3,36
		9 m	2,80 ±0,13	0,00 ±0,00	0,80 ±1,12	0,76 ±1,69
Fábrica B	Atmosfera Modificada	0 m	5,86 ±0,35	4,41 ±0,69	0,76 ±1,39	3,68 ±0,59
		3 m	3,58 ±0,83	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,84 ±1,15
		6 m	3,33 ±1,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	2,91 ±2,78
		9 m	3,64 ±1,24	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,09 ±2,44

Quadro 62.2 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas^{(1)}}log UFC/g; ⁽²⁾nº de esporos/g), considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

Modo de conservação	Tempo de conservação	<i>Lactobacillus</i> spp	Bactérias ácido lácticas	<i>Micrococcaceae</i>	Esporos de bactérias aeróbias
		(1)	(1)	(1)	(2)
Vácuo	0 m	7,82 ±0,70	7,68 ±0,70	5,98 ±0,76	4,23 ±0,92
	3 m	4,47 ±0,59	4,66 ±0,13	4,62 ±0,48	3,75 ±1,00
	6 m	3,65 ±0,42	3,48 ±0,54	4,41 ±0,19	4,56 ±0,33
	9 m	6,41 ±0,93	6,19 ±0,25	5,55 ±0,40	4,57 ±0,55
Atmosfera Modificada	0 m	7,82 ±0,70	7,68 ±0,70	5,98 ±0,76	4,23 ±0,92
	3 m	4,86 ±0,23	4,75 ±0,43	5,04 ±0,73	3,40 ±1,32
	6 m	3,51 ±0,31	2,93 ±0,09	4,57 ±0,19	4,60 ±0,07
	9 m	5,04 ±0,48	5,96 ±0,44	5,22 ±0,44	4,70 ±0,10
Vácuo	0 m	6,32 ±0,51	6,18 ±0,60	6,12 ±0,58	1,02 ±1,07
	3 m	5,25 ±0,69	3,54 ±0,51	6,04 ±0,87	1,16 ±0,70
	6 m	3,06 ±0,24	2,94 ±0,15	6,29 ±0,40	1,81 ±1,29
	9 m	3,50 ±1,07	0,00 ±0,00	6,56 ±0,19	1,56 ±0,93
Atmosfera Modificada	0 m	6,32 ±0,51	6,18 ±0,60	6,12 ±0,58	1,01 ±1,07
	3 m	5,27 ±1,59	3,67 ±0,61	6,08 ±1,30	1,49 ±0,84
	6 m	2,53 ±0,20	2,31 ±0,24	5,42 ±0,28	0,98 ±0,95
	9 m	3,66 ±1,68	0,00 ±0,00	6,64 ±0,22	1,56 ±0,93

Quadro 62.3 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas, considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

Modo de conservação	Tempo de conservação	<i>Enterobacteriaceae</i> (log UFC/g)	<i>Streptococci</i> do grupo D (log UFC/g)	Esporos de <i>Clostridia</i> sulfito-redutores ▲	Bactérias coliformes ▲	<i>Escherichia coli</i> ▲
Fábrica A	Vácuo	0 m	0,14 ±0,53	0,82 ±1,02	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00
		3 m	0,00 ±0,00	2,70 ±1,15	1,60 ±1,34	1,00 ±0,00
		6 m	0,00 ±0,00	0,26 ±0,58	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00
		9 m	3,81 ±0,78	0,00 ±0,00	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00
	Atmosfera Modificada	0 m	0,14 ±0,53	0,82 ±1,02	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00
		3 m	0,00 ±0,00	1,33 ±1,88	1,60 ±1,34	1,00 ±0,00
		6 m	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,40 ±0,89	1,00 ±0,00
		9 m	3,27 ±0,74	0,00 ±0,00	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00
Fábrica B	Vácuo	0 m	0,47 ±1,11	0,31 ±1,09	1,33 ±0,65	1,00 ±0,00
		3 m	0,00 ±0,00	0,86 ±1,18	1,80 ±0,84	1,00 ±0,00
		6 m	0,00 ±0,00	0,34 ±0,76	2,00 ±1,00	1,00 ±0,00
		9 m	0,00 ±0,00	0,2 ±0,45	2,80 ±1,30	1,00 ±0,00
	Atmosfera Modificada	0 m	0,47 ±1,11	0,31 ±1,09	1,33 ±0,65	1,00 ±0,00
		3 m	0,00 ±0,00	0,46 ±1,03	1,40 ±0,55	1,00 ±0,00
		6 m	0,00 ±0,00	0,52 ±1,16	2,40 ±0,89	1,00 ±0,00
		9 m	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	2,20 ±1,30	1,00 ±0,00

▲ Resultados para esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *Escherichia coli*:

Classe 1: <1 esporo/bactéria g⁻¹

Classe 2: >1 e <10 esporos/bactérias g⁻¹

Classe 3: >10 e < 100 esporos/bactérias g⁻¹

Nos produtos da fábrica A as contagens de microrganismos mesófilos totais e de leveduras, de um modo geral baixaram até ao tempo 6 e depois subiram abruptamente até ao tempo 9, registando-se neste tempo um aumento do número de leveduras que se reflecte nas contagens de mesófilos totais. Este aumento de leveduras anaeróbias poderá dever-se aos níveis de alteração do substrato, principalmente por modificações proteolíticas e lipolíticas, que tornam as condições do meio propícias à multiplicação daquele tipo de leveduras. Além do mais, nos paiois da fábrica A houve um aumento do número de *Lactobacillus* spp., bactérias ácido lácticas e *Micrococcaceae*. A acção destes microrganismos poderá ter contribuído para a alteração do substrato (por exemplo uma maior acidificação causada pela produção de ácido por parte de *Lactobacillus* spp., e de bactérias ácido lácticas e um maior teor de componentes azotados resultantes da degradação proteolítica) de modo a torná-lo mais favorável ao desenvolvimento de leveduras anaeróbias. Na realidade, muitas crescem na total ausência de oxigénio, no entanto, certas leveduras anaeróbias produtoras de CO₂ são estimuladas por níveis elevados deste gás (Church, 1993; Rönner, 1994).

A origem da microbiota ácido láctica dos enchidos está naturalmente associada à sua ocorrência na carne. Mesmo as espécies com verdadeiro interesse tecnológico, e por essa razão indicadas como desejáveis em produtos cárneos fermentados, estão frequentemente associadas a processos deteriorativos de carnes frescas e produtos cárneos não fermentados, como o são os produtos cozidos, principalmente quando embalados sob baixos teores de oxigénio (Borch *et al.*, 1996; Björkroth e Korkeala, 1997).

Nos enchidos da fábrica B os microrganismos de alteração e de interesse tecnológico revelaram tendência para valores menores à medida que aumentou o tempo de conservação. As contagens de *Micrococcaceae* constituíram excepção e mantiveram-se relativamente constantes ao longo do tempo de conservação.

Barbosa (2000) estudou a conservação (em vácuo e numa atmosfera com 20% de CO₂ e 80% de N₂) de um paio fumado de porco Alentejano produzido por três fabricantes diferentes. As contagens de *Micrococcaceae* tiveram valores iniciais próximos de 7 log UFC/g, estes valores desceram para cerca de 4 – 5 log UFC/g entre os 3 e os 6 meses e tornaram a subir para 6 – 7 log UFC/g registados aos 9 meses. Os paiois conservados sob atmosfera modificada, de um modo geral, tiveram contagens superiores em cerca de 1 unidade logarítmica comparativamente aos enchidos conservados sob vácuo. As contagens iniciais de *Lactobacillus* spp. foram próximas, também, de 7 log UFC/g. Estes valores decresceram ao longo do tempo de conservação, atingindo 4 – 5 log UFC/g aos 9 meses.

No que respeita aos microrganismos indicadores de condições higio-sanitárias, nos enchidos da fábrica A as contagens de *Enterobacteriaceae*, que se mantiveram sempre em níveis baixos até aos 6 meses de conservação (nos tempos 3 e 6 apresentaram valores inferiores ao limiar de detecção do método utilizado) subiram para valores superiores a 3 log UFC/g aos 9 meses. A explicação para estes resultados estará relacionada com a degradação de substrato que permitiu aos microrganismos desta família, que existiam em número tão reduzido que não foram detectados nos tempos 3 e 6, multiplicar-se e atingir aquelas contagens.

Nos paiois da fábrica B a contagem de *Enterobacteriaceae* foi inferior ao limiar de detecção do método utilizado desde o tempo 3, inclusive, até ao final do estudo.

Nos produtos de ambas as fábricas a contagem de *Streptococci* do grupo D foram-se reduzindo ao longo do tempo de conservação, tendendo para valores inferiores ao limiar de detecção do método utilizado.

Também nos enchidos de ambas as fábricas, a estimativa do número de células viáveis de bactérias coliformes e de *Escherichia coli* foi sempre inferior ao limiar de detecção do método utilizado.

Quanto à estimativa do número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, todos os resultados ficaram aquém de 10^2 (nºesporos/g), valor máximo indicado por alguns autores (Ribeiro, 1974; Anónimo, 1977).

Num trabalho já referido neste capítulo, Rubio *et al.* (2004) atribuíram à “cecina de Leon” mantida a 6°C uma vida útil de 210 dias, para as amostras conservadas sob vácuo, e de 150 dias para as amostras conservadas numa atmosfera modificada (20% CO₂; 80% N₂). Os autores basearam a sua decisão nos resultados obtidos nas análises microbiológicas, principalmente, e sensoriais. O significativo aumento de microrganismos psicrotróficos totais entre os 150 e os 210 dias de conservação (de 4,5 log UFC/g para 7,5 log UFC/g) foi a principal causa daquela decisão. No entanto, naquele período de tempo a população de micrococáceas aumentou de 5 para 8 log UFC/g e a de bactérias ácido lácticas passou de 3 para 6 log UFC/g.

No que concerne à discussão das interacções de 1^a ordem, a interacção modo de conservação x tempo de conservação só foi significativa para a contagem de microrganismos mesófilos totais. Todas as outras interacções significativas envolvem os factores modo de conservação e tempo de conservação.

A propósito da interacção fábrica x tempo de conservação para a contagem de microrganismos mesófilos (Figura 43), os valores dos produtos da fábrica A foram sempre superiores e somente no tempo 6 essa diferença não foi significativa. Através daquela mesma figura é notória a tendência para contagens decrescentes nos produtos da fábrica B. Por outro lado, nos enchidos da fábrica A registou-se um aumento significativo nas contagens entre os tempos 6 e 9, tal como se esclareceu a propósito da discussão do Quadro 62.1

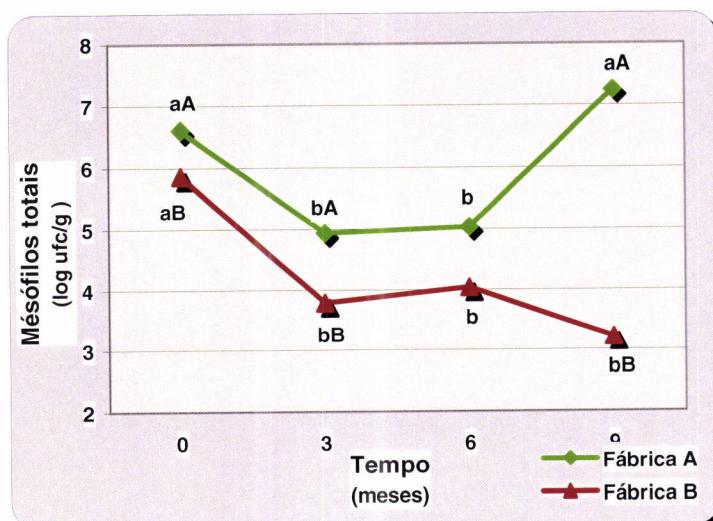


Figura 43 – Conservação de paio de porco Alentejano – mesófilos totais: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

A representação gráfica da interacção modo de conservação x tempo de conservação, para a contagem de microrganismos mesófilos (Figura 44), mostra que as contagens realizadas no tempo 0 foram significativamente superiores às dos restantes tempos, tanto nos produtos embalados sob vácuo como nos mantidos em atmosfera modificada. Apenas aos 6 meses as contagens de microrganismos mesófilos foram significativamente diferentes entre os produtos conservados sob vácuo e em atmosfera modificada, com valores superiores para aqueles produtos.

Quanto às leveduras, nos paiois da fábrica A as contagens nos tempos 0 e 9 não diferem significativamente entre si (Figura 45). Por outro lado, os resultados dos tempos 3 e 6 foram diferentes entre si e significativamente inferiores aos dos tempos 0 e 9. Nos produtos da fábrica B as contagens realizadas no tempo 3 foram significativamente inferiores às verificadas nos tempos 0 e 6. As contagens registadas no tempo 9 foram significativamente inferiores às do tempo 0.

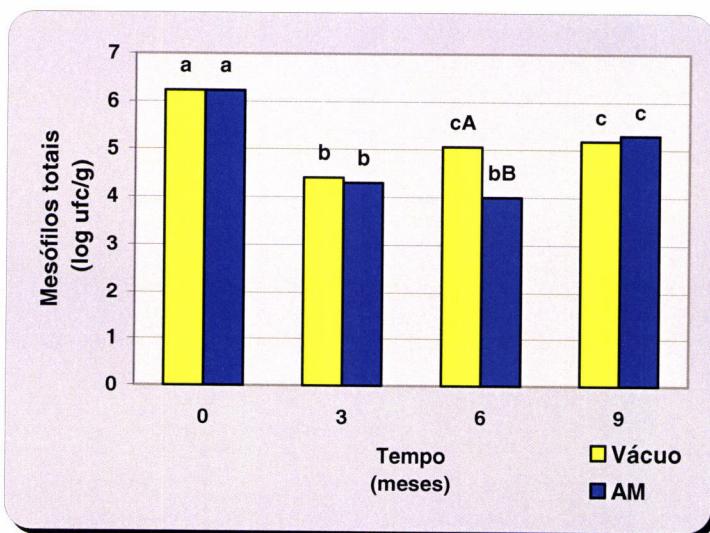


Figura 44 – Conservação de paio de porco Alentejano – mesófilos totais: representação gráfica da comparação de médias para a interacção modo de conservação x tempo de conservação.

Nota: para o mesmo modo de conservação, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

No tempo 6, os resultados dos enchidos da fábrica A foram significativamente inferiores aos da outra fábrica. Em todos os outros tempos os resultados da fábrica A foram significativamente superiores.

Nos enchidos de ambas as fábricas as contagens de *Lactobacillus* spp. baixaram de forma significativa entre os tempos 0 e 6 (Figura 46); também para os paiois de ambas as fábricas ocorreu uma subida entre os tempos 6 e 9, embora significativa apenas para os produtos da fábrica A.

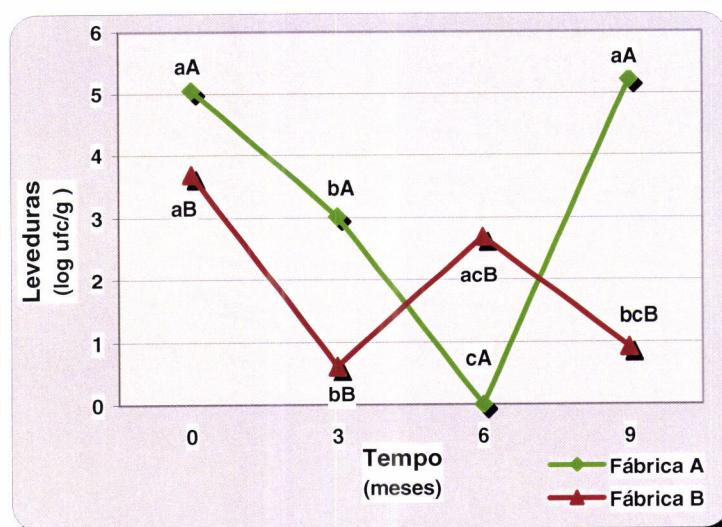


Figura 45 – Conservação de paio de porco Alentejano – leveduras: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

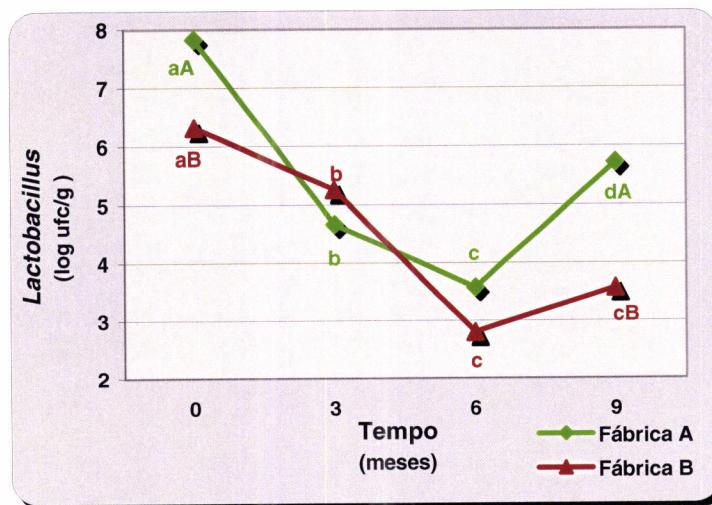


Figura 46 – Conservação de paio de porco Alentejano – *Lactobacillus* spp.: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Tanto no inicio do estudo de conservação (tempo 0) como no seu termo (tempo 9), as contagens de *Lactobacillus* spp. dos paio da fábrica A foram significativamente superiores.

A evolução das bactérias ácido lácticas ao longo do tempo nos produtos da fábrica A (Figura 47) é muito semelhante à verificada para *Lactobacillus* spp. nos mesmos produtos. Quanto aos paio produzidos na fábrica B, a evolução é também semelhante até aos 6 meses de conservação. Contudo, entre os tempos 6 e 9 as contagens de bactérias ácido lácticas diminuíram significativamente.

As contagens daquelas bactérias foram sempre superiores nos enchidos da fábrica A e a diferença apenas não foi significativa no tempo 6.

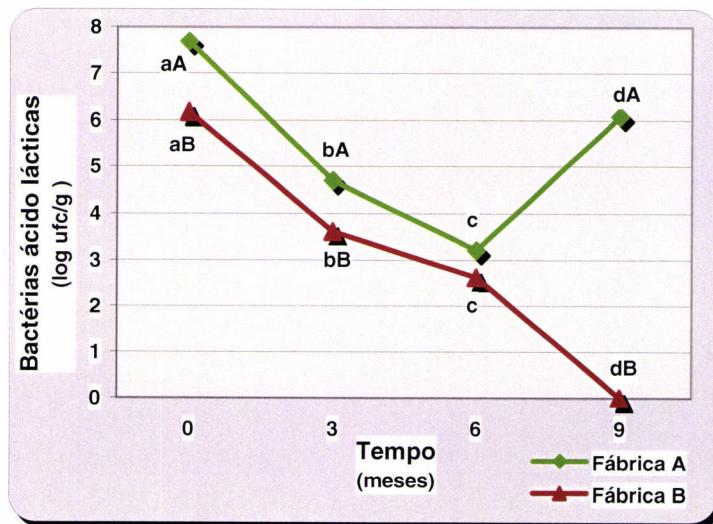


Figura 47 – Conservação de paio de porco Alentejano – bactérias ácido lácticas: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

No que respeita às contagens de *Micrococcaceae*, os paio da fábrica B, à excepção do tempo 0, apresentaram valores sempre significativamente superiores aos da fábrica A (Figura 48).

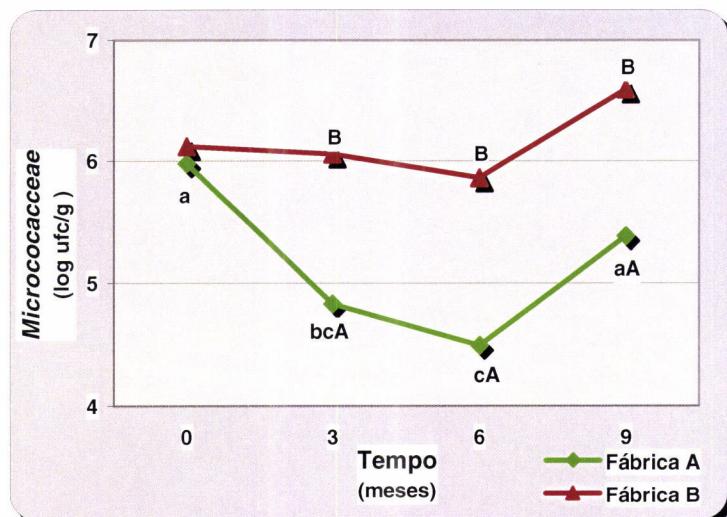


Figura 48 – Conservação de paio de porco Alentejano – *Micrococcaceae*: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Como já havia sido referido a propósito da discussão do Quadro 62.3, nos produtos da fábrica A as contagens de *Enterobacteriaceae* foram sempre baixas até ao tempo 6, subindo abruptamente entre os tempos 6 e 9 (Figura 49). Nos paios da fábrica B os valores foram sempre baixos e sem diferenças significativas entre si.

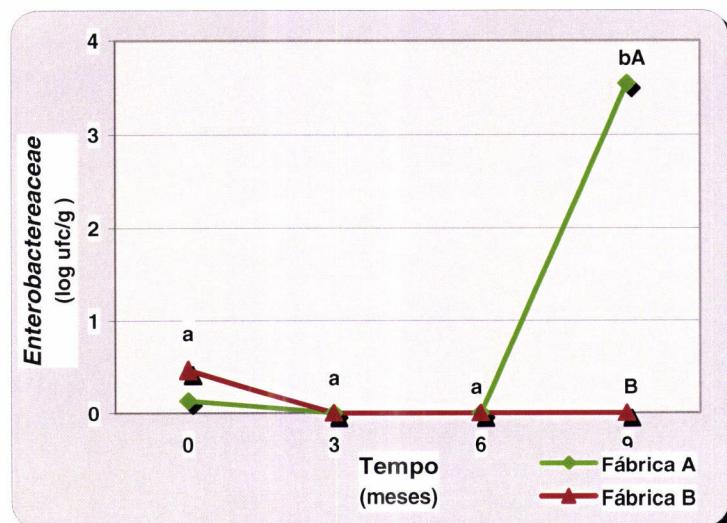


Figura 49 – Conservação de paio de porco Alentejano – *Enterobacteriaceae*: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

Quanto às contagens de *Streptococci* do grupo D (Figura 50), os valores decresceram para níveis inferiores ao limiar de detecção do método utilizado (paio da fábrica A) ou muito próximo disso (paio da fábrica B). Nos produtos da fábrica B não houve variações significativas nas contagens ao longo do tempo de conservação enquanto os produtos da fábrica A evidenciaram um aumento das contagens entre os tempos 0 e 3, sendo os valores registados neste último tempo significativamente superiores aos dos tempos 6 e 9.

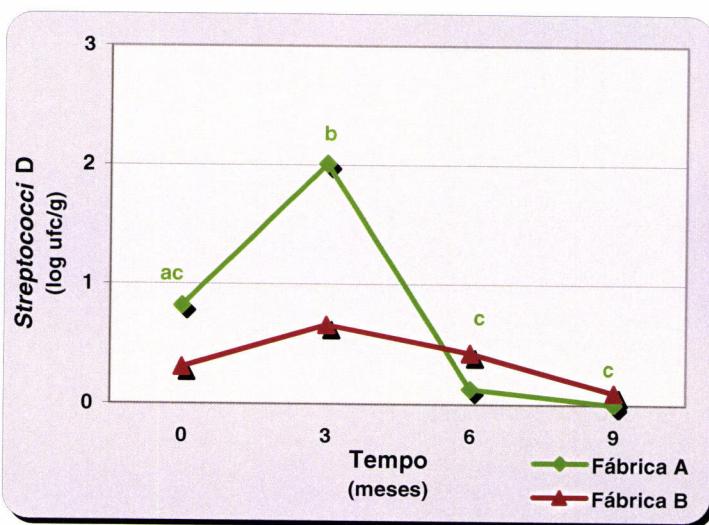


Figura 50 – Conservação de paio de porco Alentejano – *Streptococci* do grupo D: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

O número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, no tempo 3, foi idêntico nos produtos de ambas as fábricas (Figura 51). Em todos os outros tempos aquele número foi superior nos produtos da fábrica B, apenas de forma significativa aos 9 meses de conservação.

Na fábrica A, o número de esporos não variou de modo significativo ao longo do tempo de conservação, enquanto nos produtos da fábrica B se verificou uma subida do número de esporos desde o tempo 0 até ao tempo 9, sendo os valores relativos a este último tempo significativamente superiores aos do tempo 0.

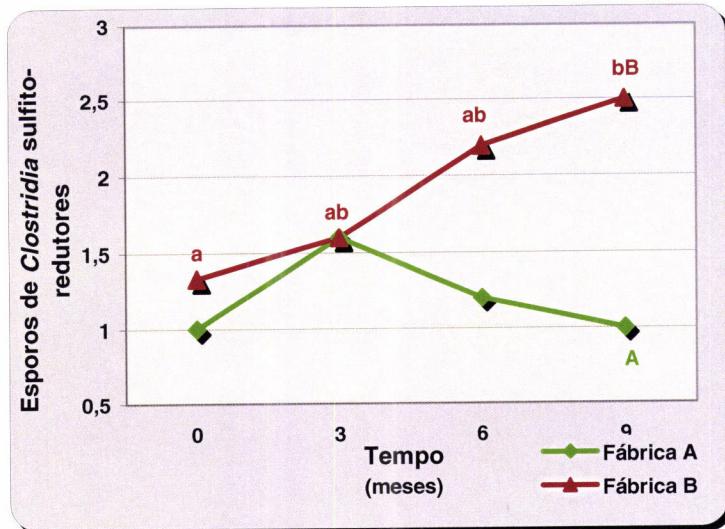


Figura 51 – Conservação de paio de porco Alentejano – esporos de *Clostridium* sulfito-redutores (nº de esporos/g): representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

12.5 - Análise Sensorial

De um modo geral, é muito complexo o recurso a provas sensoriais para estabelecer todos os atributos que contribuem para a qualidade de um alimento. Implica muito tempo e muito trabalho e podem ocorrer erros devido à subjectividade da avaliação humana. Contudo, ainda não existem instrumentos que possam efectivamente substituir o ditame humano. Por outro lado, as análises colorimétricas, de textura, a análise de compostos voláteis com recurso à cromatografia ou da utilização do “nariz electrónico” e as análises químicas, podem proporcionar boas correlações unidimensionais entre os atributos sensoriais individuais e a cor, a textura e o sabor. No entanto, as respostas sensoriais são mais complexas devido à integração simultânea de múltiplos sinais (aspecto, aroma, sabor, textura, entre outros) que o provador associa, interpreta e avalia, com base na sua experiência.

A análise de variância para os resultados da análise sensorial é apresentada no Quadro 63. A leitura deste quadro mostra que para o factor fábrica apenas os atributos marmoreado e fibrosidade não apresentaram diferenças significativas. Quanto ao modo de conservação, apenas o atributo sabores estranhos apresentou diferenças significativas ($p<0,05$). Quando considerado o factor tempo de conservação, foram quatro os atributos que não variaram de forma significativa ao longo do tempo: marmoreado, tenrura, fibrosidade e intensidade da salga.

As interacções fábrica x modo de conservação e modo de conservação x tempo de conservação não foram significativas para nenhum dos atributos. A interacção fábrica x tempo de conservação foi significativa para os atributos cores estranhas ($p<0,05$), intensidade do aroma ($p<0,05$), suculência ($p<0,001$), sabores estranhos ($p<0,001$) e apreciação global ($p<0,001$).

Quadro 63– Conservação do paio de porco Alentejano: análise de variância para resultados da análise sensorial, considerando os factores fábrica, modo de conservação e tempo de conservação.

Atributos	Factores			Interacções		
	Fábrica	Modo Conserv.	Tempo Conserv.	1x2	1x3	2x3
	(1) G.L.=1	(2) G.L.=1	(3) G.L.=3	G.L.=1	G.L.=3	G.L.=3
Intensidade da cor	$F=73,5121$ $p=0,0000***$	$F=1,4333$ $p=0,2314$	$F=3,7137$ $p=0,0112*$	$F=0,3181$ $p=0,5729$	$F=0,5988$ $p=0,6158$	$F=0,3339$ $p=0,8009$
Cores estranhas	$F=93,8754$ $p=0,0000***$	$F=0,7419$ $p=0,3892$	$F=10,0846$ $p=0,0000***$	$F=2,6196$ $p=0,1058$	$F=2,6876$ $p=0,0451*$	$F=0,6872$ $p=0,5599$
Marmoreado	$F=1,6856$ $p=0,1944$	$F=0,0435$ $p=0,8349$	$F=1,2309$ $p=0,2970$	$F=0,9551$ $p=0,3286$	$F=2,0803$ $p=0,1010$	$F=0,1749$ $p=0,9134$
Intensidade do aroma	$F=19,7983$ $p=0,0000***$	$F=2,3160$ $p=0,1283$	$F=10,2711$ $p=0,0000***$	$F=0,8259$ $p=0,3636$	$F=2,8156$ $p=0,0380*$	$F=0,6972$ $p=0,5537$
Aromas estranhos	$F=36,9955$ $p=0,0000***$	$F=0,7697$ $p=0,3804$	$F=3,4669$ $p=0,0157*$	$F=0,0884$ $p=0,7663$	$F=1,8102$ $p=0,1433$	$F=0,2028$ $p=0,8945$
Tenrura	$F=7,3787$ $p=0,0067**$	$F=0,9366$ $p=0,3333$	$F=0,4470$ $p=0,7194$	$F=0,0469$ $p=0,8286$	$F=1,8869$ $p=0,1298$	$F=0,6012$ $p=0,6143$
Fibrosidade	$F=0,4944$ $p=0,4821$	$F=0,0084$ $p=0,9271$	$F=1,1112$ $p=0,3434$	$F=0,0912$ $p=0,7627$	$F=0,8717$ $p=0,4551$	$F=0,2131$ $p=0,8874$
Suculência	$F=126,4906$ $p=0,0000***$	$F=0,3144$ $p=0,5751$	$F=17,5520$ $p=0,0000***$	$F=0,0047$ $p=0,9452$	$F=12,8412$ $p=0,0000***$	$F=1,4802$ $p=0,2181$
Intensidade do sabor	$F=7,4149$ $p=0,0065**$	$F=0,3178$ $p=0,5730$	$F=5,7924$ $p=0,0006***$	$F=1,1111$ $p=0,2920$	$F=1,8860$ $p=0,1300$	$F=0,0764$ $p=0,9727$
Sabores estranhos	$F=98,8972$ $p=0,0000***$	$F=5,0452$ $p=0,0248*$	$F=27,9391$ $p=0,0000***$	$F=2,9740$ $p=0,0849$	$F=11,3350$ $p=0,0000***$	$F=0,7918$ $p=0,4984$
Intensidade da salga	$F=27,0547$ $p=0,0000***$	$F=0,8314$ $p=0,3620$	$F=1,4690$ $p=0,2212$	$F=0,0058$ $p=0,9394$	$F=0,1785$ $p=0,9110$	$F=0,2410$ $p=0,8678$
Apreciação global	$F=160,4230$ $p=0,0000***$	$F=2,5149$ $p=0,1130$	$F=24,6196$ $p=0,0000***$	$F=1,5914$ $p=0,2073$	$F=11,9933$ $p=0,0000***$	$F=0,9263$ $p=0,4273$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade; Modo Conserv. – Modo de conservação; Tempo Conserv. – Tempo de conservação.

Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Uma vez mais, como tem acontecido com outras análises feitas no âmbito deste estudo, as principais fontes de variação na análise sensorial foram as diferenças que resultaram dos distintos processos de fabrico adoptados em uma e outra fábricas. O modo

de conservação não teve influência nas características sensoriais do paio de porco Alentejano.

Os valores das médias e dos desvios-padrão para os atributos considerados na análise sensorial são apresentados nos Quadros 64.1 e 64.2.

As pontuações atribuídas pelo painel de provadores ao atributo intensidade da cor decresceram sempre entre os tempos 0 e 3 e subiram sempre entre os tempos 3 e 6. Entre os tempos 6 e 9, os paios da fábrica B conservados em atmosfera modificada apresentaram um decréscimo nas pontuações. Ainda entre os tempos 6 e 9, os paios da fábrica A mantidos sob atmosfera modificada e os da fábrica B mantidos sob vácuo, experimentaram uma subida de uma unidade, aproximadamente.

Comparando os resultados do início com os do termo do estudo, os paios da fábrica B mantidos em atmosfera modificada foram os únicos que apresentaram uma descida mais sensível nas pontuações para a intensidade da cor.

Estes resultados sensoriais, de um modo geral, são coerentes com a medição objectiva da cor, principalmente o parâmetro a^* , apresentada no Quadro 56.2.

Para o atributo cores estranhas as pontuações foram tendencialmente crescentes ao longo do tempo, para os produtos de ambas as fábricas, embora com valores significativamente superiores nos produtos da fábrica A.

Ainda a propósito do mesmo atributo, aos 6 meses de conservação as pontuações foram, de um modo geral, semelhantes ou mesmo mais baixas que as dos tempos anteriores e sempre significativamente mais baixas que as registadas aos 9 meses de conservação.

No marmoreado não houve diferenças significativas, nem entre os produtos de ambas as fábricas nem ao longo do tempo de conservação. Estes resultados evidenciaram as semelhanças entre as dimensões dos fragmentos e a proporção entre carne e gordura das massas de ambas as fábricas, traduzidas na regularidade do aspecto quando compararmos a superfície de corte de vários enchidos.

Quanto à intensidade do aroma, nos produtos da fábrica A houve um decréscimo da pontuação entre os tempos 0 e 3, seguido de um acréscimo entre os tempos 3 e 6, sendo as pontuações no tempo 6 superiores às registadas no tempo 0, ocorrendo depois nova descida dos valores entre os tempos 6 e 9.

Nos paios produzidos na fábrica B e conservados sob vácuo, as pontuações para a intensidade do aroma decresceram lentamente até ao tempo 6, ocorrendo uma descida mais significativa entre os tempos 6 e 9. Os produtos da mesma fábrica mantidos em atmosfera modificada tiveram pontuações notoriamente mais baixas (6 pontos) no tempo 3, comparativamente ao tempo 0, mantendo-se depois os valores até ao final do estudo.

As pontuações atribuídas aos paios da fábrica B para a intensidade do aroma foram significativamente superiores às registadas para os produtos da outra fábrica.

O painel de provadores atribuiu pontuações muito variáveis para o atributo aromas estranhos, o que resultou num desvio-padrão elevado, tal como havia acontecido na avaliação do atributo cores estranhas.

As pontuações dadas aos produtos da fábrica A para os aromas estranhos foram significativamente superiores às registadas para os paios da fábrica B.

Quadro 64.1 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados da análise sensorial (valores obtidos numa escala pontuável entre 0 e 100), considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	Intensidade da cor	Cores estranhas	Marmoreado	Intensidade do aroma	Aromas estranhos	Tenrura
Fábrica A	Vácuo	0 m	63,63 ±16,87	4,53 ±9,46	56,13 ±19,79	61,68 ±16,22	5,85 ±12,55	66,81 ±10,74
		3 m	61,11 ±15,94	4,10 ±8,60	56,26 ±18,89	56,24 ±15,74	3,95 ±8,18	67,14 ±11,26
		6 m	62,50 ±14,42	5,03 ±10,21	56,56 ±16,98	65,31 ±13,22	4,78 ±10,00	70,03 ±12,54
		9 m	60,53 ±11,92	10,58 ±13,78	55,23 ±19,17	56,47 ±18,11	6,63 ±11,94	66,13 ±10,69
	Atmosfera Modificada	0 m	63,63 ±16,87	4,53 ±9,46	56,13 ±19,79	61,68 ±16,22	5,85 ±12,55	66,81 ±10,74
		3 m	58,42 ±14,57	5,28 ±9,93	59,23 ±17,41	57,55 ±13,69	2,65 ±6,13	65,90 ±10,82
		6 m	61,28 ±13,97	3,09 ±6,63	59,77 ±15,28	62,02 ±11,20	4,72 ±10,36	67,36 ±12,90
		9 m	62,35 ±13,28	7,24 ±11,62	54,62 ±19,37	56,34 ±16,25	5,83 ±9,59	66,82 ±10,23
	Vácuo	0 m	70,40 ±13,24	1,26 ±3,88	61,64 ±20,70	66,76 ±13,99	2,22 ±5,78	69,86 ±12,59
		3 m	68,56 ±13,36	1,31 ±4,23	57,55 ±19,79	65,53 ±13,38	1,98 ±4,73	69,16 ±11,18
		6 m	69,08 ±13,21	0,99 ±4,18	58,95 ±20,36	64,54 ±13,73	2,05 ±5,09	68,12 ±10,86
		9 m	70,07 ±13,46	2,01 ±6,24	56,71 ±20,57	61,38 ±15,53	3,21 ±7,77	69,78 ±12,18
	Atmosfera Modificada	0 m	70,40 ±13,24	1,26 ±3,88	61,64 ±20,70	66,76 ±13,99	2,22 ±5,78	69,86 ±12,59
		3 m	68,35 ±13,90	0,99 ±2,97	57,67 ±19,89	60,78 ±15,92	2,02 ±5,04	67,73 ±12,08
		6 m	69,25 ±12,51	1,31 ±4,89	55,67 ±20,35	61,53 ±14,10	1,81 ±4,44	67,19 ±11,09
		9 m	64,26 ±15,03	3,26 ±8,36	56,26 ±23,05	60,75 ±15,17	2,35 ±7,11	70,09 ±11,50

Quadro 64.2 – Conservação do paio de porco Alentejano: médias e desvios padrão para resultados da análise sensorial (valores obtidos numa escala pontuável entre 0 e 100), considerando 2 fábricas (A e B), 2 tipos de conservação (vácuo e atmosfera modificada) e 4 tempos de conservação (0, 3, 6 e 9 meses).

	Modo de conservação	Tempo de conservação	Fibrosidade	Suculência	Intensidade do sabor	Sabores estranhos	Intensidade da salga	Apreciação global
Fábrica A	Vácuo	0 m	32,18 ±11,23	64,61 ±15,92	67,47 ±14,79	5,34 ±8,90	57,39 ±13,45	59,08 ±16,12
		3 m	33,94 ±10,90	58,60 ±17,63	63,16 ±16,32	10,45 ±18,88	59,30 ±13,05	51,44 ±18,02
		6 m	31,94 ±12,95	54,79 ±18,37	65,37 ±16,91	16,63 ±20,01	59,37 ±8,95	43,43 ±20,19
		9 m	33,22 ±11,35	47,29 ±18,35	68,77 ±16,67	20,84 ±21,03	59,16 ±8,20	37,83 ±16,53
	Atmosfera Modificada	0 m	32,18 ±11,23	64,61 ±15,92	67,47 ±14,79	5,34 ±8,90	57,39 ±13,45	59,08 ±16,12
		3 m	34,34 ±12,37	57,20 ±18,23	61,02 ±17,20	6,88 ±12,68	59,37 ±11,39	51,86 ±18,57
		6 m	32,45 ±13,72	50,30 ±21,33	63,55 ±16,48	11,02 ±16,23	58,19 ±8,18	49,25 ±21,34
		9 m	31,71 ±13,30	50,82 ±20,04	67,18 ±13,90	18,53 ±20,18	57,44 ±9,75	42,94 ±19,47
Fábrica B	Vácuo	0 m	31,71 ±13,31	67,47 ±15,32	68,68 ±14,88	3,33 ±7,36	61,18 ±13,22	64,21 ±15,80
		3 m	31,71 ±12,73	66,96 ±15,38	67,31 ±14,31	3,94 ±8,41	62,56 ±13,07	62,16 ±16,09
		6 m	33,67 ±11,74	66,14 ±13,18	65,42 ±14,86	4,95 ±13,32	62,72 ±11,53	60,25 ±17,57
		9 m	31,32 ±11,78	66,71 ±15,93	69,08 ±12,48	7,29 ±13,70	63,50 ±12,94	60,67 ±16,28
	Atmosfera Modificada	0 m	31,71 ±13,31	67,47 ±15,32	68,68 ±14,88	3,33 ±7,36	61,18 ±13,22	64,21 ±15,80
		3 m	32,98 ±12,52	66,59 ±14,35	67,65 ±12,95	3,42 ±7,51	62,23 ±12,22	61,53 ±16,11
		6 m	33,58 ±12,28	63,02 ±14,48	66,47 ±13,60	5,88 ±14,99	61,94 ±10,54	59,59 ±17,26
		9 m	31,26 ±12,80	68,36 ±13,08	69,38 ±12,86	5,36 ±12,69	62,21 ±11,76	63,26 ±14,87

Ao longo da conservação os valores nos tempos 3 e 6 foram inferiores aos registados no tempo 0 e os valores no tempo 9 foram muito semelhantes ou ligeiramente superiores aos do tempo 0.

As pontuações quanto à tenrura, não variaram de modo significativo ao longo do tempo. Contudo, os valores atribuídos aos produtos da fábrica B foram significativamente superiores. Estas pontuações são confirmadas por alguns parâmetros da análise reológica

(Quadros 60.1 e 60.2), designadamente, dureza, masticabilidade, força de corte e trabalho de corte.

Por outro lado, o painel de provadores atribuiu, para o atributo fibrosidade, pontuações muito semelhantes para todas as amostras que analisou. Deste modo, não houve diferenças significativas nem entre os produtos de ambas as fábricas, nem entre os conservados em vácuo ou sob atmosfera modificada; também não se verificaram diferenças significativas ao longo do tempo de conservação.

Quanto à suculência, foram encontrados valores significativamente superiores nos produtos da fábrica B, tal como havia acontecido para a tenrura, existindo uma relação estreita entre estes dois atributos.

Ao longo do tempo, nos paioes da fábrica B os valores mantiveram-se relativamente constantes enquanto que nos paioes da fábrica A as pontuações decresceram ao longo do tempo.

O atributo intensidade do sabor teve pontuações significativamente mais elevadas nos produtos da fábrica B.

As pontuações registadas nos tempos 3 e 6 foram sempre inferiores às dos tempos 0 e 9, sendo os valores entre estes dois tempos muito semelhantes, com tendência para valores superiores no tempo 9.

Os sabores estranhos foram detectados de forma muito diferente pelo painel de provadores, com valores de desvios-padrão elevados, tal como havia acontecido para os atributos cores estranhas e aromas estranhos.

Também como tinha sucedido com os atributos cores estranhas e aromas estranhos, as pontuações dadas aos sabores estranhos detectados nos produtos da fábrica A foram significativamente superiores.

As pontuações atribuídas àqueles sabores aumentaram ao longo do tempo de conservação, embora de forma muito mais notória nos paioes produzidos na fábrica A.

Quanto ao atributo intensidade da salga, cuja pontuação ideal seria 50, verificamos que todos os produtos apresentaram teores de sal que o painel de provadores considerou acima do ideal.

Tal como já havia sido apresentado nos capítulos 11.1 (análises físico-químicas realizadas ao longo do processo de fabrico) e 12.1 (análises físico-químicas realizadas durante a conservação), o teor de cloretos foi significativamente superior nos produtos da fábrica B e a intensidade da salga, avaliada sensorialmente, também foi significativamente superior nos paioes produzidos nessa mesma fábrica.

Ao longo do tempo não foram encontradas diferenças significativas para o atributo intensidade da salga.

Os valores com que o painel de provadores pontuou a apreciação global foram sempre decrescentes ao longo do tempo para os paioes da fábrica A, principalmente nas amostras mantidas sob vácuo.

Se considerarmos como limite mínimo para a aceitação dos enchidos a pontuação de 50 (na escala que usámos, pontuável entre 0 e 100) para o atributo apreciação global, verificamos que, relativamente aos produtos da fábrica A, os paioes mantidos sob vácuo, do ponto de vista sensorial apenas foram aceitáveis até aos 3 meses de conservação. Para os produtos da mesma fábrica e mantidos em atmosfera modificada, as suas características sensoriais permaneceram aceitáveis até aos 6 meses.

Ainda a propósito dos produtos da fábrica A, o principal atributo responsável por aqueles resultados foram os sabores estranhos, como atestam os resultados da análise sensorial para aquele atributo.

Em nosso entender, os sabores estranhos detectados naqueles produtos devem-se principalmente às alterações proteolíticas mais intensas verificadas naqueles produtos, tal como atestam os resultados do ABVT apresentados em 12.1. Estas alterações, que ocorreram de forma mais intensa nos produtos da fábrica A por estes se encontrarem menos curados do que os da fábrica B no momento em que foram embalados, são também responsáveis pelas modificações na estrutura proteica da parte magra do enchido, tornando-a mais branda. O consumidor de enchidos pretende que aqueles produtos tenham uma consistência mínima, abaixo da qual rejeita o produto. Do ponto de vista prático, o consumidor pretende que o enchido não seja nem demasiado duro nem demasiado brando. Como se pode verificar pelos resultados das análises reológicas (capítulo 12.3), nomeadamente através dos parâmetros dureza, coesividade e força e trabalho de corte, a textura dos paios produzidos na fábrica A foi significativamente alterada ao longo da conservação. Embora estes resultados não se tenham reflectido na avaliação do atributo tenrura, eles acabaram por ser considerados no momento em que o provador pontuou o atributo apreciação global.

Nos produtos da fábrica B, mais curados que os da outra fábrica no momento da embalagem, notou-se relativamente à apreciação global uma tendência para valores decrescentes à medida que aumentou o tempo de conservação. Contudo, esta tendência é bastante suave, apresentando as médias valores sempre superiores aos 50 pontos.

Pelo exposto se depreende que para conservar à temperatura ambiente, enchidos por períodos de tempo prolongados (superiores a 3 meses) estes devem estar bem curados no momento da embalagem.

O sabor, principalmente, e o aroma são os atributos sensoriais que mais influem na qualidade global de um produto alimentar (Enser, 1987; Naes *et al.*, 1992; Alvarez, 1994; Garcia-Garrido *et al.*, 1999; Cava *et al.*, 2000; Ojeda *et al.*, 2002). No estudo de conservação que levámos a cabo, os aromas e os sabores estranhos, juntamente com os atributos relacionados com a textura dos paios, foram os mais determinantes para avaliar a qualidade global destes produtos.

Trabalhos com incidência sobre análise sensorial de enchidos têm sido apresentados por um número muito considerável de autores (Elias, 1993; Stahnke, 1995b; Ansorena *et al.*, 1997; Üren e Babayigit, 1997; Zanardi *et al.*; 1999; Byun *et al.*, 2001; Fernández – Fernández *et al.*, 2001; Zanardi *et al.*, 2002; Muguerza *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2004; Hoz *et al.*, 2004; Turubatovic *et al.*, 2004; Ulmer e Fischer, 2004), embora muito poucos se refiram a produtos conservados sob vácuo ou atmosferas modificadas.

Elias (1993) conservou, durante 8 meses, sob vácuo e à temperatura de 6 - 7°C, porções, com o peso aproximado de 250 g, e conjuntos de fatias, com peso idêntico, de presunto de porco Alentejano. A apreciação global das amostras teve pontuações crescentes entre os tempos 0 e 5 meses, decrescendo ligeiramente entre os tempos 5 e 8 meses. Contudo, as pontuações atribuídas às amostras ao cabo de 8 meses de conservação foram superiores às pontuações dadas no início do estudo (tempo 0). Ao longo do tempo em que decorreu este trabalho, as pontuações dadas aos atributos intensidade da cor, intensidade do aroma, suculência e intensidade do sabor, apresentaram uma clara tendência para aumentar.

Zanardi *et al.* (1999) embalaram sob vácuo e sob um tipo de atmosfera modificada (15% CO₂; 85% N₂) fatias de presunto de Parma com 15 meses de cura, que se mantiveram

sob refrigeração (4°C) e expostas a iluminação produzida por lâmpadas fluorescentes. Ao termo de 70 dias de conservação, para as fatias mantidas sob atmosfera modificada, e de 65 dias, para as fatias conservadas sob vácuo, um painel de provadores considerou a cor imprópria devido ao aparecimento de coloração castanha, resultante da formação de metamioglobina.

Zanardi *et al.* (2002) embalaram, sob vácuo e sob uma atmosfera modificada composta por 100% de N_2 , fatias de salame de Milão que foram mantidas a 4°C , durante 60 dias, com uma exposição de 12 horas diárias a luzes fluorescentes. Encontraram uma maior instabilidade, tanto na composição lipídica como na cor, nas fatias conservadas sob vácuo, que atribuíram aos teores de oxigénio residual. Com efeito, estudos realizados por Møller *et al.* (2000) mostraram que fatias de fiambre pasteurizado mantidas em embalagem contendo uma atmosfera modificada com 0,1% de oxigénio residual não sofreram alterações significativas na cor durante a exposição à luz. Contudo aquelas alterações foram evidentes quando os teores de oxigénio residual foram de 0,5%. Neste trabalho, após 27 dias de conservação as fatias embaladas com baixos valores residuais de oxigénio (0,1%) foram consideradas sensorialmente diferentes daquelas cujas embalagens continham 0,5% de oxigénio. Todavia, os valores do TBA (índice de ácido tiobarbitúrico), outra grandeza para medição da degradação lipídica, não diferiram significativamente entre as fatias embaladas com 0,1% e 0,5% de oxigénio residual.

Tal como se referiu a propósito da discussão do Quadro 63, as interacções significativas envolveram os factores fábrica e tempo de conservação.

As representações gráficas das interacções que foram significativas (Figuras 52 a 56) confirmam a discussão feita a propósito dos Quadros 64.1 e 64.2.

Com efeito, as interacções para os atributos cores estranhas (Figura 52) e sabores estranhos (Figura 55) mostram valores sempre superiores para os enchidos produzidos na fábrica A. Relativamente às cores estranhas, à excepção do tempo 6, em todos os outros tempos as médias para os paiois da fábrica A foram significativamente superiores às dos produtos da outra fábrica, sendo os valores obtidos no tempo 9 para os produtos daquela fábrica significativamente superiores aos dos registados nos restantes tempos para a mesma fábrica. Nos paiois da fábrica B não se verificaram diferenças significativas entre as pontuações atribuídas ao longo do tempo de conservação. Quanto aos valores dos sabores estranhos detectados, nos produtos de ambas as fábricas eles aumentaram ao longo do tempo, embora apenas de modo significativo nos produtos da fábrica A. À excepção das pontuações dadas no tempo 0, em todos os outros tempos os valores dos paiois daquela fábrica foram significativamente superiores aos dos enchidos procedentes da fábrica B.

Por outro lado, as interacções para os atributos intensidade do aroma (Figura 53), suculência (Figura 54) e apreciação global (Figura 56), mostram que, à excepção dos valores da intensidade do aroma registados no tempo 6, as pontuações dadas aos enchidos da fábrica B foram sempre superiores às atribuídas aos produtos da outra fábrica, quase sempre de forma significativa.

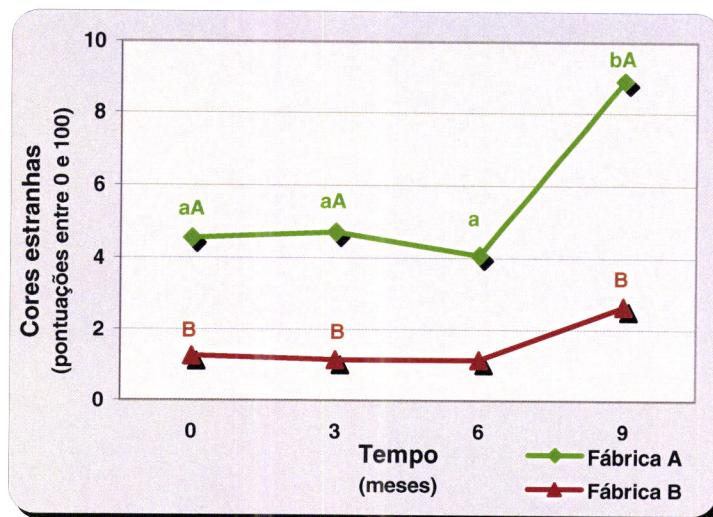


Figura 52 – Conservação de paio de porco Alentejano – cores estranhas: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

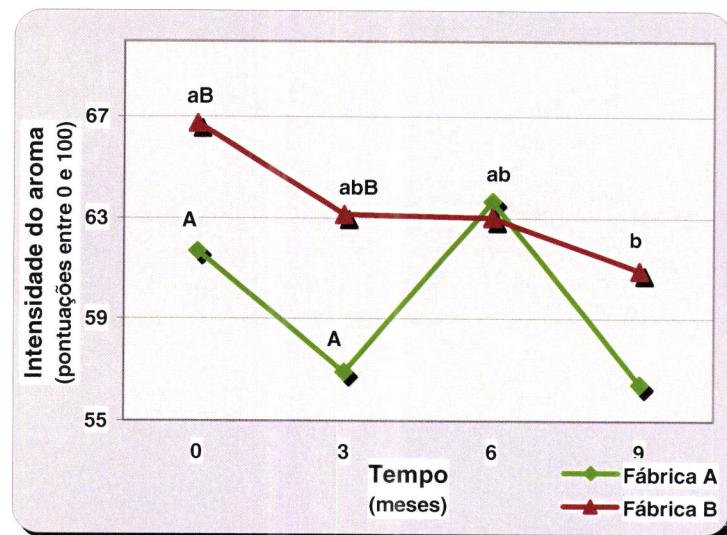


Figura 53 – Conservação de paio de porco Alentejano – intensidade do aroma: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

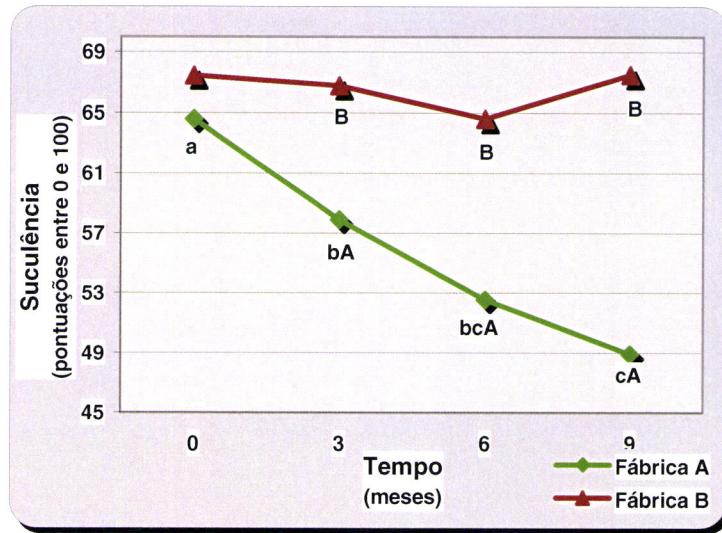


Figura 54 – Conservação de paio de porco Alentejano – suculência: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

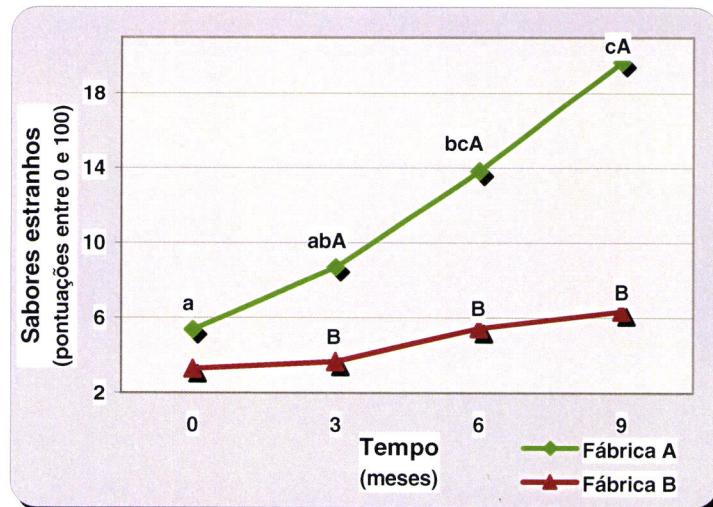


Figura 55 – Conservação de paio de porco Alentejano – sabores estranhos: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes

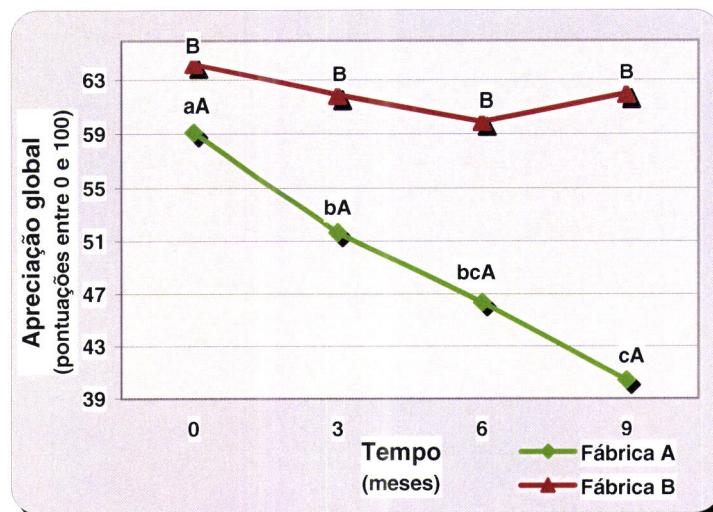


Figura 56 – Conservação de paio de porco Alentejano – apreciação global: representação gráfica da comparação de médias para a interacção fábrica x tempo de conservação.

Nota: para a mesma fábrica, letras minúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes. Para o mesmo tempo, letras maiúsculas diferentes representam médias significativamente diferentes.

13 - Selecção de estirpes da família *Micrococcaceae* e do género *Lactobacillus* para utilização como culturas de arranque

Neste capítulo do trabalho estirpes da família *Micrococcaceae* e do género *Lactobacillus* foram submetidas a provas selectivas por forma a encontrar algumas com características que permitam a sua utilização como culturas de arranque em enchidos tradicionais alentejanos.

Como base de trabalho utilizaram-se 61 estirpes que haviam sido isoladas do meio de cultura “Manitol Salt Agar” (MSA), supostamente da família *Micrococcaceae*, e 150 estirpes isoladas de placas com agar “Man, Rogosa, Sharpe” (MRS), supostamente do género *Lactobacillus*. Estas estirpes pertenciam à microbiota autóctone de vários enchidos tradicionais alentejanos (chouriço, morcela, paio e lombo) em diferentes fases do processo de fabrico, procedentes de 6 fábricas instaladas no Alentejo.

Os testes de selecção realizados consistiram em provas de identificação prévia, provas selectivas e provas complementares.

Nas provas de identificação prévia fizeram-se os testes de coloração pelo método de Gram, produção de catalase e morfologia celular. Relativamente às estirpes de *Micrococcaceae*, foi ainda estudado o seu crescimento em condições de anaerobiose.

Nas provas selectivas foi testada a produção de CO₂ (apenas para as bactérias do género *Lactobacillus*), a capacidade nitrato-redutora, a tolerância a 100 ppm de nitrito de sódio (Na NO₂), a capacidade de crescimento com diferentes concentrações de cloreto de sódio e a capacidade de crescimento a baixas temperaturas (4,5°C e 7,0°C), tanto em aerobiose como em anaerobiose.

Das provas complementares fizeram parte a avaliação das capacidades proteolítica e lipolítica, a produção de bacteriocinas e a sobrevivência à liofilização.

13.1 - Provas de identificação prévia

No Quadro 65 são apresentados os resultados das provas de coloração de Gram e da produção de catalase realizadas sobre as 61 estirpes de *Micrococcaceae* que constituíram a colecção com que se iniciou o estudo.

Todas as estirpes da colecção, que haviam sido isoladas do meio de cultura MSA (“Manitol Salt Agar”), apresentaram a morfologia de cocos. Das 61 estirpes, 49 (80,3%) revelaram-se Gram-positivas e produtoras de catalase.

Selgas *et al.* (1986) só recuperaram 27% de cocos Gram-positivos, catalase-positivos de uma colecção de mais de 600 estirpes. Patarata (2002) obteve resultados semelhantes a estes ao estudar uma colecção de estirpes isoladas de enchidos tradicionais dos distritos de Bragança e Vila Real, tendo considerado reduzida a selectividade do meio MSA, baseada na elevada concentração de cloreto de sódio (7,5%). No entanto, Carrascosa (1989), Garcia *et al.* (1995) e Samelis *et al.* (1998) referem taxas de formas típicas de microrganismos compatíveis com *Micrococcaceae*, isolados em MSA, superiores a 90%.

Quadro 65 – Resultados das provas de coloração de Gram e produção de catalase sobre as estirpes de *Micrococcaceae* submetidas às provas de identificação prévia.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em selecção	Nº de estirpes Gram +	Nº de estirpes Gram -	Nº de estirpes catalase +	Nº de estirpes catalase -
A	Chouriço	3	2	2	0	2	0
	Chouriço	4	4	4	0	4	0
	Lombo	3	1	1	0	1	0
	Lombo	4	1	1	0	1	0
	Morcela	3	11	10	1	10	1
	Paio	4	5	5	0	5	0
B	Paio	1	9	6	3	6	3
	Paio	2	10	5	5	5	5
	Paio	3	7	6	1	6	1
C	Morcela	3	3	3	0	3	0
	Paio	2	1	1	0	1	0
D	Morcela	4	1	1	0	1	0
E	Chouriço	1	3	1	2	1	2
	Lombo	3	1	1	0	1	0
F	Chouriço	3	2	2	0	2	0
	TOTAL		61 (100%)	49 (80,3%)	12 (19,7%)	49 (80,3%)	12 (19,7%)

A produção de catalase pelas micrococáceas constitui uma propriedade de extrema importância para a sua utilização como culturas de arranque. A catalase elimina os peróxidos produzidos na carne por vários mecanismos oxidativos, biológicos ou não, protegendo deste modo a cor da carne das reacções de oxidação; também protege a gordura de uma rancificação prematura (Coretti, 1977; Bacus e Brown, 1981; Smith e Palumbo, 1981; Bacus, 1984; Lücke, 1985; Lücke e Hechelmann, 1987; Carrascosa, 1989; Hammes e Hertel, 1998; Garcia-Varona, 2000). Indirectamente, como consequência da estabilização da cor e da inibição da rancidez, a produção de catalase das micrococáceas contribui para melhorar o aroma e o sabor dos produtos de salsicharia (Lücke, 1986; Hammes e Hertel, 1998; Carrascosa, 2001).

O Manual de Bergey considera, dentro da família *Micrococcaceae*, 4 géneros de cocos Gram-positivos e catalase-positivos (Schleifer, 1986). De entre estes géneros, *Stomatococcus* não cresce em presença de 5% de cloreto de sódio pelo que se pensa não constar da nossa coleção, isolada de placas com agar MSA, uma vez que este meio tem uma concentração em sal de 7,5%. Por outro lado, o género *Planococcus*, também incluído na mesma família, somente foi detectado em ambientes marinhos e não é contaminante habitual dos produtos de salsicharia (Lücke, 1986; Rheinbaben e Seipp, 1986) pelo que se considerou nula a possibilidade de integrar a nossa coleção de estirpes de micrococáceas.

Deste modo, as 49 estirpes Gram-positivas e catalase-positivas pertencem à família *Micrococcaceae*, e muito provavelmente aos géneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*.

Como prova taxonómica prévia para chegar ao nível do género utilizou-se o meio de Evans e Kloos (1972).

Relativamente ao estudo do crescimento em anaerobiose (Quadro 66), mediante a utilização do meio de Evans e Kloos (1972), nenhuma das estirpes pertencentes à família *Micrococcaceae* se manifestou como anaeróbia estrita, apresentando todas elas crescimento na zona aeróbia do tubo. Das 49 estirpes submetidas a esta prova, 29 (59,2%) desenvolveram-se tanto na zona aeróbia como na zona anaeróbia e 20 (40,8%) desenvolveram-se apenas na zona aeróbia.

Quadro 66 – Resultados da prova de crescimento em anaerobiose [meio líquido de tioglicolato de Brewer (Evans e Kloos, 1972)] sobre as estirpes de *Micrococcaceae* submetidas às provas de identificação prévia.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em selecção	Nº de estirpes aeróbias estritas	Nº de estirpes anaeróbias facultativas
A	Chouriço	3	2	0	2
	Chouriço	4	4	0	4
	Lombo	3	1	0	1
	Lombo	4	1	0	1
	Morcela	3	10	8	2
	Paio	4	5	1	4
B	Paio	1	6	2	4
	Paio	2	5	0	5
	Paio	3	6	4	2
C	Morcela	3	3	3	0
	Paio	2	1	0	1
D	Morcela	4	1	1	0
E	Chouriço	1	1	1	0
	Lombo	3	1	0	1
F	Chouriço	3	2	0	2
TOTAL		49 (100%)	20 (40,8%)	29 (59,2%)	

Segundo o critério de diferenciação entre o género *Micrococcus* e o género *Staphylococcus* proposto por Evans e Kloos (1972), mediante o uso de tioglicolato de Brewer, as 20 estirpes que se desenvolveram apenas na zona aeróbia pertencem ao género *Micrococcus* e as restantes 29 ao género *Staphylococcus*.

Lücke e Hechelmann (1987) referem que todas as micrococáceas utilizadas como culturas de arranque no fabrico de produtos de salsicharia alemães têm uma capacidade muito débil para se desenvolverem em anaerobiose. Por esta razão, corroboramos a

opinião de Carrascosa (1989) quando diz crer que o crescimento das micrococáceas em anaerobiose é um requisito dispensável numa cultura de arranque para produtos de salsicharia, embora admita que possa ser conveniente.

Lücke (1986) refere que os géneros *Micrococcus* e *Staphylococcus* em substratos cárneos e em anaerobiose se desenvolvem lentamente. Contudo, segundo Carrascosa (1989) e García-Varona (2000), esta lentidão no desenvolvimento não elimina a possibilidade de que este se produza e de que chegue, inclusivamente, a ser maioritário, nos produtos de salsicharia de cura prolongada.

Outros autores que trabalharam sobre este tema não mencionam como selectiva a capacidade de crescimento em anaerobiose para eleger as estirpes da família *Micrococcaceae* a utilizar como culturas de arranque (Petäjä, 1977; Coretti, 1977; Bacus e Brown, 1981; Smith e Palumbo, 1981; Liepe, 1985; Bacus, 1984; Hammes, 1986; Hammes e Hertel, 1998; Garcia-Varona, 2000).

Quanto aos resultados das provas de coloração de Gram e da produção de catalase realizadas sobre *Lactobacillus* spp. (Quadro 67), das 150 estirpes com que se iniciou o estudo, isoladas de agar MRS e mantidas sob congelação até ao início das provas, 17 (11,3%) apresentaram a forma de cocos, revelaram-se Gram-negativas e foram catalase-positivas, pelo que se retiraram do estudo. As restantes 133 estirpes, representando 88,7% da colecção inicial, eram bacilos Gram-positivos e não produtores de catalase, sendo por estas razões consideradas como *Lactobacillus* (Kandler e Weiss, 1986).

Quadro 67 – Resultados das provas de coloração de Gram e produção de catalase sobre as estirpes de *Lactobacillus* spp. submetidas às provas de identificação prévia.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em selecção	Nº de estirpes Gram+	Nº de estirpes Gram -	Nº de estirpes Catalase+	Nº de estirpes Catalase-
A	Chouriço	4	7	6	1	1	6
	Lombo	3	1	1	0	0	1
	Morcela	2	11	11	0	0	11
	Paio	4	4	2	2	2	2
B	Chouriço	1	15	12	3	3	12
	Lombo	3	2	2	0	0	2
	Paio	3	1	1	0	0	1
C	Paio	3	1	1	0	0	1
D	Chouriço	3	1	0	1	1	0
	Paio	3	3	2	1	1	2
E	Chouriço	3	5	4	1	1	4
	Lombo	3	1	1	0	0	1
	Paio	3	2	2	0	0	2
F	Paio	1	10	8	2	2	8
	Paio	2	1	1	0	0	1
	Paio	3	85	79	6	6	79
TOTAL			150 (100%)	133 (88,7%)	17 (11,3%)	17 (11,3%)	133 (88,7%)

Patarata (2002), numa colecção que reuniu de enchidos tradicionais do norte de Portugal, encontrou uma percentagem de formas típicas de bactérias do ácido láctico (bacilos não formadores de endosporos ou cocos, Gram-positivos e catalase-negativos) de 85%.

13.2 - Provas selectivas

Foram consideradas aptas nas provas de identificação prévia, para serem testadas nas provas designadas por selectivas, 49 estirpes da família *Micrococcaceae* (Quadro 68). Destas 49 estirpes, 32 (65,3%) reduziram os nitratos a nitritos, havendo no entanto 8 estirpes que o fizeram com maior intensidade. Todas as 49 estirpes tiveram a capacidade de crescer, tanto na presença de 100 ppm de nitrito de sódio como em meio com 10% e 16% de cloreto de sódio.

Quadro 68 – Resultados das provas de produção de nitrato redutase, tolerância a 100 ppm de Na NO₂ (nitrito de sódio) e tolerância a 10% e 16% (p/v) de NaCl realizadas sobre o grupo de estirpes de *Micrococcaceae* em selecção.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em selecção	Nº de estirpes com nitrato redutase	Nº de estirpes com tolerância a 100ppm de NaNO ₂	Nº de estirpes com crescimento a 10% de NaCl	Nº de estirpes com crescimento a 16% de NaCl
A	Chouriço	3	2	0	2	2	2
	Chouriço	4	4	1	4	4	4
	Lombo	3	1	1	1	1	1
	Lombo	4	1	1	1	1	1
	Morcela	3	10	10	10	10	10
	Paio	4	5	3	5	5	5
B	Paio	1	6	5	6	6	6
	Paio	2	5	3	5	5	5
	Paio	3	6	4	6	6	6
C	Morcela	3	3	2	3	3	3
	Paio	2	1	0	1	1	1
D	Morcela	4	1	1	1	1	1
E	Chouriço	1	1	0	1	1	1
	Lombo	3	1	0	1	1	1
F	Chouriço	3	2	1	2	2	2
TOTAL			49 (100%)	32 (65,3%)	49 (100%)	49 (100%)	49 (100%)

Deste modo, transitaram para as provas seguintes (capacidade de crescimento a baixas temperaturas, em aerobiose e em anaerobiose) as 32 estirpes que produziram nitrato-redutase. Daquelas 32 estirpes, em condições de aerobiose, 31 cresceram tanto a 4,5°C como a 7,0°C (Quadro 69). Em anaerobiose, 24 estirpes cresceram à temperatura de 4,5°C e 23 cresceram a 7,0°C.

Quadro 69 – resultados das provas de capacidade de crescimento a baixas temperaturas (4,5°C e 7°C), em aerobiose e em anaerobiose, realizadas sobre o grupo de estirpes de *Micrococcaceae* em selecção.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em selecção	Aerobiose		Anaerobiose	
				Nº de estirpes com crescimento a 4,5°C	Nº de estirpes com crescimento a 7°C	Nº de estirpes com crescimento a 4,5°C	Nº de estirpes com crescimento a 7°C
A	Chouriço	4	1	1	1	1	1
	Lombo	3	1	1	1	1	1
	Lombo	4	1	1	1	0	0
	Morcela	3	10	10	10	9	9
B	Paio	4	3	3	3	2	2
	Paio	1	5	5	5	4	4
	Paio	2	3	3	3	1	1
C	Paio	3	4	3	3	3	3
	Morcela	3	2	2	2	1	1
D	Morcela	4	1	1	1	1	1
F	Chouriço	3	1	1	1	1	0
		TOTAL	32 (100%)	31 (96,8%)	31 (96,8%)	24 (75%)	23 (71,8%)

Nenhuma das micrococáceas estudadas nestas provas reduziu os nitratos a um composto distinto dos nitritos pelo que se pensa que as estirpes até aqui seleccionadas carecem de capacidade nitrito-redutase. Foram vários os autores que encontraram, também em enchidos, uma proporção elevada de micrococáceas com capacidade nitrato-redutora (Somavilla *et al.*, 1973; Sesma e Rodriguez, 1976; Selgas, 1985; Campanini *et al.*, 1987; Sanz *et al.*, 1997; Garcia-Varona *et al.*, 2000; Bover-Cid *et al.*, 2001b).

Estirpes de *Micrococcaceae* capazes de reduzir nitratos a nitritos são extremamente importantes, sobretudo em produtos de salsicharia de cura mais prolongada e sujeitos à incorporação de nitratos. Mesmo nos produtos de cura mais curta, ainda que em menor escala, aquelas estirpes podem contribuir favoravelmente para o processo de fixação da cor uma vez que a presença de nitratos induz a transformação da oximiglobina em metamioglobina (Möhler, 1984; Hammes e Hertel, 1998) e a presença de estirpes nitrato-redutoras diminuiria a ocorrência deste fenómeno indesejável (Carrascosa, 1989, 2001).

Carrascosa (1989), ao realizar provas de selecção de *Micrococcaceae*, a partir de amostras de presunto serrano espanhol, verificou que 94,4% das estirpes que cresceram em MSA pertenciam à família *Micrococcaceae*. Face a estes resultados, aquele autor admitiu que para o substrato estudado (presunto serrano) o agar MSA era um meio idóneo para o crescimento daqueles microrganismos. Por esta razão, as contagens obtidas naquele meio referem-se directamente a *Micrococcaceae* (Giolitti *et al.*, 1971a,b; Baldini *et al.*, 1977; Raczynski *et al.*, 1978; Silla *et al.*, 1985; Sanz *et al.*, 1997; Lizaso *et al.*, 1999; Garcia-Varona *et al.*, 2000).

Contudo, em outros substratos distintos do presunto, o estudo das micrococáceas em agar MSA pode induzir em erro, como referem Selgas (1985) e Patarata (2002) a propósito do uso daquele meio no estudo de enchidos curados. Na opinião destes autores, apesar de ser comum em estudos com enchidos o uso de agar MSA para as contagens de *Micrococcaceae*, grande parte das colónias que crescem naquele meio pertence à microbiota maioritária em enchidos fermentados, isto é, a microbiota ácido láctica. Não obstante, os nossos resultados não confirmam aquela opinião. Na realidade, apesar de 80,3% das estirpes que cresceram em agar MSA pertencerem à família *Micrococcaceae*, todas as estirpes apresentaram a morfologia de cocos, pelo que se descarta a possibilidade das estirpes Gram-negativas e catalase-negativas pertencerem à microbiota ácido láctica.

Quanto às provas de selecção realizadas sobre as estirpes de *Lactobacillus* spp., das 133 estirpes identificadas como pertencentes ao Género *Lactobacillus*, apenas 9 foram produtoras de CO₂ (Quadro 70). Estas bactérias são heterofermentativas e por essa razão foram eliminadas do processo de selecção.

Quadro 70 – Resultados das provas de produção de CO₂ realizadas sobre o grupo de estirpes de *Lactobacillus* spp. em selecção.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes	Nº de estirpes produtoras de CO ₂
A	Chouriço	4	6	0
	Lombo	3	1	0
	Morcela	2	11	0
	Paio	4	2	0
B	Chouriço	1	12	0
	Lombo	3	2	0
	Paio	3	1	0
C	Paio	3	1	0
D	Paio	3	2	2
E	Chouriço	3	4	2
	Lombo	3	1	0
	Paio	3	2	0
F	Paio	1	8	0
	Paio	2	1	0
	Paio	3	79	5
TOTAL			133 (100%)	9 (6,8%)

Com efeito, as bactérias lácticas usadas como culturas de arranque devem ser homofermentativas. Contudo as bactérias ácido lácticas homofermentativas, podem produzir ácido acético, que contribui para o aroma dos enchidos curados (Kandler, 1983; Schleifer, 1986; Berdagué *et al.*, 1993; Arkoudelos e Nychas, 1995). No entanto, o ácido acético pode ser originado também pela oxidação dos ácidos gordos e pelo catabolismo da alanina (Montel *et al.*, 1998). A fermentação heteroláctica gera a formação de gás (CO_2) e de outras substâncias responsáveis por cheiros indesejáveis (Egan *et al.*, 1989; Hugas, 1998). Além do mais, a formação de gás impede a conveniente ligação das massas, o que resulta em prejuízos de ordem sensorial e higiénica, uma vez que o aumento da superfície do substrato disponível para os microrganismos permite que estes se multipliquem mais facilmente. Gökalp e Ockerman (1985) acrescenta ainda que as estirpes heterofermentativas produzem menos ácido láctico que as homofermentativas.

Dada a importância que a cor tem na aceitabilidade dos enchidos curados, controlar a sua formação através da utilização de microrganismos redutores de nitratos para conseguir uniformizá-la e estabilizá-la parece ser uma das aplicações importantes das estirpes usadas como culturas de arranque. Por esta razão, foi considerado pertinente testar as estirpes de *Lactobacillus* em estudo sobre a sua capacidade de produção de nitrato-redutase, apesar desta capacidade ocorrer eventualmente em algumas estirpes daquele género, quando o teor de açúcares é muito reduzido e, consequentemente, o pH permanece superior a 6,0 (Kandler e Weiss, 1986; Hammes *et al.*, 1990).

No nosso estudo, 61 das 124 estirpes de *Lactobacillus* com que se iniciaram as provas selectivas apresentaram capacidade nitrato-redutora (Quadro 71).

A halotolerância é outra das características que devem possuir as estirpes que se pretendem utilizar como culturas de arranque em enchidos. Para Lücke e Hechelmann (1987), Lemay *et al.* (2000) e Carrascosa (2001) aquelas estirpes devem crescer, pelo menos, com concentrações de cloreto de sódio de 8% e valores de a_w de, pelo menos, 0,94. Contudo, nos enchidos portugueses, de um modo geral, a concentração em cloreto de sódio não atinge aqueles valores.

Nas provas de halotolerância realizadas às 124 estirpes de *Lactobacillus* em estudo (Quadro 71) verificou-se que 119 cresceram com concentrações de NaCl de 5%, 76 cresceram com concentrações de 7%, 14 cresceram na presença de 8% de cloreto de sódio e apenas 1 estirpe cresceu com uma concentração de 9%.

A tolerância ao nitrito é também uma das características que Lücke e Hechelmann (1987) e Carrascosa (2001) consideram dever existir nas estirpes que venham a ser utilizadas como culturas de arranque em produtos de salsicharia.

Apesar da bibliografia sobre a capacidade inibitória dos nitritos em relação às bactérias patogénicas ser extensa (Pivnick *et al.*, 1970; Buchanan e Solberg, 1972; I.C.M.S.F., 1983; Fang *et al.*, 1985; Carrascosa, 1989; Sanz *et al.*, 1997; Hugas *et al.*, 2002) não pode ser descartada a sua acção, também inibitória, no crescimento das bactérias não patogénicas (Ingram, 1973; I.C.M.S.F., 1983; Carrascosa, 1989; Borch *et al.*, 1996; Sanz *et al.*, 1997; Samelis *et al.*, 1998).

Ainda que nos processos de cura dos produtos de salsicharia normalmente estudados não se detectem concentrações de nitritos na ordem das 100 ppm, estes valores podem ser alcançados na superfície do presunto, em processos de cura mais rápidos (Astiasarán *et al.*, 1988; Carrascosa, 1989). Considerando a possibilidade da utilização das estirpes que vierem a ser seleccionadas não só nos enchidos mas também em outros

produtos de salsicharia, a sua capacidade de crescimento com concentrações no meio de cultura de 100 ppm de nitrito de sódio foi entendida como prova selectiva.

Quadro 71 – Resultados das provas de produção de nitrato redutase, tolerância a 100 ppm de NaNO₂ e tolerância a diferentes concentrações de NaCl realizadas sobre as estirpes de *Lactobacillus* spp. em selecção.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em selecção	Nº de estirpes com nitrato redutase	Nº de estirpes com tolerância a 100 ppm de Na NO ₂	Nº de estirpes com crescimento a diferentes concentrações de Na Cl			
						5%	7%	8%	9%
A	Chouriço	4	6	3	6	6	4	1	0
	Lombo	3	1	0	1	1	1	0	0
	Morcela	2	11	8	11	11	11	4	0
	Paio	4	2	2	2	2	1	0	0
B	Chouriço	1	12	2	9	11	7	1	0
	Lombo	3	2	0	1	1	1	0	0
	Paio	3	1	0	1	1	1	0	0
C	Paio	3	1	1	1	1	1	0	0
E	Chouriço	3	2	0	2	2	2	1	0
	Lombo	3	1	0	1	1	1	1	0
	Paio	3	2	1	2	2	1	1	0
F	Paio	1	8	6	7	6	2	0	0
	Paio	2	1	1	1	1	1	1	1
	Paio	3	74	37	73	73	42	4	0
TOTAL			124 (100%)	61 (49,2%)	118 (95,2%)	119 (96,0%)	76 (61,3%)	14 (11,3%)	1 (0,8%)

Das 124 estirpes de *Lactobacillus* homofermentativas, 118 (92,5%) cresceram na presença de 100 ppm de nitrito de sódio.

Com base nos resultados das provas de produção de nitrato redutase, tolerância a 100 ppm de nitrito de sódio e halotolerância, apresentados no Quadro 71, decidiu-se que:¹⁾ seriam eliminadas todas as estirpes que não cresceram na presença de 7% de cloreto de sódio (48 estirpes das 124 que iniciaram as provas);²⁾ seriam eliminadas as estirpes com maiores taxas de crescimento e ausência de capacidade nitrato redutora (15 estirpes das 124 que iniciaram as provas);³⁾ seriam eliminadas as estirpes que, por terem revelado semelhanças entre si e pertencerem à mesma fábrica, ao mesmo produto e isoladas de amostras recolhidas na mesma fase de fabrico, iriam aumentar o número de provas a realizar, hipoteticamente sem mais valia informativa para a decisão do processo selectivo (26 estirpes das 124 que iniciaram as provas). Com este procedimento eliminaram-se 89 estirpes, pelo que continuaram o processo de selecção 35 estirpes de *Lactobacillus*.

Os resultados das provas de capacidade de crescimento das estirpes de *Lactobacillus* a baixas temperaturas, em aerobiose e em anaerobiose, são apresentados no Quadro 72.

Quadro 72 – Resultados das provas de capacidade de crescimento a baixas temperaturas (4,5°C e 7°C) realizadas sobre o grupo de bactérias ácido lácticas em selecção.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em selecção	Aerobiose		Anaerobiose	
				Nº de estirpes com crescimento a 4,5°C	Nº de estirpes com crescimento a 7°C	Nº de estirpes com crescimento a 4,5°C	Nº de estirpes com crescimento a 7°C
A	Chouriço	4	4	0	1	0	1
	Morcela	2	5	0	4	0	3
	Paio	4	1	0	0	0	0
B	Chouriço	1	7	4	4	3	4
	Lombo	3	1	0	0	0	0
C	Paio	3	1	0	0	0	0
E	Chouriço	3	2	0	0	1	0
	Lombo	3	1	0	0	0	0
	Paio	3	1	0	0	0	0
F	Paio	2	1	0	0	0	0
	Paio	3	11	7	3	7	6
TOTAL			35 (100%)	11 (31,4%)	12 (34,3%)	11 (31,4%)	14 (40,0%)

Das 35 estirpes que iniciaram esta prova, apenas 11 (31,4%) cresceram a 4,5°C, tanto em aerobiose como em anaerobiose. Quando a temperatura de incubação foi de 7°C, cresceram 12 estirpes em aerobiose e 14 em anaerobiose.

A capacidade de multiplicação das estirpes usadas como culturas de arranque a 4,5°C está incluída nos requisitos que aquelas estirpes devem cumprir (Lücke e Hechelmann, 1987; Hammes e Hertel, 1998; Carrascosa, 2001). Contudo, uma vez que no caso da grande maioria dos enchidos tradicionais portugueses as massas de carne são sujeitas a um período de maturação de 24 – 48 h, entre 4°C e 6°C, e na grande maioria dos casos seguem para fumeiros onde as temperaturas máximas rondarão os 30 - 35°C, entendemos esta prova como não eliminatória do processo de selecção.

13.3 - Provas complementares

O Quadro 73 mostra os resultados da capacidade proteolítica das estirpes de *Micrococcaceae* ainda em estudo.

Quadro 73 – Resultados das provas de capacidades proteolítica (hidrólise da caseína) e lipolítica (hidrólise da tributirina, do tween 40 e do tween 80) realizadas sobre as estirpes de *Micrococcaceae* submetidas às provas complementares de seleção.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em seleção	Nº de estirpes que hidrolisam a caseína	Nº de estirpes que hidrolisam a tributina	Nº de estirpes que hidrolisam o tween 40	Nº de estirpes que hidrolisam o tween 80
A	Chouriço	4	1	1	1	1	1
	Lombo	3	1	0	1	0	0
	Morcela	3	1	0	1	1	1
	Paio	4	2	0	2	0	0
B	Paio	1	3	1	3	1	0
	Paio	2	1	1	1	1	0
	Paio	3	3	1	3	1	0
TOTAL			11 (100%)	4 (36,4%)	11 (100%)	5 (45,5%)	2 (18,2%)

Das 11 estirpes usadas nesta prova, apenas 4 (36,4%) evidenciaram actividade proteolítica, revelada pela hidrólise da caseína.

Na opinião de Lücke e Hechelmann (1987) a actividade proteolítica das micrococáceas usadas como culturas de arranque tem uma importância reduzida na aromatização dos enchidos. No entanto, vários trabalhos realizados têm mostrado a influência da actividade proteolítica de estirpes de *Micrococcaceae* usadas como culturas de arranque, principalmente do género *Staphylococcus*, sobre o aroma dos enchidos (Hammes e Hertel, 1996; Montel *et al.*, 1996; Hammes e Hertel, 1998; Lücke, 1998). Deibel (1974) e Bacus (1984) sustentam que uma estirpe usada como cultura de arranque não deve ser proteolítica e Hammes e Hertel (1998) opinam que os aromas típicos mais intensos dos enchidos curados são obtidos em produtos inoculados com estirpes que têm baixas actividades lipolítica, estearásica e proteolítica.

Montel *et al.* (1996) considera importante a actividade aminopeptidásica de *Micrococcaceae*, contribuindo deste modo para o aumento do teor em aminoácidos livres, com implicações directas no sabor dos enchidos e indirectas no seu aroma, através de reacções onde aqueles aminoácidos podem estar envolvidos.

Quanto a nós, não entendemos a actividade proteolítica como prova eliminatória mas sim como indicador do potencial enzimático das estirpes estudadas, cientes das limitações que existem para tirar ilacções sobre aquele potencial usando como base um substrato relativamente pouco complexo, como é a caseína, quando comparado com a carne.

No que respeita à actividade lipolítica de *Micrococcaceae*, as mesmas 11 estirpes que haviam apresentado actividade proteolítica frente à caseína, hidrolisaram também a tributirina. Contudo, apenas 5 estirpes hidrolisaram o tween 40 e só 2 manifestaram actividade lipolítica frente ao tween 80.

Mohino (1986), em trabalhos que realizou com alimentos gordos, encontrou estirpes de *Staphylococcus xylosus* com actividade lipolítica frente ao tween 40 e estirpes de *Staphylococcus capitis* que hidrolisaram tanto o tween 40 como o tween 80.

Almeida (2001) também refere algumas estirpes de *Staphylococcus xylosus*, isoladas a partir de enchidos alentejanos, que apresentaram actividade lipolítica tanto em relação ao tween 40 como em ralação ao tween 80.

Uma vez mais Deibel (1974) opina que uma estirpe que se pretende usar como cultura de arranque em produtos de salsicharia não deve ser lipolítica. No entanto, anos antes Cantoni *et al.* (1964, 1967b,c) haviam comprovado que a actividade lipolítica das micrococáceas sobre a gordura de porco era importante e podia contribuir para a aromatização dos produtos de salsicharia, inibir bactérias Gram-negativas e estimular o desenvolvimento de outros produtos formados por bactérias que necessitem de ácidos gordos livres para o seu desenvolvimento. Em trabalhos realizados com presunto italiano, Giolitti *et al.* (1971a) sustentaram que a microbiota lipolítica desempenhou um papel importante, juntamente com as enzimas tissulares, nas transformações do toucinho. Lücke (1986, 1998) opina que as micrococáceas, no presunto, contribuem para o desenvolvimento do aroma e do sabor do produto acabado, devido à sua acção lipolítica. Vários trabalhos mostraram a importância de metil aldeídos e de 2-metil cetonas no aroma dos enchidos (Berger *et al.*, 1990; Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1995a,b; Montel *et al.*, 1996). Para Montel *et al.* (1998) ocorrem variações na intensidade dos aromas dos enchidos curados que são consequência das variações das quantidades daquelas moléculas, que por sua vez variam com as estirpes e as quantidades das bactérias inoculadas. No nosso estudo não foram eliminadas as estirpes que não se manifestaram lipolíticas.

A síntese de toxinas estafilocócicas é atribuída a algumas estirpes de *Straphylococcus aureus* e, muito ocasionalmente, a estirpes de *S. intermedius* e *S. hyicus* (Bergdoll, 1989; Martin *et al.*, 2001). Não obstante, Rodriguez *et al.* (1996) identificaram o gene que regula a produção de algumas enterotoxinas estafilocócicas numa estirpe de *S. xylosus* e em 3 estirpes de *Staphylococcus* spp.

Villani *et al.* (1994) descreveram, provavelmente, as primeiras substâncias antagonistas contra *Listeria monocytogenes*, produzidas por estirpes de *S. xylosus* isoladas de enchidos italianos. Nesse mesmo ano Sahl (1994) purificou a estafilococina 1580 a partir dos sobrenadantes de uma cultura de *S. epidermidis* e considerou-a idêntica à epidermina, uma lantionina contendo um péptido antibiótico, activo contra bactérias Gram-positivas, aeróbias e anaeróbias.

No nosso trabalho, nenhuma das estirpes seleccionadas exerceu acção inibitória sobre as estirpes das espécies *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Serratia liquefaciens* 65.

No Quadro 74 são apresentados os resultados das provas de capacidade proteolítica e lipolítica realizadas às estirpes de *Lactobacillus* ainda em estudo.

Das 35 estirpes de *Lactobacillus* com que se iniciaram as provas complementares, apenas 5 (14,3%) foram proteolíticas, manifestando uma forte actividade hidrolítica frente à caseína. Nenhuma estirpe foi lipolítica em relação a nenhum dos compostos lipídicos considerados. Estes resultados não são surpreendentes. Com efeito, vários autores (Reuter, 1975; Papon e Talon, 1988; Sanz *et al.*, 1988; Samelis *et al.*, 1993) opinam que os

lactobacilos exibem uma fraca actividade lipolítica, fazendo-se sentir sobretudo sobre ácidos gordos que constituem triacilglicéridos de baixo peso molecular.

A actividade lipolítica muitas vezes está ausente em estirpes usadas como culturas de arranque (Nordal e Slinde, 1980; Samelis *et al.*, 1993; Patarata, 2002) havendo autores (Lücke, 1985; Samelis *et al.*, 1993; Lücke, 1998) que sugerem que os lactobacilos não desempenham um papel significante na hidrólise da gordura de porco em enchidos curados.

Quadro 74 – Resultados das provas de capacidades proteolítica (hidrólise da caseína) e lipolítica (hidrólise da tributirina, do tween 40 e do tween 80) realizadas sobre as estirpes de *Lactobacillus* submetidas às provas complementares de selecção.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em selecção	Nº de estirpes que hidrolisam a caseína	Nº de estirpes que hidrolisam a tributirina	Nº de estirpes que hidrolisam o tween 40	Nº de estirpes que hidrolisam o tween 80
A	Chouriço	4	4	0	0	0	0
	Morcela	2	5	0	0	0	0
	Paio	4	1	1	0	0	0
B	Chouriço	1	7	0	0	0	0
	Lombo	3	1	1	0	0	0
C	Paio	3	1	1	0	0	0
E	Chouriço	3	2	0	0	0	0
	Lombo	3	1	0	0	0	0
	Paio	3	1	0	0	0	0
F	Paio	2	1	0	0	0	0
	Paio	3	11	2	0	0	0
TOTAL			35 (100%)	5 (14,3%)	0 (0,0%)	0 (0%)	0 (0%)

Para Sanz *et al.* (1999) a actividade aminopeptidásica de *Lactobacillus* poderá ter interesse na medida em que os aminoácidos livres têm uma acção benéfica sobre o sabor; por outro lado, das reacções em que aqueles aminoácidos vierem a participar resultarão compostos aromáticos que também poderão ter uma acção benéfica sobre o aroma dos enchidos.

Martin (1975) considerou que a actividade proteolítica mais importante nos enchidos que estudou era devida aos lactobacilos. Por outro lado, Petäja (1977) assinalou que os responsáveis mais importantes pela proteólise nos enchidos eram as enterobactérias. No entanto, um número considerável de autores atribui aquele papel às proteases produzidas pelas micrococáceas (Garriga *et al.*, 1988; San Martín, 1993; Hammes e Hertel, 1998; Lücke, 1998; Garcia-Varona *et al.*, 2000).

No âmbito do nosso trabalho, tal como havíamos referido a propósito das provas realizadas com *Micrococcaceae*, as provas sobre a capacidade proteolítica e lipolítica de *Lactobacillus* também não foram consideradas como eliminatórias.

A produção de bacteriocinas, embora não sendo indispensável numa cultura de arranque, constitui uma mais valia importante no contributo para a garantia da segurança alimentar. Deste modo, foram realizadas provas para avaliar a produção de efeitos inibitórios por parte das estirpes de *Lactobacillus* até este momento seleccionadas sobre microrganismos patogénicos como *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Serratia liquefaciens*.

Nesta prova (Quadro 75), das 35 estirpes em estudo 5 mostraram actividade inibitória sobre *Listeria monocytogenes* e, de entre estas, 2 apresentaram aquela actividade também sobre *Listeria innocua*. Nenhuma das estirpes evidenciou actividade inibitória frente a *Serratia liquefaciens*.

Abuja (1993) seleccionou 180 estirpes de bactérias lácticas que haviam sido isoladas durante a cura de um lote de enchidos e verificou que 20 delas manifestaram actividade antimicrobiana exocelular; estas estirpes foram isoladas de todas as etapas do processo de fabrico, desde a massa de carne inicial até à obtenção do produto final. As 6 estirpes com maior actividade inibidora foram identificadas como *Lactobacillus sakei*. Vários trabalhos comprovaram a acção antimicrobiana de bactérias ácidolácticas relativamente a microrganismos patogénicos, especialmente *Listeria monocytogenes* (Rodríguez, et al., 1994; Hugas et al., 1997; De Martinis e Franco, 1998; Hugas, 1998; Bredholt et al., 1999; Gänzle et al., 1999; Aymerich et al., 2000; Bredholt et al., 2001; Messi et al., 2001; Hugas et al., 2002; Työpponen et al., 2003) e *Escherichia coli* O157:H7 (Buchanan e Doyle, 1997; Bredholt et al., 1999; Gänzle et al., 1999; Cosansu e Ayhan, 2000).

Quadro 75 – Resultados das provas de detecção da produção de bacteriocinas das estirpes de *Lactobacillus* spp. em selecção frente a *Listeria monocytogenes* (*L.m.*), *Listeria innocua* (*L.i.*) e *Serratia liquefaciens* 65 (S.I.65)

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Nº de estirpes em selecção	Nº de estirpes com produção de bacteriocinas frente a		
				L.m.	L.i.	S.I.65
A	Chouriço	4	4	0	0	0
	Morcela	2	5	0	0	0
	Paio	4	1	0	0	0
B	Chouriço	1	7	0	0	0
	Paio	3	1	0	0	0
C	Paio	3	1	0	0	0
E	Chouriço	3	2	0	0	0
	Lombo	3	1	0	0	0
F	Paio	3	1	0	0	0
	Paio	2	1	0	0	0
	Paio	3	11	5	2	0
TOTAL		35 (100%)	5 (14,3%)	2 (5,7%)	0 (0%)	

Nos últimos anos, devido à atitude do consumidor em relação aos aditivos químicos, os trabalhos realizados no domínio da conservação de alimentos têm convergido de uma

forma moderada em técnicas que recorrem a métodos físicos e ao uso de compostos antimicrobianos naturais. A multiplicação de bactérias ácido lácticas bacteriocinogénicas, juntamente com outras de interesse tecnológico, podem formar uma barreira adicional que concorra para a conservação das carnes de um modo natural (Hugas *et al.*, 1997; Hammes e Hertel, 1998; Hugas, 1998; Carrascosa, 2001).

Relativamente à prova da sobrevivência à liofilização, por nós considerada de grande importância dadas as possibilidades que esta operação oferece para a conservação, distribuição e aplicação das culturas de arranque, nenhuma das 11 estirpes de *Micrococcaceae* e das 35 de *Lactobacillus* demonstraram ter qualquer problema de activação e desenvolvimento após terem sido submetidas a liofilização.

As culturas de arranque, habitualmente, são comercializadas sob a forma de culturas liofilizadas ou congeladas. As primeiras conservam-se durante longos períodos de tempo, mantendo por vezes viabilidade após 2 anos de conservação. Por outro lado, as culturas congeladas devem ser utilizadas no período de 4 meses (Oliveira, 1989; López, 1997; Carrascosa, 2001).

13.3.1 - Identificação taxonómica final das estirpes com potencial para utilização como culturas de arranque

Por questões financeiras, as provas de identificação incidiram apenas nas estirpes que evidenciaram potencial para serem utilizadas como culturas de arranque: 11 estirpes da família *Micrococcaceae* e 35 estirpes do género *Lactobacillus*.

13.3.1.1 - Família *Micrococcaceae*

Nenhuma das estirpes de *Micrococcaceae* (Gram-positivas e catalase-positivas) seleccionadas, após 48 horas de incubação a 35°C, cresceu em agar P com 0,02% (p/v) de furazolidona pelo que, de acordo com o critério de Rheinbaben e Hadlok (1981), todas elas pertencem ao género *Staphylococcus*.

Relativamente aos resultados do estudo bioquímico realizado com o sistema de identificação API STAPH, os perfis numéricos obtidos foram comparados com os do catálogo analítico API STAPH 8 (A.P.I., 1986). Das 11 estirpes seleccionadas, 5 (45,5%) demonstraram pertencer à espécie *Staphylococcus xylosus*, 1 (9,0%) foi considerada pertencer à espécie *Staphylococcus epidermidis*, 1 (9,0%) à espécie *Staphylococcus simulans* e 4 (36,4%) indicaram pertencer à espécie *Staphylococcus aureus* (Quadro 76).

Das cinco estirpes que indicaram pertencer à espécie *Staphylococcus xylosus*, 4 delas foram identificadas com um grau de precisão de 99,9% (excelente) e 1 com um grau de precisão de 91,9% (bom). *Staphylococcus epidermidis* foi identificada com um grau de precisão de 97,6% (bom) e *Staphylococcus simulans* com um grau de precisão de 60,7% (má identificação). Na identificação das 4 estirpes que indicaram pertencer à espécie *Staphylococcus aureus* obteve-se um grau de precisão de 90,3% (bom).

Na realização das provas de identificação taxonómica sobre as 11 estirpes da família *Micrococcaceae* comprovou-se o género a que estas pertencem mediante o crescimento em agar FP (Reinbaben e Hadlok, 1981). Esta prova é recomendada no Manual de Bergey (Schleifer, 1986) para distinguir de forma rápida o género *Micrococcus* do género *Staphylococcus*.

Quadro 76 – Resultados das provas bioquímicas (sistema de identificação API STAPH) para identificação dos géneros a que pertencem as 11 estirpes seleccionadas da família *Micrococcaceae*.

Código da estirpe	Crescimento em agar P + Furazolidona (HFP)	Crescimento em anaerbiose	Crescimento com 15% (p/v) de NaCl	Produção de ácido (em aerobiose) a partir de																Perfil numérico	Espécie	Grau de precisão do perfil numérico das estirpes mediante o sistema de identificação API (%)		
				D-glucose	D-frutose	D-manose	Maltose	Lactose	D-trehalose	D-mannitol	D-xilitol	D-melibiose	Rafinose	Xilose	Sacarose	α-metil-D-glucosídeos	N-acetil-glucosamina	Redução de nitratos	Redução de nitratos	Produção de acetil metilcarbinol	Produção de arginina dihidrolase	Produção de uridase		
1M	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	6736153	<i>S. aureus</i>	90,3
2M	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	6777752	<i>S.xylosus</i>	99,9
3M	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	6416153	<i>S. simulans</i>	60,7
4M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	6777752	<i>S.xylosus</i>	99,9
5M	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	6777752	<i>S.xylosus</i>	99,9
6M	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	6736153	<i>S. aureus</i>	90,3
7M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	6736153	<i>S. aureus</i>	90,3
8M	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	6777512	<i>S.xylosus</i>	99,9
9M	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	6736153	<i>S. aureus</i>	90,3
10M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	6777750	<i>S.xylosus</i>	91,9
11M	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	6606113	<i>S. epidermidis</i>	97,6

A prova do crescimento em anaerbiose (Quadro 66) no meio de Evans e Kloos (1972) já havia indicado que todas as 11 estirpes seleccionadas até este momento pertenciam ao género *Staphylococcus*, uma vez que nenhuma cresceu naquele meio. No entanto, o Manual de Bergey (Sneath, 1986) situa o crescimento no meio de Evans e Kloos (1972) dentro das provas para classificar as espécies do género *Staphylococcus* e não como critério de separação entre este e o género *Micrococcus*. Pelo contrário, o agar FP permite realizar a discriminação do mesmo modo que a prova de resistência à lisostafina (Rheinbaben e Hadlok, 1981). Por esta razão, o resultado obtido com a prova do crescimento em agar FP substitui a prova de resistência à lisostafina no sistema de identificação API STAPH.

As 11 estirpes da família *Micrococcaceae* seleccionadas (Quadro 77) cresceram a 4,5°C e a 7,0°C, tanto em aerobiose como em anaerobiose, são produtoras de catalase, são nitrato-redutoras, crescem na presença de 100 ppm de nitrito de sódio e toleram concentrações de cloreto de sódio de 16% (em testes não apresentados neste trabalho a estirpe 8M cresceu com uma concentração de cloreto de sódio de 21%). Na identificação taxonómica, 4 estirpes mostraram pertencer à espécie *Staphylococcus xylosus* com um grau de precisão de 99,9%.

Quadro 77 – Resumo dos resultados das provas selectivas das 11 estirpes de *Micrococcaceae* que potencialmente poderão ser utilizadas como culturas de arranque

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Código da estirpe	Acção nitrato-redutora	Tolerância a 100 ppm de Na NO ₂	Tolerância a 10% de NaCl	Crescimento em aerobiose		Crescimento em anaerobiose	
							4,5°C	7°C	4,5°C	7°C
A	Chouriço	4	1M	+	+	+	+	+	+	+
	Lombo	3	2M	++	+	+	+	+	+	+
	Morcela	3	3M	+	+	+	+	+	+	+
	Paio	4	4M	++	+	+	+	+	+	+
			5M	++	+	+	+	+	+	+
B	Paio	1	6M	+	+	+	+	+	+	+
			7M	+	+	+	+	+	+	+
			8M	++	+	+	+	+	+	+
			9M	+	+	+	+	+	+	+
		2	10M	+	+	+	+	+	+	+
			11M	++	+	+	+	+	+	+

Legenda : + crescimento normal; ++ forte crescimento;

Na opinião de vários autores (Hammes *et al.*, 1985; Liepe, 1985 Hammes, 1986; Lücke, 1986; Rheinbaben e Seipp, 1986; Lücke e Hechelmann, 1987; Lücke, 1998; Carrascosa, 2001) *Staphylococcus xylosus*, principalmente, e *Staphylococcus simulans* são as espécies de micrococáceas mais comumente utilizadas como culturas de arranque em produtos de salsicharia. As restantes espécies por nós identificadas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* não são utilizadas como culturas de arranque pelo que, com base nos resultados das provas de identificação, são consideradas não adequadas para utilização como culturas de arranque.

Deste modo, são 6 as estirpes que, concluídas todas as provas, têm, em nosso entender, potencial para serem utilizadas como culturas de arranque em produtos de salsicharia. Daquelas 6 estirpes, 5 pertencem à espécie *Staphylococcus xylosus* e 1 à espécie *Staphylococcus simulans* (Quadro 78).

Quadro 78 – Origem e classificação taxonómica das estirpes da família *Micrococcaceae* com potencial para utilização como culturas de arranque para produtos de salsicharia.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Código da estirpe	Classificação taxonómica
A	Lombo	3	2M	<i>S. xylosus</i>
	Morcela	3	3M	<i>S. simulans</i>
	Paio	4	4M 5M	<i>S. xylosus</i> <i>S. xylosus</i>
B	Paio	1	8M	<i>S. xylosus</i>
		3	10M	<i>S. xylosus</i>

Com base nos resultados de todas as provas realizadas, consideramos a estirpe de *Staphylococcus xylosus* que designámos por 8M, retirada da massa de carne destinada ao fabrico de paio de porco Alentejano, na fábrica B, como a mais indicada para utilização como cultura de arranque no fabrico de enchidos tradicionais alentejanos.

A partir de enchidos tradicionais do nordeste de Portugal, Patarata (2002) identificou 2 grandes grupos de microrganismos da família *Micrococcaceae*. Do primeiro destacou as espécies *Staphylococcus warneri*, *S. hominis* e *S. epidermidis*; do segundo destacou *S. saprophyticus*, *S. xylosus* e *S. equorum*. De acordo com o mesmo autor, a quase ausência de elementos dos géneros *Micrococcus* e *Kokuria* identificados naquele trabalho justificou-se pelo carácter aeróbio obrigatório destes microrganismos, exceptuando *K. Kristinae* que pode desenvolver-se em anaerobiose. Deste modo, a evolução dos microrganismos daqueles dois géneros nos enchidos é muito condicionada pela disponibilidade de oxigénio, ocorrendo preferencialmente na zona mais superficial daqueles produtos. Contudo, essa é também a zona onde mais se faz sentir o efeito da fumagem, operação obrigatória para a esmagadora maioria dos enchidos portugueses. Ainda a propósito do mesmo trabalho, o autor encontrou uma predominância de *S. Warnei* em salpicão e de *S. xylosus* em linguiça. No entanto, dado tratar-se de produtos com formulações muito semelhantes, e admitindo que a fonte destes microrganismos está associada à contaminação natural da carne e possivelmente também à contaminação humana, aquele autor levantou a hipótese de *S. warneri* ser veiculado através do intestino grosso de suíno. Com efeito, no salpicão é usado o intestino grosso de suíno, salgado, enquanto que na linguiça se utiliza tripa seca.

García-Varona *et al.* (2000) identificaram 426 estirpes de *Micrococcaceae* que haviam isolado de amostras de chouriço, representativas de 3 distintas fases de cura, recolhidas em três regiões espanholas. 95% das estirpes isoladas consideraram-se *Staphylococcus xylosus*. Destas estirpes, 68% mostraram possuir proteases, embora a maioria delas com fraca actividade proteolítica. Ainda relativamente a *S. xylosus*, 93,7% das estirpes revelaram-se lipolíticas, apresentando a maioria uma actividade moderada. Para utilização como culturas de arranque aqueles autores escolheram as estirpes de *S. xylosus* com baixas actividades proteolítica e lipolítica, não produtoras de acetoina [transmissora de aromas “lácteos” (Montel *et al.*, 1996)] mas produtoras de nitrato redutase [para além das implicações favoráveis na estabilização da cor parece que a redução do nitrato está também relacionada com a prevenção do aparecimento de aromas e sabores indesejáveis (Miralles *et al.*, 1996; Montel *et al.*, 1996; García-Varona *et al.*, 2000)] e de urease.

S. xylosus, *S. warneri* e *S. saprophyticus* são as espécies mais frequentemente referidas em trabalhos de identificação de estirpes de *Micrococcaceae* isoladas de produtos

cárneos (Seager *et al.*, 1986; Campanini *et al.*, 1987; Comi *et al.*, 1992; Montel *et al.*, 1992; Coppola *et al.*, 1997; Rebecchi *et al.*, 1998; Samelis *et al.*, 1998; Garcia-Varona *et al.*, 2000).

13.3.1.2 - Género *Lactobacillus*

Os lactobacilos e outras bactérias ácido lácticas são componentes comuns da microbiota da carne, crua ou transformada, exercendo uma acção importante na preservação, e por vezes melhoria, da qualidade daqueles alimentos.

Existem várias publicações (Cavett, 1963; Reuter, 1970; Rogosa, 1970; Sharpe, 1979; Sharpe, 1981; Schillinger e Lücke, 1987; 1989; Samelis *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1998; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2003) relacionadas com a identificação das bactérias ácido lácticas, mas somente algumas contêm uma chave de identificação.

Em todo o caso, a fermentação de hidratos de carbono tem sido o método usado tradicionalmente para a caracterização e identificação das bactérias ácido lácticas (Kandler e Weiss, 1986; Schillinger e Lücke, 1987) e o mais adequado quando um elevado número de estirpes bacterianas tem de ser caracterizado (Rovira *et al.*, 1997).

Partindo desta premissa, também nós optámos por agrupar, por espécie, as 35 estirpes que potencialmente poderão ser utilizadas como culturas de arranque, recorrendo à fermentação de três hidratos de carbono: a arabinose, a trehalose e o manitol. Depois de analisados os resultados destes testes, em conjunto com os obtidos na prova de produção de CO₂ (Quadro 70), as 35 estirpes foram agrupadas em 4 espécies (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus alimentarius* e *Lactobacillus curvatus*).

A confirmação daqueles resultados foi feita com recurso a provas bioquímicas realizadas nas galerias API 50 CH. Com base nas provas bioquímicas, no Manual de Bergey (Sneath, 1986) e nos trabalhos de Schillinger e Lücke (1987) foi possível concluir que das 35 estirpes com que se iniciou o estudo de identificação, 18 (51,4%) eram da espécie *Lactobacillus plantarum*, 11 (31,4%) da espécie *L. sakei*, 4 (11,4%) da espécie *L. alimentarius* e 2 (5,7%) consideraram-se pertencer à espécie *L. curvatus*.

Neste estudo, *L. sakei* foi a segunda espécie mais representativa, depois de *L. plantarum*. Contudo aquela é considerada a espécie dominante na microbiota ácido láctica de enchidos curados espanhóis (Morishita e Shiromizu., 1986; Hugas, 1994; Rovira *et al.*, 1997; Hugas, 1998; Santos *et al.*, 1998; Bover-Cid *et al.*, 2001a). Ainda relativamente àqueles enchidos, maioritariamente curados sem recurso a fumagem, enquanto que Hugas (1994) considera *Lactobacillus curvatus* a segunda espécie dominante, Rovira *et al.* (1997) defendem que é *Lactobacillus plantarum*.

Patarata (2002) identificou 185 microrganismos, isolados de enchidos tradicionais do nordeste de Portugal, que apresentaram características gerais de bactérias ácido lácticas (bacilos ou cocos não formadores de esporos, Gram-positivos e catalase-negativos) e encontrou 2 grupos principais. O mais abundante, representando 52% do total de microrganismos testados, foi fenotipicamente próximo de *L. sakei* e *L.curvatus*. Adianta aquele autor que a associação que estabelece entre estas duas espécies resulta da proximidade fenotípica entre elas e da dificuldade de fazer uma distinção clara e inequívoca entre ambas, só possível através da utilização de métodos moleculares. O segundo grupo inclui 16% dos 185 microrganismos utilizados neste estudo e encontra-se, segundo o autor,

próximo de *L. plantarum*. Ainda de acordo com o mesmo autor, verificou-se uma tendência para *L. sakei* e *L. curvatus* estarem associados à linguiça, enquanto *L. plantarum* e *Pediococcus* spp. foram os microrganismos isolados em maior número do salpicão.

Vários autores indicam *L. sakei*, em primeiro lugar, e *L. curvatus* como espécies mais importantes dentro da microbiota láctica (Montel et al., 1989; Torriani et al., 1990; Cantoni et al., 1992; Hugas et al., 1993; Samelis et al., 1994; Samelis et al., 1998; Santos et al., 1998; Cocolin et al., 2000; Coppola et al., 2000).

Depois de realizadas todas as provas de selecção e de identificação taxonómica entendemos considerar com potencial para serem testadas como culturas de arranque no fabrico de enchidos as estirpes que designámos por 1L, 5L, 6L, 7L, 8L, 24L, 27L, 31L, 32L e 33L (Quadro 79). Cinco foram consideradas pertencer à espécie *Lactobacillus sakei*, 2 à espécie *Lactobacillus curvatus*, outras 2 à espécie *Lactobacillus plantarum* e 1 estirpe foi identificada como sendo da espécie *Lactobacillus alimentarius* (Quadro 80).

Quadro 79 – Resumo dos resultados das provas selectivas das 35 estirpes de *Lactobacillus* que potencialmente poderão ser utilizadas como culturas de arranque.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Código da estirpe	Produção nitrato redutase	Tolerância 100 ppm NaNO ₂	Crescimento a diferentes concentrações de NaCl (%)				Crescimento em aerobiose (°C)		Crescimento em anaerbiose (°C)	
						5	7	8	9	4,5	7	4,5	7
A	Chouriço	4	1L	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
			2L	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
			3L	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
			4L	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Morcela	2	5L	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
			6L	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
			7L	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
			8L	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
	Paio	4	9L	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
			10L	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
			11L	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
			12L	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B	Chouriço	1	13L	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
			14L	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
			15L	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
			16L	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
			17L	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
			18L	-	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-
			19L	+	+	+++	++	-	-	-	-	-	-
C	Paio	3	20L	-	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-
			21L	-	+	++	+++	+	-	-	-	+	-
			22L	-	+	+++	+++	+	-	-	-	-	-
			23L	-	+	+++	+++	+	-	-	-	-	-
			24L	+	++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
E	Paio	3	25L	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
			26L	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
			27L	+	++	+++	+	+	-	+	+	+	+
			28L	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
			29L	+	+	++	+	-	-	+	-	+	+
			30L	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
			31L	+	+	+++	++	+	-	+	-	+	+
			32L	+	+	++	+++	-	-	-	-	-	-
			33L	+	+	+++	+++	+	-	-	-	-	-
			34L	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
			35L	-	+	+++	+++	+	-	-	-	-	-

Legenda: + crescimento normal; ++ forte crescimento; +++ crescimento muito forte, - ausência de crescimento

Quadro 80 – Origem e classificação taxonómica das estirpes de *Lactobacillus* com potencial para utilização como cultura de arranque em produtos de salsicharia.

Fábrica	Produto	Fase de fabrico	Código da estirpe	Classificação taxonómica
A	Chouriço Morcela	4 2	1L	<i>L. sakei</i>
			5L	<i>L. plantarum</i>
			6L	<i>L. curvatus</i>
			7L	<i>L. curvatus</i>
			8L	<i>L. sakei</i>
			24L 27L	<i>L. sakei</i>
F	Paio	3	31L	<i>L. sakei</i>
			32L	<i>L. plantarum</i>
			33L	<i>L. alimentarius</i>

Daquelas 10 estirpes, a que designámos por 27L é a que entendemos como mais adequada para ser usada como cultura de arranque em enchidos da salsicharia tradicional alentejana. Trata-se de uma estirpe de *Lactobacillus sakei* que foi isolada de um paio de porco Alentejano, a meio da cura, recolhido numa fábrica que designámos por fábrica F. A nossa opção baseou-se no facto desta ter sido uma estirpe com capacidade nitratoredutora, que cresce bem com concentrações de nitrito de sódio de 100 ppm, com concentrações de cloreto de sódio até 8% e a temperaturas de 4,5°C e 7,0°C, tanto em aerobiose como em anaerobiose. Esta estirpe mostrou ainda produzir substâncias antagonistas frente a *Listeria monocytogenes*, um dos principais microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares.

14 - Ensaios de Inoculação

Para testar a eficácia das duas estirpes, *Staphylococcus xylosus* e *Lactobacillus sakei*, que apresentaram os melhores resultados nas provas de selecção e que designámos respectivamente por 8M e 27L, na condução dos processos fermentativos inerentes ao fabrico do paio de porco Alentejano, foram realizados dois ensaios de inoculação em cada uma das duas fábricas em estudo.

Foram realizados dois ensaios com o objectivo de avaliar a consistência dos resultados. Foi nosso propósito testar o efeito da introdução daquelas culturas em algumas características físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais dos enchidos. Para tanto, em cada um dos ensaios e em cada uma das fábricas constituíram-se 4 lotes de fabrico. Um dos lotes foi inoculado com, aproximadamente, 8 log ufc/g de *Lactobacillus sakei* e 8 log ufc/g de *Staphylococcus xylosus*, um segundo lote foi inoculado com cerca de 8 log ufc/g de *Lactobacillus sakei*, um terceiro lote foi inoculado com 8 log ufc/g, aproximadamente, de *Staphylococcus xylosus* e o quarto lote não foi inoculado, funcionando como testemunha. Em cada ensaio e em cada fábrica os 4 lotes de paio de porco Alentejano foram produzidos em simultâneo. Para conhecer o efeito daquelas culturas ao longo do processo de fabrico recolheram-se amostras no início do processo (fase 1 – massa de carne não condimentada), no fim da maturação das massas de carne (fase 2 – pré-enchimento), no meio da cura (fase 3) e no produto final (fase 4). No entanto, no 1º ensaio de inoculação não se recolheram amostras na fase 1.

No tratamento estatístico dos resultados dos ensaios de inoculação trataram-se separadamente os dados relativos aos produtos de cada uma das fábricas. Foi nosso objectivo comparar as 4 modalidades de inoculação estudadas dentro de cada uma das fábricas e não estabelecer comparações, com fundamento estatístico, entre os resultados dos produtos de ambas as fábricas.

Para os resultados obtidos em cada uma das fábricas apenas se apresentam as comparações das médias para as interacções que foram significativas.

14.1 - Análises físico-químicas

Os Quadros 81 e 82 mostram as análises de variância para os resultados das análises físico-químicas realizadas no âmbito dos 1º e 2º ensaios de inoculação, respectivamente.

Relativamente aos dados dos produtos da fábrica A, no 1º ensaio de inoculação o factor modalidade de inoculação apresentou diferenças significativas para as variáveis pH ($p<0,01$) e parâmetro de cor L* ($p<0,05$). O factor fase apresentou diferenças significativas ($p<0,001$) para todas as variáveis, à excepção do parâmetro de cor a*. A interacção fase x modalidade de inoculação apenas foi significativa para o pH.

Quadro 81 – 1º ensaio de inoculação: análise de variância para resultados de análises físico-químicas considerando duas fábricas (A e B) e os factores fase do processo (2, 3 e 4) e modalidade de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A			Fábrica B		
	Fase (1)	Modalidade inoculação (2)	Interacção 1x2	Fase (1)	Modalidade inoculação (2)	Interacção 1x2
	G.L.=2	G.L.=3	G.L.=6	G.L.=2	G.L.=3	G.L.=6
pH	$F=328,8197$ $p=0,0000***$	$F=6,4399$ $p=0,0014**$	$F=4,6250$ $p=0,0015**$	$F=35,3337$ $p=0,0000***$	$F=3,8654$ $p=0,0170*$	$F=5,0374$ $p=0,0008***$
a_w	$F=107,7414$ $p=0,0000***$	$F=1,7552$ $p=0,1737$	$F=2,2737$ $p=0,0587$	$F=186,0593$ $p=0,0000***$	$F=0,2472$ $p=0,8628$	$F=1,2411$ $p=0,3088$
L^*	$F=32,4469$ $p=0,0000***$	$F=2,9009$ $p=0,0481*$	$F=1,8372$ $p=0,1193$	$F=2,8023$ $p=0,0739$	$F=1,7452$ $p=0,1752$	$F=1,0469$ $p=0,4119$
a^*	$F=10,1451$ $p=0,0003***$	$F=0,5655$ $p=0,6413$	$F=1,2818$ $p=0,2902$	$F=19,8996$ $p=0,0000***$	$F=0,9318$ $p=0,4353$	$F=2,4854$ $p=0,0409*$
b^*	$F=2,9456$ $p=0,0653$	$F=0,7654$ $p=0,5209$	$F=0,6462$ $p=0,6927$	$F=14,0797$ $p=0,0000***$	$F=3,0384$ $p=0,0414*$	$F=3,2875$ $p=0,0111*$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade. Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Quadro 82 – 2º ensaio de inoculação: análise de variância para resultados de análises físico-químicas considerando duas fábricas (A e B) e os factores fase do processo (1, 2, 3 e 4) e modalidade de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A			Fábrica B		
	Fase (1)	Modalidade inoculação (2)	Interacção 1x2	Fase (1)	Modalidade inoculação (2)	Interacção 1x2
	G.L.=3	G.L.=3	G.L.=9	G.L.=3	G.L.=3	G.L.=9
pH	$F=8,3612$ $p=0,0003***$	$F=2,8799$ $p=0,0501$	$F=3,6226$ $p=0,0029**$	$F=159,1475$ $p=0,0000***$	$F=62,5604$ $p=0,0000***$	$F=29,4055$ $p=0,0000***$
a_w	$F=132,5512$ $p=0,0000***$	$F=0,8054$ $p=0,4996$	$F=2,2855$ $p=0,0396*$	$F=142,1342$ $p=0,0000***$	$F=3,2905$ $p=0,0284*$	$F=2,4384$ $p=0,0226*$
L^*	$F=15,6397$ $p=0,0000***$	$F=1,5976$ $p=0,2080$	$F=0,4507$ $p=0,8969$	$F=6,6164$ $p=0,0008***$	$F=6,6604$ $p=0,0008***$	$F=1,5198$ $p=0,1682$
a^*	$F=19,3886$ $p=0,0000***$	$F=0,5293$ $p=0,6652$	$F=0,8443$ $p=0,5816$	$F=23,1834$ $p=0,0000***$	$F=2,8232$ $p=0,0486*$	$F=1,3995$ $p=0,2150$
b^*	$F=20,1405$ $p=0,0000***$	$F=0,8149$ $p=0,4946$	$F=0,2684$ $p=0,9791$	$F=10,5758$ $p=0,0000***$	$F=0,9540$ $p=0,4221$	$F=1,8000$ $p=0,0928$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade. Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Ainda a propósito da fábrica A, no 2º ensaio não houve diferenças significativas entre as modalidades de inoculação para nenhuma variável e entre as fases de fabrico as diferenças foram altamente significativas ($p<0,001$) para todas as variáveis. A interacção fase x modalidade de inoculação foi muito significativa ($p<0,01$) para o pH e significativa ($p<0,05$) para a a_w .

Relativamente aos dados recolhidos dos produtos da fábrica B, no 1º ensaio o factor modalidade de inoculação apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) para o pH e parâmetro de cor b^* . Entre fases de fabrico só o parâmetro de cor L^* não apresentou diferenças significativas e a interacção fase x modalidade de inoculação foi significativa para o pH ($p<0,001$) e parâmetros de cor a^* ($p<0,05$) e b^* ($p<0,05$).

Quanto à análise de variância para os resultados das análises físico-químicas feitas no âmbito do 2º ensaio de inoculação aos paios da fábrica B, apenas o parâmetro de cor b^* não apresentou diferenças significativas entre modalidades de inoculação. Houve diferenças altamente significativas ($p<0,001$) para o pH e parâmetro de cor L^* , e diferenças significativas ($p<0,05$) para o a_w e parâmetro de cor a^* . Entre as fases as diferenças foram sempre altamente significativas ($p<0,001$) para todas as variáveis e a interacção fase x modalidade de inoculação foi altamente significativa ($p<0,001$) para o pH e significativa ($p<0,05$) para o a_w .

As médias e os desvios-padrão das variáveis físico-químicas consideradas nos ensaios de inoculação são apresentados nos Quadros 83 e 84.

No 1º ensaio de inoculação, o pH dos paios produzidos na fábrica A subiu sempre, em qualquer das modalidades de inoculação, à medida que a cura progrediu. Na fase 3 (meio da cura) os valores do pH dos paios cujas massas haviam sido inoculadas com *Lactobacillus sakei* (5,47) foram significativamente inferiores aos dos paios testemunha (5,60). Na fase 4 (produto final) os paios inoculados com *Lactobacillus sakei*, em cultura pura e em cultura mista, foram os que apresentaram valores de pH mais baixos.

Ainda acerca da mesma fábrica, no 2º ensaio de inoculação o pH das massa inoculadas com culturas puras de *Lactobacillus sakei* e de *Staphylococcus xylosus* na fase 2 (pré-enchimento) foi significativamente inferior ao da massa do lote testemunha. O decréscimo dos valores do pH nesta fase do processo, do ponto de vista sanitário, é importante na medida em que pode condicionar a multiplicação de alguma microbiota indesejável que existe nas massas. Ao longo das outras fases do processo aquelas diferenças sofreram alterações, em todo o caso, no produto final o pH do lote testemunha foi superior ao dos outros lotes, correspondendo o valor mais baixo aos paios inoculados com uma cultura mista de *Lactobacillus sakei* e de *Staphylococcus xylosus*. Maijala *et al.* (1995) e Patarata (2002) observaram também que a redução do pH foi mais acentuada quando utilizaram culturas de arranque em que participaram bactérias ácido lácticas do que quando a fermentação ocorreu espontaneamente.

Quanto aos paios da fábrica B produzidos no decurso do 1º ensaio de inoculação, na fase 2 (pré-enchimento) o pH das massas inoculadas com *Lactobacillus sakei* em cultura pura foi significativamente inferior ao das massas inoculadas com *Staphylococcus xylosus* em cultura pura e ao das massas que constituíram o lote testemunha. No entanto, nas outras fases do processo os valores foram muito próximos entre os 4 lotes estudados.

No 2º ensaio de inoculação os paios da fábrica B inoculados com cultura pura de *Lactobacillus sakei* tiveram valores de pH sempre inferiores aos das outras modalidades de inoculação, em todas as fases do fabrico. Na fase 4 (produto final) os paios inoculados com *Lactobacillus sakei* em cultura pura tiveram valores de pH (5,55) significativamente inferiores aos dos produtos inoculados com *Staphylococcus xylosus* em cultura pura (5,68).

e aos dos enchidos testemunha (6,11), sendo este valor significativamente superior ao dos paios de todas as outras modalidades de inoculação.

Quadro 83 – 1º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados de análises físico-químicas de paios obtidos em 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha) ao longo de 3 fases de fabrico (pré-enchimento (2); fase intermédia da cura (3); produto final (4)).

Fase	Modal. Inoc.	pH	a_w	L^*	a^*	b^*
Fábrica A	<i>LxS</i>	5,39 ±0,01	0,961 ±0,007	42,68 ±1,93	17,40 ±2,99	18,05 ±3,39
	<i>L</i>	5,37 ±0,02	0,962 ±0,008	44,14 ±2,59	16,36 ±2,73	19,28 ±3,77
	<i>S</i>	5,36 ±0,02	0,960 ±0,004	40,63 ±0,49	16,47 ±4,00	14,66 ±2,23
	<i>T</i>	5,37 ±0,02	0,960 ±0,006	39,63 ±2,75	15,13 ±1,84	12,98 ±3,52
	<i>LxS</i>	5,52 ab ±0,08	0,932 ±0,008	52,92 ±5,39	18,34 ±3,35	18,20 ±9,80
	<i>L</i>	5,47 a ±0,05	0,935 ±0,007	46,09 ±1,52	20,52 ±5,44	18,18 ±6,73
	<i>S</i>	5,54 ab ±0,02	0,943 ±0,009	44,92 ±1,60	23,21 ±1,98	16,26 ±4,72
	<i>T</i>	5,60 b ±0,04	0,939 ±0,007	47,23 ±4,00	21,72 ±5,00	20,50 ±7,93
	<i>LxS</i>	5,70 a ±0,06	0,813 ±0,037	38,75 ±3,84	17,11 ±3,10	14,14 ±5,27
	<i>L</i>	5,70 a ±0,05	0,775 ±0,070	39,34 ±2,15	18,60 ±2,83	15,37 ±3,98
	<i>S</i>	5,82 b ±0,01	0,688 ±0,095	37,81 ±2,85	15,82 ±0,58	14,12 ±3,79
	<i>T</i>	5,76 ab ±0,01	0,734 ±0,091	39,11 ±5,44	14,24 ±2,73	10,83 ±5,46
Fábrica B	<i>LxS</i>	5,63 ab ±0,07	0,949 ±0,008	33,58 ±1,48	17,86 ±3,61	11,13 a ±1,95
	<i>L</i>	5,52 b ±0,09	0,955 ±0,012	43,15 ±4,66	23,32 ±3,55	19,59 b ±5,24
	<i>S</i>	5,91 c ±0,06	0,962 ±0,009	36,43 ±2,03	23,43 ±3,60	13,89 ab ±2,55
	<i>T</i>	5,78 ac ±0,07	0,941 ±0,018	36,91 ±2,79	21,07 ±5,57	14,28 ab ±2,69
	<i>LxS</i>	5,41 ±0,08	0,840 ±0,038	42,36 ±7,60	18,15 ±3,96	11,19 ±5,66
	<i>L</i>	5,40 ±0,14	0,875 ±0,051	43,24 ±4,21	14,08 ±3,44	7,45 ±1,34
	<i>S</i>	5,41 ±0,15	0,865 ±0,029	45,46 ±12,40	17,87 ±2,86	12,28 ±4,34
	<i>T</i>	5,49 ±0,07	0,857 ±0,036	37,56 ±1,53	14,30 ±1,48	7,68 ±1,59
	<i>LxS</i>	5,54 ±0,05	0,762 ±0,024	37,28 ±3,61	15,91 ±1,69	9,00 ±3,16
	<i>L</i>	5,59 ±0,03	0,737 ±0,046	40,98 ±3,19	16,49 ±2,57	12,92 ±3,79
	<i>S</i>	5,50 ±0,14	0,714 ±0,024	38,28 ±2,15	12,83 ±1,25	8,14 ±0,49
	<i>T</i>	5,56 ±0,11	0,738 ±0,044	40,18 ±9,10	12,92 ±2,66	6,27 ±2,59

Legenda: Modalidades de Inoculação - *LxS*: *Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *L*: *Lactobacillus sakei*; *S*: *Staphylococcus xylosus*; *T*: Testemunha.

Na mesma coluna: para cada uma das fases de fabrico dentro da mesma fábrica, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Quadro 84 – 2º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados de análises físico-químicas de paio obtidos em 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha) ao longo de 4 fases de fabrico (massa não condimentada (1); pré-enchimento (2); fase intermédia da cura (3); produto final (4)).

Fase	Modalidade inoculação	pH	a_w	L^*	a^*	b^*
Fábrica A	LxS	5,77 ±0,05	0,948 ±0,022	37,49 ±1,63	20,44 ±2,59	17,08 ±2,40
	L	5,77 ±0,05	0,948 ±0,022	37,49 ±1,63	20,44 ±2,59	17,08 ±2,40
	S	5,77 ±0,05	0,948 ±0,022	37,49 ±1,63	20,44 ±2,59	17,08 ±2,40
	T	5,77 ±0,05	0,948 ±0,022	37,49 ±1,63	20,44 ±2,59	17,08 ±2,40
	LxS	5,59 ab ±0,11	0,969 ±0,019	41,58 ±1,29	23,01 ±0,97	22,89 ±2,91
	L	5,45 a ±0,04	0,956 ±0,016	41,18 ±1,15	25,77 ±2,48	21,51 ±5,74
	S	5,33 a ±0,14	0,957 ±0,008	41,99 ±2,45	22,92 ±5,44	23,03 ±4,66
	T	6,04 b ±0,56	0,938 ±0,024	41,61 ±2,72	23,14 ±3,76	21,76 ±2,18
	LxS	6,06 ±0,06	0,898 ±0,019	42,92 ±2,72	15,53 ±5,97	16,70 ±5,37
	L	5,79 ±0,08	0,919 ±0,042	39,51 ±1,32	18,49 ±0,37	13,94 ±3,61
	S	5,98 ±0,24	0,926 ±0,012	43,22 ±2,41	13,00 ±1,39	12,94 ±3,89
	T	5,80 ±0,11	0,922 ±0,014	41,46 ±2,49	14,56 ±2,89	13,00 ±4,27
Fábrica B	LxS	5,49 ±0,02	0,782 ab ±0,030	38,30 ±1,03	17,29 ±3,39	13,73 ±3,84
	L	5,68 ±0,07	0,761 ab ±0,025	35,30 ±3,67	13,64 ±1,47	9,81 ±2,30
	S	5,61 ±0,04	0,734 a ±0,057	37,50 ±3,46	16,36 ±1,01	12,59 ±1,39
	T	5,76 ±0,15	0,821 b ±0,029	37,74 ±1,55	15,11 ±4,90	11,06 ±4,18
	LxS	5,79 ±0,04	0,964 ±0,011	42,08 ±2,15	23,78 ±1,52	14,56 ±1,56
	L	5,79 ±0,04	0,964 ±0,011	42,08 ±2,15	23,78 ±1,52	14,56 ±1,56
	S	5,79 ±0,04	0,964 ±0,011	42,08 ±2,15	23,78 ±1,52	14,56 ±1,56
	T	5,79 ±0,04	0,964 ±0,011	42,08 ±2,15	23,78 ±1,52	14,56 ±1,56
	LxS	5,94 a ±0,05	0,954 ±0,011	43,22 ±0,94	23,43 ±1,99	14,68 ±2,22
	L	5,84 a ±0,04	0,959 ±0,008	42,94 ±1,47	21,20 ±1,44	13,63 ±1,85
	S	6,11 b ±0,05	0,954 ±0,007	42,97 ±2,63	23,21 ±2,38	15,78 ±3,35
	T	6,11 b ±0,06	0,952 ±0,025	44,78 ±2,99	18,18 ±1,06	13,49 ±0,67
Fábrica B	LxS	5,70 a ±0,09	0,926 ±0,016	43,67 ±3,08	17,28 ±0,92	10,05 ±0,59
	L	5,54 b ±0,03	0,931 ±0,006	43,66 ±2,65	17,00 ±2,91	10,38 ±2,54
	S	5,70 a ±0,08	0,936 ±0,009	42,18 ±4,39	18,78 ±3,02	11,13 ±4,17
	T	5,62 ab ±0,02	0,937 ±0,011	48,89 ±3,72	17,77 ±2,01	11,64 ±2,48
	LxS	5,62 ab ±0,02	0,803 a ±0,032	38,73 ±1,78	20,45 ±1,94	9,65 ±1,59
	L	5,55 b ±0,02	0,839 ab ±0,039	41,78 ±2,69	20,25 ±1,94	12,80 ±1,07
	S	5,68 a ±0,04	0,854 b ±0,029	38,64 ±1,22	19,24 ±3,04	8,98 ±2,52
	T	6,11 c ±0,06	0,873 b ±0,019	44,56 ±0,78	17,43 ±3,95	14,74 ±4,51

Legenda: Modalidades de Inoculação – LxS: *Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; L: *Lactobacillus sakei*; S: *Staphylococcus xylosus*; T: Testemunha.

Na mesma coluna: para cada uma das fases de fabrico dentro da mesma fábrica, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Ainda a propósito do 2º ensaio de inoculação, os valores do pH a meio da cura (fase 3) foram inferiores nos lotes produzidos na fábrica B. Considerando que nesta fase as contagens, tanto de *Lactobacillus* spp. como de bactérias ácido lácticas, não diferiram muito entre os lotes produzidos numa e noutra fábrica, estes resultados poderão decorrer de um

desenvolvimento mais intenso de bactérias ácido lácticas produtoras de maiores teores de ácido, eventualmente devido às temperaturas mais elevadas registadas no fumeiro (cerca de 30 - 35°) comparativamente às das câmaras onde foram curados os paios da fábrica A (10 - 12°C). O crescimento das bactérias ácido lácticas como consequência das temperaturas próximas dos 35°C registadas durante a fumagem de linguiça tradicional transmontana inoculada com estirpes dos géneros *Lactobacillus* e *Staphylococcus* havia sido testemunhada também por Patarata (2002).

A ocorrência de ácido acético pode ter origens diversas nos enchidos, sendo a mais provável a associada à utilização de diferentes vias fermentativas pela microbiota que se desenvolve no produto à medida que decorre a cura (Berdagué *et al.*, 1993). No entanto, e segundo os mesmos autores, aquele ácido também pode resultar de processos catabólicos de lípidos e aminoácidos, o que pode explicar alguns valores de pH mais baixos, em lotes em que as contagens da microbiota láctica foi semelhante ou mesmo inferior. Para outros autores (Ibañez *et al.*, 1995; Stahnke, 1995b; Quintanilla *et al.*, 1996) a produção de ácido acético poderá estar associada à reacção de Stickland. Esta reacção envolve um par de oxidação-redução entre pares de aminoácidos apropriados, levando à formação de ácido acético. Porém, esta via de obtenção de energia está descrita para espécies de *Clostridium* e *Peptostreptococcus* (Britz e Wilkinson, 1982; Gottschalk, 1986), desconhecendo-se se pode ser realizada por outros microrganismos.

No entanto, em termos tecnológicos, não é de excluir a hipótese da perda de ácido acético associada à cinética da desidratação (Patarata, 2002).

Nos paios submetidos ao fumeiro, as médias mais baixas dos valores do pH verificaram-se na fase 3 (meio da cura), tal como havia acontecido nos trabalhos de Patarata (2002). No entanto, nos paios produzidos na fábrica A as médias mais baixas do pH ocorreram na fase 2 (pré-enchimento), apesar do número de bactérias lácticas, de um modo geral, ser superior na fase 3 (meio da cura).

Entre as fases 3 (meio da cura) e 4 (produto final) houve um ligeiro aumento do pH. Estes resultados, normais no produto em estudo, resultam da capacidade tampão da carne e da libertação de compostos de carácter básico, fundamentalmente produtos do catabolismo da fracção azotada (Demeyer, 1992; López, 1997). Flores *et al.* (1997) indicam que, nesta fase do processo, as leveduras são também responsáveis pela subida dos valores do pH. Este aumento do pH pode ter uma extensão variável, associada ao tipo de enchido fermentado e ao tempo de maturação (Diaferia *et al.*, 1995; Torriani *et al.*, 1995).

Quanto aos valores da actividade da água dos paios produzidos na fábrica A, para ambos os ensaios de inoculação, no produto final (fase 4) a a_w foi inferior nos paios inoculados com *Staphylococcus xylosus* em cultura pura, embora de modo significativo apenas nos paios fabricados no 2º ensaio. Neste mesmo ensaio os produtos testemunha apresentaram os valores de a_w mais elevados.

As micrococáceas são referidas (Hammes e Hertel, 1998; Lücke, 1998; Montel *et al.*, 1998; Garcia-Varona *et al.*, 2000; Carrascosa, 2001) como microrganismos que aceleram os processos de cura, devido essencialmente à sua acção proteolítica. Esta acção das micrococáceas poderá acelerar a perda de água e gerará a acumulação de metabolitos osmoticamente activos que, conjuntamente, contribuirão para o decréscimo da actividade da água.

Na fábrica B, nas fases iniciais (fase 2) de ambos os ensaios os mais baixos valores de a_w foram registados nos lotes testemunha. Contudo, no 1º ensaio foram também os produtos finais (fase 4) que haviam sido inoculados com cultura pura de *Staphylococcus xylosus* os que apresentaram os mais baixos valores de a_w , enquanto que no 2º ensaio, na

fase 4, os paioes inoculados com cultura mista de *Lactobacillus sakei* e de *Staphylococcus xylosus* foram os que tiveram valores de a_w mais baixos (0,803) e significativamente inferiores aos do grupo testemunha (0,873).

A modificação da capacidade de retenção de água das proteínas, devido à aproximação do pH do seu ponto isoeléctrico, pode conduzir a perdas de água mais rápidas (Girard, 1988c), o que em parte poderá explicar aqueles resultados.

Os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , nos produtos acabados (fase 4) das fábricas A e B tiveram os valores mais elevados nos paioes inoculados com *Lactobacillus sakei* em cultura pura, no 1º ensaio de inoculação.

Relativamente ao 2º ensaio, os produtos finais da fábrica A inoculados com a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e de *Staphylococcus xylosus* foram os que apresentaram valores superiores para aqueles 3 parâmetros de cor. Nos paioes da fábrica B os valores mais elevados de L^* registaram-se nos produtos acabados do lote testemunha. Os mais elevados valores de a^* verificaram-se nos lotes inoculados com *Lactobacillus sakei*, em cultura pura e em cultura mista. Os valores maiores de b^* correspondem aos produtos que constituem o lote testemunha.

Em jeito de súmula sobre os resultados das análises físico-químicas realizadas no âmbito dos ensaios de inoculação fazemos notar que, quanto ao pH, foi notória a acção das culturas de arranque no decréscimo dos valores daquele parâmetro, sobretudo quando intervieram estirpes de *Lactobacillus sakei*.

Por outro lado, na maioria das vezes, culturas puras de *Staphylococcus xylosus* promoveram decréscimos nos valores de a_w superiores aos conseguidos nas outras modalidades de inoculação. Apenas nos paioes produzidos na fábrica B para o 2º ensaio de inoculação, nas fases 3 e 4 (meio da cura e produto final, respectivamente) a a_w foi inferior no lote inoculado com a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus*, comparativamente às restantes modalidades de inoculação.

Os resultados apresentados para os parâmetros da cor evidenciaram que *Lactobacillus sakei* contribuiu para tornar os enchidos mais claros (valores de L^* superiores) e com um vermelho mais intenso (valores de a^* superiores). Por várias vezes os valores de b^* foram superiores nos lotes inoculados, relativamente aos lotes testemunha. Estes resultados poderão dever-se a uma actividade lipolítica das estirpes usadas como culturas de arranque, que acelerariam os processos de autoxidação, resultando daí um maior amarelecimento da gordura intramuscular, razão pela qual os valores de b^* foram mais elevados. Contudo, nas provas de selecção de estirpes microbianas para utilização como culturas de arranque, das duas estirpes testadas apenas *S. xylosus* revelou actividade lipolítica. Por outro lado, a produção de peróxido de hidrogénio por parte das culturas de *L. sakei* também pode ter contribuído para aqueles resultados.

Patarata (2002) inoculou estirpes de *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum*, *Staphylococcus xylosus* e *S. carnosus* em linguiça tradicional transmontana e quando mediou a cor no homogeneizado da amostra procedente de linguiça com 30 dias de cura, observou que a utilização de culturas de arranque não influenciou a luminosidade (L^*) nem a coordenada verde-vermelho (a^*). Relativamente à coordenada azul-amarelo (b^*) aquele autor registou valores mais baixos no lote testemunha, não inoculado portanto.

Patarata (2002) e Perez-Alvarez *et al.* (1999) atribuem as variações existentes no parâmetro L^* ao teor em humidade das amostras, fundamentalmente, sendo o valor daquele parâmetro tanto mais elevado quanto maiores forem os teores de humidade, e às características exsudativas da carne, decorrentes de diferenças do pH, com valores de luminosidade superiores nas carnes mais exsudativas.

14.2 - Análise do perfil da textura e força e trabalho de corte

A análise de variância para os resultados obtidos da análise do perfil da textura e da força e do trabalho de corte, obtidos nos dois ensaios de inoculação (Quadros 85 e 86), apenas considerou o factor modalidade de inoculação uma vez que os testes reológicos incidiram somente sobre o produto final.

No 1º ensaio de inoculação, nos paios produzidos na fábrica A não se verificaram diferenças significativas para nenhuma das variáveis. Nos produtos da fábrica B apenas as variáveis força e trabalho de corte apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) entre as modalidades de inoculação.

No 2º ensaio de inoculação, nos produtos da fábrica A houve diferenças significativas entre modalidades de inoculação apenas para as variáveis força de corte ($p<0,01$) e trabalho de corte ($p<0,001$). Porém, os paios da fábrica B apresentaram diferenças significativas entre modalidades de inoculação para todas as variáveis à excepção da elasticidade (“springiness”).

Quadro 85 – 1º ensaio de inoculação: análise de variância para resultados das análises do perfil da textura e da força e do trabalho de corte, considerando duas fábricas (A e B) e o factor modalidade de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
	Modalidade de inoculação	Modalidade de inoculação
	G.L.=3	G.L.=3
Dureza	$F=3,6301$ $p=0,0578$	$F=0,2308$ $p=0,8735$
Coesivedade	$F=2,1742$ $p=0,1609$	$F=1,0819$ $p=0,3867$
Elasticidade	$F=0,3484$ $p=0,7914$	$F=0,7761$ $p=0,5254$
Resiliência	$F=0,6552$ $p=0,5997$	$F=0,6577$ $p=0,5906$
Gomosidade	$F=3,3095$ $p=0,0711$	$F=0,1992$ $p=0,8953$
Masticabilidade	$F=2,7090$ $p=0,1077$	$F=0,2700$ $p=0,8461$
Força de corte	$F=1,7215$ $p=0,1714$	$F=2,9487$ $P=0,0475*$
Trabalho de corte	$F=1,9462$ $p=0,1310$	$F=2,9834$ $P=0,0458*$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade. Níveis de Significância -

*significativo para $p<0,05$.

Quadro 86 – 2º ensaio de inoculação: análise de variância para resultados das análises do perfil da textura e da força e do trabalho de corte, considerando duas fábricas (A e B) e o factor modalidade de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha)

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
	Modalidade de inoculação	Modalidade de inoculação
	G.L.=3	G.L.=3
Dureza	$F=2,2515$ $p=0,0976$	$F=8,0747$ $p=0,0003^{***}$
Coesividade	$F=1,4003$ $p=0,2572$	$F=13,4230$ $p=0,0000^{***}$
Elasticidade	$F=2,1471$ $p=0,1099$	$F=3,0840$ $p=0,0390$
Resiliência	$F=1,0394$ $p=0,3859$	$F=8,2387$ $p=0,0003^{***}$
Gomosidade	$F=2,1948$ $p=0,1041$	$F=7,5429$ $p=0,0005^{***}$
Masticabilidade	$F=1,9215$ $p=0,1421$	$F=6,6806$ $p=0,0010^{**}$
Força de corte	$F=4,3646$ $p=0,0099^{**}$	$F=4,6484$ $p=0,0073^{**}$
Trabalho de corte	$F=7,2626$ $p=0,0006^{***}$	$F=5,3662$ $p=0,0035^{*}$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

No 1º ensaio de inoculação, apesar de não se terem registado diferenças significativas entre modalidades de inoculação, provavelmente devido à grande variabilidade entre amostras, a dureza foi superior nos paioes do grupo testemunha, em ambas as fábricas, sendo essa diferença muito mais notória nos produtos da fábrica A (Quadro 87).

A coesividade foi também menor nos grupos testemunha de ambas as fábricas, denotando uma pior ligação das massas nos produtos não inoculados. Em ambas as fábricas a modalidade de inoculação *Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus* foi a que apresentou valores de coesividade mais elevados.

A gomosidade, que resulta da multiplicação dos valores da dureza pelos da coesividade, foi também superior no grupo testemunha de ambas as fábricas.

O lote testemunha da fábrica A continuou a ser o que apresentou valores superiores para a masticabilidade, força de corte e trabalho de corte.

No 2º ensaio de inoculação, os valores da dureza, coesividade e elasticidade (“springiness”) (Quadro 88) foram mais baixos do que os registados no 1º ensaio, sobretudo nos produtos da fábrica B.

Comparando os resultados dos testes reológicos obtidos nos dois ensaios verificamos haver diferenças nas características dos produtos. Assim, na fábrica A a

modalidade de inoculação *Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus* foi a que apresentou quase sempre os valores mais elevados para as variáveis estudadas.

A coesividade continuou a apresentar, em ambas as fábricas, os valores mais elevados nos produtos inoculados com *Lactobacillus sakei*, tanto em cultura pura como em cultura mista.

Por outro lado, na fábrica B o lote testemunha apresentou os valores mais baixos para todas as variáveis, na maioria dos casos esses valores foram significativamente inferiores a todos os outros.

Quadro 87 – 1º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados das análises do perfil da textura e da força e do trabalho de corte considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A				Fábrica B			
	LxS	<i>L sakei</i>	<i>S. xylosus</i>	Testem.	LxS	<i>L sakei</i>	<i>S. xylosus</i>	Testem.
Dureza (g)	2332,00 ± 440,16	6806,16 ± 5369,32	6997,40 ± 3393,24	12566,35 ± 2977,63	4814,85 ± 3887,99	3866,12 ± 1614,51	5132,99 ± 1626,54	5353,77 ± 2590,80
Coesividade	0,739 ± 0,024	0,725 ± 0,017	0,713 ± 0,030	0,691 ± 0,016	0,721 ± 0,051	0,693 ± 0,022	0,703 ± 0,039	0,681 ± 0,022
Elasticidade	0,767 ± 0,087	0,774 ± 0,039	0,786 ± 0,050	0,731 ± 0,039	0,798 ± 0,137	0,727 ± 0,048	0,736 ± 0,109	0,703 ± 0,101
Resiliência	0,294 ± 0,010	0,290 ± 0,013	0,276 ± 0,037	0,278 ± 0,005	0,278 ± 0,036	0,257 ± 0,031	0,282 ± 0,028	0,278 ± 0,013
Gomosidade (g)	1723,57 ± 325,10	4918,39 ± 3822,56	5054,54 ± 2568,30	8662,23 ± 1860,68	3597,86 ± 3039,65	2701,71 ± 1186,88	3637,73 ± 1318,83	3643,33 ± 1723,63
Masticabilidade (g)	1337,32 ± 349,76	3868,81 ± 3026,73	4052,18 ± 2212,44	6365,35 ± 1695,59	3115,84 ± 2965,90	1969,65 ± 909,49	2774,38 ± 1464,07	2590,90 ± 1314,22
Força de corte (g)	56,10 ± 11,58	78,99 ± 43,17	82,74 ± 25,50	93,85 ± 43,01	57,19 a ± 26,68	93,63 b ± 35,58	71,41 ab ± 27,76	60,98 ab ± 20,10
Trabalho de corte (g/mm)	88,04 ± 19,25	149,23 ± 96,25	146,21 ± 48,89	159,39 ± 74,12	89,99 a ± 47,11	157,52 b ± 71,11	116,15 ab ± 41,60	109,73 ab ± 29,95

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

No decurso do 2º ensaio de inoculação realizado na fábrica B surgiu um problema tecnológico não identificado. Por esta razão, neste ensaio e nesta fábrica os paio testemunha tinham as massas desligadas e apresentaram cores, aromas e sabores estranhos (vide Capítulo 14.4).

Deste modo, demonstra-se a utilidade do recurso àqueles microrganismos como culturas de arranque; não somente para melhorar algumas características dos enchidos, como a ligação das massas de carne, por exemplo, mas também como atenuante dos impactos negativos causados por problemas tecnológicos imprevistos. Estes fundamentos são válidos também para produtos fumados, sobre os quais poderia recair a ideia de que a acção bacteriostática e bactericida do fumo limitaria de modo significativo a acção das culturas de arranque.

Quadro 88 – 2º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados da análise do perfil da textura e da força e do trabalho de corte considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A				Fábrica B			
	L x S	<i>L. sakei</i>	<i>S. xylosus</i>	Testem.	L x S	<i>L. sakei</i>	<i>S. xylosus</i>	Testem.
Dureza (g)	5070,60 ±3555,59	1785,82 ±1716,48	3244,83 ±2521,07	4069,95 ±4304,35	536,21 ab ±317,05	858,58 a ±502,98	873,89 a ±384,59	196,81 b ±121,96
Coesividade	0,684 ±0,043	0,689 ±0,040	0,654 ±0,058	0,659 ±0,055	0,610 a ±0,063	0,608 a ±0,042	0,584 a ±0,033	0,482 b ±0,065
Elasticidade	0,680 ±0,074	0,788 ±0,108	0,698 ±0,125	0,752 ±0,142	0,882 a ±0,068	0,722 ab ±0,100	0,805 ab ±0,064	0,744 b ±0,161
Resiliência	0,256 ±0,040	0,234 ±0,029	0,229 ±0,042	0,230 ±0,053	0,274 a ±0,037	0,271 a ±0,043	0,246 a ±0,022	0,203 b ±0,041
Gomosidade (g)	3500,89 ±2479,35	1245,42 ±1219,50	2193,88 ±1797,38	2793,99 ±2953,57	334,29 a ±218,87	528,58 a ±322,90	516,65 a ±249,20	98,33 b ±61,86
Masticabilidade (g)	2310,30 ±1490,58	957,65 ±910,87	1540,93 ±1255,97	1872,61 ±1825,12	302,13 a ±218,90	415,28 a ±254,89	422,27 a ±220,94	70,34 b ±42,75
Força de corte (g)	125,98 a ±40,42	87,26 ab ±47,93	105,04 ab ±48,50	62,85 b ±24,25	43,46 a ±11,73	35,12 ab ±8,18	47,18 a ±16,77	27,15 b ±15,01
Trabalho de corte (g/mm)	378,73 a ±133,10	242,76 b ±119,66	266,12 ab ±115,68	155,55 b ±54,64	63,09 a ±19,14	54,87 ab ±14,23	72,60 a ±27,30	37,54 b ±19,34

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Patarata (2002) inoculou, separadamente, três tipos de culturas mistas (¹)*Lactobacillus plantarum* e *Staphylococcus xylosus*; ²)*L. sakei* e *S. xylosus*; ³)*L. sakei*, *S. carnosus* e *S. xylosus*), na proporção de 6 log ufc/g de massa, em linguiça tradicional Transmontana. Na análise do perfil da textura, para uma deformação da amostra de 40% com uma sonda cilíndrica, considerou os parâmetros dureza, coesividade e adesividade e verificou que a utilização de culturas de arranque não surtiu qualquer efeito sobre qualquer daqueles parâmetros.

14.3 - Análises microbiológicas

No 1º ensaio de inoculação, os paioes produzidos na fábrica A apenas não apresentaram diferenças significativas entre as modalidades de inoculação para as contagens de microrganismos mesófilos totais e *Enterobacteriaceae* e para a estimativa do número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores e de bactérias coliformes (Quadro 89). O factor fase apresentou diferenças significativas para todas as variáveis e a interacção entre aqueles dois factores foi significativa para as contagens de microrganismos mesófilos totais, *Lactobacillus* spp. e *Micrococcaceae*.

Ainda a propósito do 1º ensaio, a análise de variância feita aos resultados da fábrica B mostra que o factor fase não apresentou diferenças significativas para as contagens de *Micrococcaceae* e de esporos de bactérias aeróbias e para a estimativa do número de

bactérias coliformes. Para o factor modalidade de inoculação não se verificaram diferenças significativas também para a contagem de esporos de bactérias aeróbias e para a estimativa do número de bactérias coliformes e ainda para a estimativa do número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores. A interacção fase x modalidade de inoculação apenas não foi significativa para as três variáveis acabadas de referir.

A análise de variância relativa ao 1º ensaio evidencia a modalidade de inoculação como um factor responsável por diferenças na grande maioria das variáveis microbiológicas estudadas, o que ainda não havia acontecido, nem com as variáveis físico-químicas nem com as reológicas.

No Quadro 89 não são apresentados valores para a análise de variância feita aos resultados da estimativa do número de células de *Escherichia coli* porque em ambas as fábricas aqueles resultados foram inferiores ao limiar de detecção do método utilizado.

Relativamente ao 2º ensaio de inoculação, a análise de variância (Quadro 90) para os resultados dos produtos da fábrica A mostra que para todas as variáveis houve diferenças significativas entre fases de fabrico. As variáveis mesófilos totais, *Lactobacillus* spp., *Micrococcaceae*, *Streptococci* do grupo D, esporos de *Clostridia* sulfito-redutores e bactérias coliformes apresentaram diferenças significativas entre modalidades de inoculação e a interacção fase x modalidade de inoculação foi significativa para todas estas variáveis e ainda para a contagem de *Lactobacillus* spp.

Quanto à análise de variância para os resultados correspondentes aos paios da fábrica B, apenas a estimativa do número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores não apresentou diferenças significativas para os factores fase e modalidade de inoculação e foi aquela a única variável para a qual a interacção entre estes dois factores não foi significativa.

No 1º ensaio de inoculação realizado na fábrica A as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos totais, leveduras e esporos de bactérias aeróbias não apresentaram diferenças evidentes entre as 4 modalidades de inoculação (Quadros 91.1 e 91.2). No entanto, na fase 2 (pré-enchimento) o número de microrganismos mesófilos totais no lote testemunha foi inferior ao das restantes modalidades de inoculação. Esta diferença dever-se-á à introdução das culturas de arranque feita na altura da condimentação das massas. A diferença entre o grupo testemunha e os outros grupos não é maior porque por razões competitivas as culturas introduzidas não se vão adicionar às já instaladas mas sobretudo substituí-las.

Os microrganismos de interesse tecnológico (*Lactobacillus* spp., bactérias ácido lácticas e *Micrococcaceae*), na fase 2 (pré-enchimento), existiram em maior número nas modalidades de inoculação em que houve introdução de células bacterianas, porém ao longo da cura as contagens daqueles microrganismos foram-se assemelhando entre as 4 modalidades de inoculação.

Patarata (2002) ao realizar ensaios de inoculação com linguiça tradicional transmontana verificou que as diferenças entre as contagens de bactérias ácido lácticas nos produtos inoculados e não inoculados foi de 2 a 3 unidades logarítmicas. Considerando que a suspensão celular empregue na inoculação havia sido aferida para corresponder a 6 log ufc/g, aproximadamente, o autor colocou a hipótese de ter havido perda de microrganismos viáveis na operação de mistura e homogeneização do inóculo nas massas de carne. Diferenças entre o nível teórico de inoculação e o número de células efectivamente inoculadas foram também observadas por Obradovic *et al.* (1989). Situação semelhante verificou-se relativamente às contagens de *Micrococcaceae*, sendo neste caso as diferenças entre os lotes inoculados e não inoculados ainda menor, da ordem de 1,5 log

ufc/g, registados a partir de amostras recolhidas 2 horas após a inoculação de 6 log ufc/g de uma estirpe de *Staphylococcus xylosus*. Em trabalhos realizados com estirpes de *S. xylosus* e *S. carnosus* que foram inoculados num tipo de enchido fermentado e que eram provenientes desse mesmo tipo de enchido, Bover-Cid *et al.* (1999a) encontraram resultados semelhantes.

Quadro 89 – 1º ensaio de inoculação: análise de variância para resultados de análises microbiológicas considerando duas fábricas (A e B) e os factores fase do processo (2, 3 e 4) e modalidade de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A			Fábrica B		
	Fase (1)	Modalidade inoculação (2)	Interacção 1x2	Fase (1)	Modalidade inoculação (2)	Interacção 1x2
	G.L.=2	G.L.=3	G.L.=6	G.L.=2	G.L.=3	G.L.=6
Mesófilos Totais	$F=22,0863$ $p=0,0000***$	$F=2,5051$ $p=0,0746$	$F=2,9067$ $p=0,0205*$	$F=17,5958$ $p=0,0000***$	$F=6,2265$ $p=0,0016**$	$F=3,1376$ $p=0,0141*$
Psicrotróficos totais	$F=22,9987$ $p=0,0000***$	$F=3,6513$ $p=0,0214*$	$F=0,7356$ $p=0,6243$	$F=15,3098$ $p=0,0000***$	$F=8,2688$ $p=0,0003***$	$F=13,1551$ $p=0,0000***$
Leveduras	$F=51,2307$ $p=0,0000***$	$F=10,4548$ $p=0,0000***$	$F=1,3987$ $p=0,2419$	$F=5,9724$ $p=0,0058**$	$F=17,3464$ $p=0,0000***$	$F=5,0557$ $p=0,0008***$
<i>Lactobacillus spp.</i>	$F=10,6861$ $p=0,0002***$	$F=4,9352$ $p=0,0057**$	$F=5,6427$ $p=0,0003***$	$F=28,0518$ $p=0,0000***$	$F=10,0594$ $p=0,0001***$	$F=3,6184$ $p=0,0065**$
Bactérias ácido lácticas	$F=9,4613$ $p=0,0005***$	$F=4,7987$ $p=0,0065**$	$F=2,3823$ $p=0,0485*$	$F=20,1448$ $p=0,0000***$	$F=10,1761$ $p=0,0001***$	$F=3,1929$ $p=0,0129*$
<i>Micrococcaceae</i>	$F=20,2527$ $p=0,0000***$	$F=13,8214$ $p=0,0000***$	$F=4,5343$ $p=0,0016**$	$F=1,8501$ $p=0,1719$	$F=6,8361$ $p=0,0009***$	$F=2,3614$ $P=0,0502*$
Esporos de bactérias aeróbias	$F=6,2749$ $p=0,0046**$	$F=4,3927$ $p=0,0098*$	$F=0,9825$ $p=0,4514$	$F=2,0051$ $p=0,1494$	$F=1,4219$ $p=0,2523$	$F=0,5871$ $p=0,7382$
<i>Enterobacteriaceae</i>	$F=50,5396$ $p=0,0000***$	$F=1,3949$ $p=0,2601$	$F=0,6006$ $p=0,7279$	$F=23,5555$ $p=0,0000***$	$F=14,5860$ $p=0,0000***$	$F=4,5477$ $p=0,0016**$
<i>Streptococci</i> do grupo D	$F=10,7804$ $p=0,0002***$	$F=53,4416$ $p=0,0000***$	$F=5,7025$ $p=0,0003$	$F=28,7934$ $p=0,0000***$	$F=73,7927$ $p=0,0000***$	$F=53,1744$ $p=0,0000***$
Esporos de <i>Clostridia</i> sulfito-redutores	$F=11,1482$ $p=0,0002***$	$F=0,4321$ $p=0,7313$	$F=1,6173$ $p=0,1707$	$F=22,4237$ $p=0,0000***$	$F=0,4576$ $p=0,7136$	$F=0,6610$ $p=0,6813$
Bactérias coliformes	$F=27,4643$ $p=0,0000***$	$F=1,8095$ $p=0,1629$	$F=1,5595$ $p=0,1874$	$F=2,7857$ $p=0,0750$	$F=0,7857$ $p=0,5098$	$F=0,3571$ $p=0,9010$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade. Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$; ***significativo para $p<0,001$.

Quadro 90 – 2º ensaio de inoculação: análise de variância para resultados de análises microbiológicas considerando duas fábricas (A e B) e os factores fase do processo (1, 2, 3 e 4) e modalidade de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A			Fábrica B		
	Fase	Modalidade inoculação	Interacção 1x2	Fase	Modalidade inoculação	Interacção 1x2
	(1)	(2)	G.L.=9	(1)	(2)	G.L.=9
	G.L.=3	G.L.=3	G.L.=9	G.L.=3	G.L.=3	G.L.=9
Mesófilos totais	<i>F</i> =6,2908 p=0,0011**	<i>F</i> =5,5674 p=0,0023**	<i>F</i> =9,2201 p=0,0000***	<i>F</i> =45,0688 p=0,0000***	<i>F</i> =5,6717 p=0,0021**	<i>F</i> =3,2793 p=0,0035**
Psicrotróficos totais	<i>F</i> =9,5887 p=0,0000***	<i>F</i> =1,3343 p=0,2742	<i>F</i> =1,0640 p=0,4059	<i>F</i> =64,8706 p=0,0000***	<i>F</i> =32,8000 p=0,0000***	<i>F</i> =8,0490 p=0,0000***
Leveduras	<i>F</i> =9,5014 p=0,0000***	<i>F</i> =0,8200 p=0,4892	<i>F</i> =0,6554 p=0,7441	<i>F</i> =42,1533 p=0,0000***	<i>F</i> =54,4033 p=0,0000***	<i>F</i> =9,3063 p=0,0000***
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>F</i> =94,4157 p=0,0000***	<i>F</i> =1,2805 p=0,2917	<i>F</i> =2,7704 p=0,0107*	<i>F</i> =305,0485 p=0,0000***	<i>F</i> =4,7408 p=0,0056**	<i>F</i> =4,9620 p=0,0001***
Bactérias ácido lácticas	<i>F</i> =38,0029 p=0,0000***	<i>F</i> =1,0450 p=0,3813	<i>F</i> =1,5028 p=0,1742	<i>F</i> =248,6129 p=0,0000***	<i>F</i> =6,0642 p=0,0014**	<i>F</i> =6,4593 p=0,0000***
<i>Micrococcaceae</i>	<i>F</i> =26,9438 p=0,0000***	<i>F</i> =6,4432 p=0,0009***	<i>F</i> =2,3254 p=0,0291*	<i>F</i> =184,5966 p=0,0000***	<i>F</i> =25,4698 p=0,0000***	<i>F</i> =3,7308 p=0,0013**
Esporos de bactérias aeróbias	<i>F</i> =249,0778 p=0,0000***	<i>F</i> =0,7985 p=0,5008	<i>F</i> =1,3497 p=0,2375	<i>F</i> =87,7455 p=0,0000***	<i>F</i> =24,5210 p=0,0000***	<i>F</i> =8,0431 p=0,0000***
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>F</i> =134,9083 p=0,0000***	<i>F</i> =1,4886 p=0,2295	<i>F</i> =0,9698 p=0,4764	<i>F</i> =17,4033 p=0,0000***	<i>F</i> =33,9718 p=0,0000***	<i>F</i> =6,4887 p=0,0000***
<i>Streptococci</i> do grupo D	<i>F</i> =74,5126 p=0,0000***	<i>F</i> =61,3752 p=0,0000***	<i>F</i> =11,0117 p=0,0000***	<i>F</i> =16,4276 p=0,0000***	<i>F</i> =10,6336 p=0,0000***	<i>F</i> =3,6095 p=0,0017**
Esporos de <i>Clostridia</i> sulfito-redutores	<i>F</i> =11,4000 p=0,0000***	<i>F</i> =2,8947 p=0,0447*	<i>F</i> =2,1088 p=0,0471*	<i>F</i> =0,8000 p=0,5000	<i>F</i> =2,4000 p=0,0794	<i>F</i> =1,6000 p=0,1423
Bactérias coliformes	<i>F</i> =124,3750 p=0,0000***	<i>F</i> =7,8750 p=0,0002***	<i>F</i> =2,9167 p=0,0077**	<i>F</i> =16,8598 p=0,0000***	<i>F</i> =10,7664 p=0,0000***	<i>F</i> =2,9034 p=0,0080**
<i>Escherichia coli</i>	<i>F</i> =117,8276 p=0,0000***	<i>F</i> =0,4023 p=0,7520	<i>F</i> =1,0766 p=0,3970	<i>F</i> =7,5271 p=0,0003***	<i>F</i> =18,3798 p=0,0000***	<i>F</i> =3,0827 p=0,0054**

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância - *significativo para p<0,05; **significativo para p<0,01; ***significativo para p<0,001.

No que respeita aos microrganismos indicadores de condições higio-sanitárias (Quadros 91.2 e 91.3), *Enterobacteriaceae*, na fase 2 (pré-enchimento), teve valores mais elevados no lote testemunha. Nas fases 3 (meio da cura) e 4 (produto final) os valores mais baixos foram os do lote inoculado com a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e

Staphylococcus xylosus; no produto final o resultado das contagens de *Enterobacteriaceae* nesta modalidade de inoculação foi inferior ao limiar de detecção do método utilizado.

A contagem de *Streptococci* do grupo D, em todas as fases, foi inferior no lote inoculado com *Lactobacillus sakei* em cultura pura, provavelmente por acção tanto do ácido láctico como de outros metabolitos produzidos por aqueles microorganismos.

A estimativa do número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores no produto final (fase 4) dos paioes testemunha produzidos na fábrica A foi superior à das outras modalidades de inoculação.

O número de bactérias coliformes na fase 4 (produto final) foi inferior no lote testemunha. No entanto, o resultado da estimativa do número de células viáveis de *Escherichia coli* foi, em todas as fases, inferior ao limiar de detecção do método utilizado.

No 1º ensaio de inoculação que decorreu na fábrica B, as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos totais na fase 2 (pré-enchimento) foram mais baixas no lote inoculado com a cultura pura de *Lactobacillus sakei*. No entanto essas diferenças atenuaram-se ao longo da cura e no produto final (fase 4) o lote testemunha foi o que apresentou os valores mais baixos, significativamente diferentes dos lotes inoculados com culturas puras de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus*.

As leveduras existiram sempre em maior número nos paioes do lote testemunha; os valores mais baixos registaram-se nos lotes inoculados com culturas puras de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus*.

Os esporos de bactérias aeróbias tiveram valores muito próximos entre as 4 modalidades de inoculação em qualquer das fases de fabrico consideradas.

Na fábrica B, durante o 1º ensaio de inoculação, a evolução e distribuição de *Lactobacillus* spp., bactérias ácido lácticas e *Micrococcaceae* foi muito semelhante à apresentada para os produtos da fábrica A, embora nesta última fábrica as contagens de *Lactobacillus* spp. e de bactérias ácido lácticas tenham sido superiores e as de *Micrococcaceae* tenham sido inferiores.

Ainda a propósito do 1º ensaio realizado na fábrica B, o número de *Enterobacteriaceae* foi maior no lote testemunha, tanto no início do processo (fase 2) como no termo (fase 4). O número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores e de bactérias coliformes não variou de modo sensível entre as 4 modalidades de inoculação. Os resultados da estimativa do número de células viáveis de *Escherichia coli* foram sempre inferiores ao limiar de detecção do método utilizado.

No 2º ensaio de inoculação os lotes produzidos na fábrica A apresentaram contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos totais, leveduras e esporos de bactérias aeróbias relativamente semelhantes entre as 4 modalidades de inoculação (Quadros 92.1 e 92.2), tal como já havia sido verificado no 1º ensaio. Uma vez mais, o número de microrganismos mesófilos totais na fase 2 (pré-enchimento) foi inferior no grupo testemunha.

Quadro 91.1 – 1º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha) ao longo de 3 fases de fabrico (pré-enchimento (2); fase intermédia da cura (3); produto final (4)).

Fase	Modalidade inoculação	Mesófilos totais (log UFC/g)	Psicrotróficos totais (log UFC/g)	Leveduras (log UFC/g)	<i>Lactobacillus</i> spp. (log UFC/g)
Fábrica A	LxS	8,22 a ± 0,47	6,36 ± 0,23	4,69 ± 0,29	8,57 a ± 0,68
	L	8,45 a ± 0,11	6,27 ± 0,43	4,99 ± 0,34	8,60 a ± 0,34
	S	8,06 ab ± 0,75	6,38 ± 0,24	4,33 ± 0,38	7,75 ab ± 0,98
	T	7,23 b ± 0,19	7,09 ± 0,05	5,20 ± 0,33	6,60 b ± 0,30
	LxS	9,06 ± 0,20	7,49 ± 0,15	5,88 ± 0,28	8,89 ± 0,36
	L	8,78 ± 0,59	7,20 ± 0,35	6,17 ± 0,32	9,12 ± 0,32
	S	8,79 ± 0,30	7,57 ± 0,14	5,55 ± 0,16	8,34 ± 0,24
	T	8,69 ± 0,19	7,88 ± 0,43	6,17 ± 0,45	8,53 ± 0,20
	LxS	8,72 ± 0,14	7,62 ± 0,52	4,53 ± 0,18	7,95 ± 0,93
	L	8,62 ± 0,30	7,09 ± 1,02	5,13 ± 0,22	8,54 ± 0,29
	S	8,73 ± 0,19	7,58 ± 0,72	4,96 ± 0,59	8,61 ± 0,23
	T	8,87 ± 0,58	7,49 ± 0,37	5,46 ± 0,28	8,75 ± 0,60
Fábrica B	LxS	7,62 a ± 0,41	7,25 ac ± 0,19	4,31 ± 0,37	7,40 a ± 0,54
	L	6,67 b ± 0,16	5,83 b ± 0,36	4,22 ± 0,16	6,00 bc ± 0,22
	S	7,66 a ± 0,39	6,53 bc ± 0,22	4,63 ± 0,37	7,23 ab ± 0,32
	T	7,04 ab ± 0,43	6,98 c ± 0,36	4,98 ± 0,23	5,51 c ± 0,66
	LxS	8,04 ± 0,17	6,81 a ± 0,39	5,08 a ± 0,16	8,12 ± 0,20
	L	8,06 ± 0,36	7,13 a ± 0,32	1,42 b ± 1,65	8,12 ± 0,30
	S	7,94 ± 0,09	6,29 ab ± 0,35	0,67 b ± 1,35	7,72 ± 0,14
	T	7,35 ± 0,55	5,78 b ± 0,27	5,62 a ± 0,37	7,02 ± 1,42
	LxS	7,93 ± 0,43	5,94 ab ± 0,13	4,99 ± 0,28	7,60 ± 0,33
	L	8,00 ± 0,17	6,16 b ± 0,41	2,42 ± 2,80	7,81 ± 0,19
	S	7,95 ± 0,28	6,67 b ± 0,56	3,12 ± 1,14	8,02 ± 0,11
	T	7,66 ± 0,31	5,10 a ± 0,57	5,04 ± 0,22	7,47 ± 0,33

Legenda: Modalidades de Inoculação - LxS: *Lactobacillus sakei*/x *Staphylococcus xylosus*; L: *Lactobacillus sakei*; S: *Staphylococcus xylosus*; T: Testemunha.

Na mesma coluna: para cada uma das fases de fabrico dentro da mesma fábrica, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Quadro 91.2 – 1º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha) ao longo de 3 fases de fabrico (pré-enchimento (2); fase intermédia da cura (3); produto final (4)).

Fase	Modalidade inoculação	Bactérias ácido lácticas (log UFC/g)	Micrococcaceae (log UFC/g)	Esporos de bactérias aeróbias (log nº esporos/g)	Enterobacteriaceae (log UFC/g)
Fábrica A	<i>LxS</i>	8,66 a ± 0,77	7,20 a ± 0,15	5,59 ± 0,26	4,91 ± 0,73
	<i>L</i>	8,49 a ± 0,31	5,32 bd ± 0,49	5,37 ± 1,22	4,90 ± 0,09
	<i>S</i>	7,54 ab ± 0,46	6,86 ac ± 0,63	5,28 ± 0,24	4,72 ± 0,37
	<i>T</i>	6,97 b ± 0,61	6,19 cd ± 0,16	5,42 ± 0,31	5,17 ± 0,08
	<i>LxS</i>	8,82 ± 0,32	7,24 ± 0,13	5,19 ± 0,07	2,65 ± 0,79
	<i>L</i>	9,29 ± 0,16	7,19 ± 0,25	5,21 ± 0,06	3,58 ± 1,33
	<i>S</i>	8,52 ± 0,24	7,16 ± 0,57	5,12 ± 0,04	4,00 ± 0,25
	<i>T</i>	8,52 ± 0,15	7,34 ± 0,17	5,22 ± 0,13	3,07 ± 2,22
	<i>LxS</i>	8,34 ± 0,46	6,95 ± 0,61	5,48 ± 0,15	0,00 ± 0,00
	<i>L</i>	8,45 ± 0,30	5,97 ± 0,23	5,14 ± 0,25	1,29 ± 1,50
	<i>S</i>	8,55 ± 0,21	6,88 ± 0,50	5,11 ± 0,21	1,41 ± 1,64
	<i>T</i>	8,39 ± 1,44	6,16 ± 0,44	5,40 ± 0,10	1,20 ± 1,42
Fábrica B	<i>LxS</i>	7,27 ab ± 0,80	7,29 ± 0,63	2,64 ± 0,13	2,74 ± 0,61
	<i>L</i>	6,03 bc ± 0,32	6,16 ± 0,28	2,91 ± 0,34	2,69 ± 0,53
	<i>S</i>	7,29 ab ± 0,32	7,54 ± 0,34	3,09 ± 0,51	3,26 ± 0,40
	<i>T</i>	5,26 c ± 0,64	6,13 ± 0,37	3,06 ± 0,48	3,44 ± 0,74
	<i>LxS</i>	8,00 ± 0,15	6,57 ± 0,30	2,85 ± 0,65	2,84 ac ± 0,69
	<i>L</i>	7,82 ± 0,35	7,59 ± 0,48	2,74 ± 0,31	0,00 b ± 0,00
	<i>S</i>	7,60 ± 0,16	7,77 ± 0,42	3,02 ± 0,39	0,00 b ± 0,00
	<i>T</i>	6,86 ± 1,34	6,88 ± 0,24	2,61 ± 0,36	1,71 bc ± 1,21
	<i>LxS</i>	7,48 ± 0,23	7,14 ± 1,77	2,59 ± 0,20	2,01ab ± 1,54
	<i>L</i>	7,71 ± 0,39	7,11 ± 0,23	2,63 ± 0,05	0,00 a ± 0,00
	<i>S</i>	7,62 ± 0,22	7,42 ± 0,36	2,83 ± 0,21	0,62 a ± 1,24
	<i>T</i>	7,26 ± 0,49	6,29 ± 0,22	2,65 ± 0,10	3,20 b ± 1,08

Legenda: Modalidades de Inoculação – *LxS*: *Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *L*: *Lactobacillus sakei*; *S*: *Staphylococcus xylosus*; *T*: Testemunha.

Na mesma coluna: para cada uma das fases de fabrico dentro da mesma fábrica, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Quadro 91.3 – 1º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha) ao longo de 3 fases de fabrico (pré-enchimento (2); fase intermédia da cura (3); produto final (4)).

Fase	Modalidade inoculação	Streptococci do grupo D (log UFC/g)	Esporos de Clostridia sulfito-redutores [▲]	Bactérias coliformes [▲]	<i>Escherichia coli</i> [▲]
Fábrica A	<i>LxS</i>	6,27 a ± 0,31	2,75 ± 0,50	4,50 ± 0,58	1,00 ± 0,00
	<i>L</i>	3,36 b ± 0,83	3,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	<i>S</i>	5,57 a ± 0,71	2,50 ± 1,00	3,25 ± 0,96	1,00 ± 0,00
	<i>T</i>	3,85 b ± 0,82	2,25 ± 0,96	4,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	<i>LxS</i>	5,94 a ± 1,10	1,00 ± 0,00	2,75 ± 1,26	1,00 ± 0,00
	<i>L</i>	3,23 b ± 1,03	1,25 ± 0,50	3,00 ± 0,82	1,00 ± 0,00
	<i>S</i>	6,56 a ± 0,64	1,75 ± 0,96	2,75 ± 0,96	1,00 ± 0,00
	<i>T</i>	6,57 a ± 0,58	1,50 ± 1,00	3,00 ± 1,15	1,00 ± 0,00
	<i>LxS</i>	5,04 ac ± 0,50	1,75 ± 0,50	2,50 ± 0,58	1,00 ± 0,00
	<i>L</i>	2,26 b ± 0,37	1,75 ± 0,50	2,25 ± 0,96	1,00 ± 0,00
	<i>S</i>	6,48 a ± 0,39	1,50 ± 0,58	2,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	<i>T</i>	4,23 c ± 0,29	2,75 ± 1,26	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Fábrica B	<i>LxS</i>	5,99 a ± 0,24	1,00 ± 0,00	1,50 ± 1,00	1,00 ± 0,00
	<i>L</i>	0,50 b ± 0,58	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	<i>S</i>	6,06 a ± 0,41	1,00 ± 0,00	1,75 ± 1,50	1,00 ± 0,00
	<i>T</i>	2,51 c ± 0,97	1,00 ± 0,00	1,75 ± 0,96	1,00 ± 0,00
	<i>LxS</i>	3,26 a ± 0,22	2,50 ± 0,58	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	<i>L</i>	5,99 b ± 0,32	2,25 ± 0,50	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	<i>S</i>	6,88 b ± 0,59	2,25 ± 0,50	1,25 ± 0,50	1,00 ± 0,00
	<i>T</i>	3,50 a ± 0,60	3,00 ± 0,82	1,25 ± 0,50	1,00 ± 0,00
	<i>LxS</i>	2,83 a ± 0,81	2,25 ± 0,50	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	<i>L</i>	6,64 b ± 0,13	2,00 ± 1,41	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	<i>S</i>	7,12 b ± 0,32	1,75 ± 0,96	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	<i>T</i>	4,33 c ± 0,90	1,75 ± 0,50	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

Legenda: Modalidades de Inoculação - *LxS*: *Lactobacillus sakei*x *Staphylococcus xylosus*; *L*: *Lactobacillus sakei*; *S*: *Staphylococcus xylosus*; *T*: Testemunha.

Na mesma coluna: para cada uma das fases de fabrico dentro da mesma fábrica, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

□Resultados para esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *E. Coli*.

Classe 1: < 1 esporo/bactéria g⁻¹

Classe 2: ≥ 1 e < 10 esporos/bactérias g⁻¹

Classe 3: ≥ 10 e < 100 esporos/bactérias g⁻¹

Classe 4: ≥ 100 e < 1000 esporos/bactérias g⁻¹

Classe 5: ≥ 1000 e < 10000 esporos/bactérias g⁻¹

Quanto aos microrganismos com interesse tecnológico, *Lactobacillus* spp. existiu, na fase 2, em número inferior no lote inoculado com *Staphylococcus xylosus* em cultura pura e no lote testemunha. Nas restantes fases de fabrico verificou-se um certo equilíbrio entre as 4 modalidades de inoculação.

Os resultados obtidos para as bactérias ácido lácticas na fase 2 foram semelhantes aos obtidos para a contagem de *Lactobacillus* spp. na mesma fase. Contudo, na fase 4 (produto final) o lote inoculado com a cultura pura de *Lactobacillus sakei* apresentou valores notoriamente inferiores aos das outras modalidades de inoculação.

Na fase 2 (pré-enchimento) o lote inoculado com a cultura pura de *Staphylococcus xylosus* apresentou contagens de *Micrococcaceae* superiores às dos restantes lotes e no produto final (fase 4) aquelas contagens foram inferiores no lote testemunha.

A meio da cura (fase 3) as contagens de *Enterobacteriaceae* mais elevadas foram as do lote testemunha. No produto final (fase 4) os lotes inoculados com *Lactobacillus sakei* foram os que apresentaram valores mais baixos, com um resultado inferior ao limiar de detecção do método utilizado no lote inoculado com a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus*.

A contagem de *Streptococci* do grupo D (Quadro 92.3) foi sempre superior nos lotes inoculados com *Staphylococcus xylosus*, tal como já havia acontecido no 1º ensaio de inoculação, nos produtos de ambas as fábricas. Estes resultados sugerem o estabelecimento de sinergias entre aqueles microrganismos em que a presença de *Staphylococcus xylosus* de algum modo facilita a multiplicação de *Streptococci* do grupo D. Em paisos espanhóis, Selgas (1985) encontrou uma microbiota que cresceu abundantemente em placas com meio “Manitol Salt Agar”, incubadas a 18°C, e colocou a hipótese de se tratarem de *Streptococci* do grupo D, que segundo Sharpe (1979) crescem perfeitamente entre 10 e 45°C. Parente *et al.* (1989) encontraram crescimento de *Streptococci* do grupo D em placas com “Manitol Salt Agar” inoculadas a partir de amostras de queijo. Considerando que existem espécies que integram *Streptococci* do grupo D que crescem em presença de concentrações de cloreto de sódio de 6,5 e 7,5% (Sharpe, 1979; Jones, 1988; Selgas *et al.*, 1988), colocamos também a hipótese de algumas estirpes de *Micrococcaceae* crescerem no meio de “Kanamicina Aesculin Azide Agar”, usado para o crescimento de *Streptococci* do grupo D.

Os esporos de *Clostridia* sulfito-redutores no produto final (fase 4) têm valores muito semelhantes entre as modalidades de inoculação, sobretudo entre os lotes inoculados com culturas puras de *Lactobacillus sakei* e de *Staphylococcus xylosus* e o lote testemunha.

Bactérias coliformes e *Escherichia coli* apresentaram valores elevados logo no início do estudo (fase 1). As primeiras existiram sempre em maior número no lote testemunha, sendo esta diferença mais acentuada nas fases 3 (meio da cura) e 4 (produto final). Nesta última fase o valor da média do lote testemunha foi significativamente superior à dos lotes inoculados com *Lactobacillus sakei*, quer em cultura pura, quer em cultura mista. Estes resultados supõem ter havido uma acção antagonista de *Lactobacillus sakei* sobre as bactérias coliformes, através da produção de ácido láctico ou de outros metabolitos.

Quadro 92.1 – 2º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha) ao longo de 4 fases de fabrico (massa não condimentada (1); pré-enchimento (2); fase intermédia da cura (3); produto final (4)).

Fase	Modalidade inoculação	Mesófilos totais (log UFC/g)	Psicrotróficos totais (log UFC/g)	Leveduras (log UFC/g)	<i>Lactobacillus</i> spp. (log UFC/g)
Fábrica A	LxS	8,81 ± 0,23	8,97 ± 0,10	4,63 ± 0,42	6,09 ± 0,57
	L	8,81 ± 0,23	8,97 ± 0,10	4,63 ± 0,42	6,09 ± 0,57
	S	8,81 ± 0,23	8,97 ± 0,10	4,63 ± 0,42	6,09 ± 0,57
	T	8,81 ± 0,23	8,97 ± 0,10	4,63 ± 0,42	6,09 ± 0,57
	LxS	8,98 a ± 0,49	7,77 ± 0,47	5,09 ± 0,92	8,69 a ± 0,37
	L	8,49 ab ± 0,72	6,84 ± 1,52	5,71 ± 0,53	8,11 ab ± 0,21
	S	8,78 a ± 0,44	8,10 ± 0,45	5,55 ± 1,21	7,55 ab ± 1,02
	T	7,78 b ± 0,23	7,50 ± 0,57	5,70 ± 0,36	7,13 b ± 0,33
	LxS	6,87 a ± 0,27	7,39 ± 2,32	5,66 ± 0,49	8,70 ± 0,24
	L	8,73 b ± 0,25	8,50 ± 0,26	5,38 ± 0,25	8,74 ± 0,27
Fábrica B	S	8,96 b ± 0,14	8,75 ± 0,31	5,47 ± 0,61	8,83 ± 0,08
	T	8,66 b ± 0,19	8,65 ± 0,28	5,68 ± 0,27	8,58 ± 0,20
	LxS	8,08 ± 0,61	7,50 ± 0,48	5,27 ± 0,26	7,85 ± 0,46
	L	8,46 ± 0,35	7,78 ± 0,68	4,91 ± 0,41	8,10 ± 0,14
	S	8,22 ± 0,41	7,80 ± 1,01	4,99 ± 0,55	8,06 ± 0,53
	T	8,41 ± 0,56	8,10 ± 0,26	5,63 ± 0,36	8,36 ± 0,32
	LxS	6,81 ± 0,80	6,81 ± 0,75	3,65 ± 0,45	4,75 ± 0,72
	L	6,81 ± 0,80	6,81 ± 0,75	3,65 ± 0,45	4,75 ± 0,72
	S	6,81 ± 0,80	6,81 ± 0,75	3,65 ± 0,45	4,75 ± 0,72
	T	6,81 ± 0,80	6,81 ± 0,75	3,65 ± 0,45	4,75 ± 0,72
Fábrica B	LxS	8,42 ± 0,21	7,04 a ± 0,95	2,99 a ± 0,48	7,55 a ± 0,25
	L	8,71 ± 0,31	8,59 b ± 0,22	5,09 b ± 0,12	8,25 a ± 0,11
	S	8,73 ± 0,21	7,12 a ± 0,31	3,70 ab ± 0,04	6,17 b ± 0,41
	T	8,24 ± 0,23	8,31 b ± 0,16	4,90 b ± 0,43	7,26 a ± 0,18
	LxS	7,53 ab ± 0,08	4,37 a ± 0,30	0,00 a ± 0,00	8,36 ± 0,15
	L	7,01 b ± 0,18	5,78 b ± 0,32	4,15 b ± 0,33	8,50 ± 0,10
	S	7,97 ab ± 0,09	6,62 bc ± 0,28	0,00 a ± 0,00	8,49 ± 0,12
	T	8,24 a ± 0,11	7,76 c ± 0,11	3,94 b ± 0,83	8,49 ± 0,04
	LxS	7,21ab ± 0,23	3,95 a ± 0,51	0,42 a ± 0,85	8,22 ± 0,11
	L	6,44 a ± 0,33	4,87 a ± 0,43	3,83 b ± 1,14	8,23 ± 0,15
4	S	7,50 ab ± 0,13	4,99 a ± 0,74	1,27 a ± 0,85	8,25 ± 0,08
	T	7,91 b ± 0,10	6,89 b ± 0,36	3,12 b ± 1,48	8,37 ± 0,11

Legenda: Modalidades de Inoculação – LxS: *Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; L: *Lactobacillus sakei*; S: *Staphylococcus xylosus*; T: Testemunha.

Na mesma coluna: para cada uma das fases de fabrico dentro da mesma fábrica, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Quadro 92.2 – 2º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha) ao longo de 4 fases de fabrico (massa não condimentada (1); pré-enchimento (2); fase intermédia da cura (3); produto final (4)).

Fase	Modalidade inoculação	Bactérias ácido lácticas (log UFC/g)	Micrococcaceae (log UFC/g)	Esporos de bactérias aeróbias (log nº esporos/g)	Enterobacteriaceae (log UFC/g)
Fábrica A	LxS	5,69 ± 0,51	6,55 ± 0,19	2,41 ± 0,35	5,79 ± 0,22
	L	5,69 ± 0,51	6,55 ± 0,19	2,41 ± 0,35	5,79 ± 0,22
	S	5,69 ± 0,51	6,55 ± 0,19	2,41 ± 0,35	5,79 ± 0,22
	T	5,69 ± 0,51	6,55 ± 0,19	2,41 ± 0,35	5,79 ± 0,22
	LxS	8,72 ab ± 0,30	7,92 a ± 0,53	5,20 ± 0,14	5,94 ± 0,34
	L	8,04 b ± 0,43	6,59 b ± 1,16	4,38 ± 0,79	5,62 ± 1,16
	S	7,67 c ± 1,07	8,22 a ± 0,27	4,63 ± 0,33	5,79 ± 1,35
	T	7,14 ac ± 0,37	7,36 ab ± 0,26	4,60 ± 0,49	5,83 ± 0,74
	LxS	8,69 ± 0,38	6,69 ± 0,96	5,29 ± 0,08	2,52 ± 0,56
	L	8,62 ± 0,22	5,58 ± 0,28	5,41 ± 0,09	3,35 ± 0,55
Fábrica B	S	8,87 ± 0,10	6,05 ± 0,17	5,19 ± 0,24	2,88 ± 0,31
	T	8,69 ± 0,27	5,71 ± 0,49	5,42 ± 0,22	4,01 ± 0,25
	LxS	7,96 ± 0,31	6,31 ± 0,50	5,07 ± 0,28	0,00 ± 0,00
	L	6,73 ± 2,77	6,32 ± 0,79	5,14 ± 0,28	0,77 ± 1,54
	S	8,25 ± 0,67	6,65 ± 0,17	5,12 ± 0,32	1,29 ± 1,50
	T	8,24 ± 0,35	5,88 ± 0,16	5,29 ± 0,13	1,08 ± 1,25
	LxS	4,21 ± 0,94	3,99 ± 0,80	2,66 ± 0,19	4,65 ± 0,50
	L	4,21 ± 0,94	3,99 ± 0,80	2,66 ± 0,19	4,65 ± 0,50
	S	4,21 ± 0,94	3,99 ± 0,80	2,66 ± 0,19	4,65 ± 0,50
	T	4,21 ± 0,94	3,99 ± 0,80	2,66 ± 0,19	4,65 ± 0,50
Fábrica B	LxS	7,48 ± 0,17	8,31 a ± 0,37	4,91 a ± 0,76	3,98 ± 0,24
	L	8,30 ± 0,12	6,67 b ± 0,40	3,33 b ± 0,48	5,20 ± 0,25
	S	5,52 ± 0,21	8,49 a ± 0,21	5,28 ac ± 0,21	4,77 ± 0,21
	T	6,36 ± 0,15	6,36 b ± 0,43	6,25 c ± 0,11	5,61 ± 0,23
	LxS	8,19 ± 0,19	7,72 a ± 0,12	2,97 a ± 0,38	2,69 a ± 0,47
	L	8,45 ± 0,12	6,74 ab ± 0,30	3,58 ab ± 0,41	4,30 b ± 0,89
	S	8,40 ± 0,15	7,68 ab ± 0,08	3,91 ab ± 0,63	4,40 b ± 0,38
	T	8,37 ± 0,06	6,47 b ± 0,32	4,31 b ± 0,43	6,02 c ± 0,36
	LxS	8,11 ± 0,14	7,33 ab ± 0,22	4,02 ± 0,67	1,65 a ± 1,11
	L	8,24 ± 0,10	6,62 ab ± 0,25	3,48 ± 0,25	3,75 b ± 0,67
Fábrica B	S	8,22 ± 0,04	7,62 a ± 0,13	4,19 ± 0,36	2,32 a ± 1,56
	T	8,31 ± 0,19	6,15 b ± 0,39	4,49 ± 0,28	5,71 c ± 0,26

Legenda: Modalidades de Inoculação – LxS: *Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; L: *Lactobacillus sakei*; S: *Staphylococcus xylosus*; T: Testemunha.

Na mesma coluna: para cada uma das fases de fabrico dentro da mesma fábrica, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Quadro 92.3 – 2º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados de análises microbiológicas considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha) ao longo de 4 fases de fabrico (massa não condimentada (1); pré-enchimento (2); fase intermédia da cura (3); produto final (4)).

Fase	Modalidade inoculação	<i>Streptococci</i> do grupo D (log UFC/g)	Esporos de <i>Clostridia</i> sulfito-redutores [▲]	Bactérias Coliformes [▲]	<i>Escherichia coli</i> [▲]
Fábrica A	<i>LxS</i>	5,42 ± 0,45	1,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	5,50 ± 0,58
	<i>L</i>	5,42 ± 0,45	1,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	5,50 ± 0,58
	<i>S</i>	5,42 ± 0,45	1,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	5,50 ± 0,58
	<i>T</i>	5,42 ± 0,45	1,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	5,50 ± 0,58
	<i>LxS</i>	5,38 a ± 0,04	2,25 ± 0,96	5,25 ± 0,50	5,00 ± 0,00
	<i>L</i>	2,93 b ± 0,02	3,25 ± 0,50	5,25 ± 0,50	4,25 ± 1,50
	<i>S</i>	6,72 c ± 0,42	2,00 ± 1,15	5,25 ± 0,50	5,00 ± 0,00
	<i>T</i>	4,34 a ± 0,11	1,50 ± 0,56	5,50 ± 0,58	5,50 ± 0,58
	<i>LxS</i>	4,40 ac ± 0,11	2,00 ± 0,00	4,50 ± 0,58	4,50 ± 0,58
	<i>L</i>	2,31 b ± 0,23	3,00 ± 0,82	4,75 ± 0,96	4,00 ± 0,82
	<i>S</i>	5,13 c ± 0,36	2,25 ± 0,96	4,50 ± 0,58	3,75 ± 0,50
	<i>T</i>	3,34 ab ± 0,39	1,75 ± 0,96	5,75 ± 0,50	3,75 ± 0,50
Fábrica B	<i>LxS</i>	2,98 a ± 0,55	2,50 ± 1,00	1,25 a ± 0,50	1,25 ± 0,50
	<i>L</i>	2,79 a ± 0,72	1,25 ± 0,50	1,75 ab ± 0,96	1,50 ± 0,58
	<i>S</i>	4,45 b ± 0,30	1,50 ± 0,56	2,75 bc ± 0,96	1,50 ± 1,00
	<i>T</i>	3,01 a ± 0,95	1,50 ± 1,00	3,50 c ± 0,58	1,25 ± 0,50
	<i>LxS</i>	2,72 ± 0,68	1,00 ± 0,00	4,25 ± 1,50	3,00 ± 0,00
	<i>L</i>	2,72 ± 0,68	1,00 ± 0,00	4,25 ± 1,50	3,00 ± 0,00
	<i>S</i>	2,72 ± 0,68	1,00 ± 0,00	4,25 ± 1,50	3,00 ± 0,00
	<i>T</i>	2,72 ± 0,68	1,00 ± 0,00	4,25 ± 1,50	3,00 ± 0,00
	<i>LxS</i>	2,64 a ± 0,13	1,25 ± 0,50	4,25 ± 0,50	2,50 a ± 0,58
	<i>L</i>	4,64 b ± 0,45	1,00 ± 0,00	5,75 ± 0,50	3,25 a ± 1,71
	<i>S</i>	2,82 a ± 0,63	1,00 ± 0,00	5,00 ± 0,82	2,75 a ± 0,50
	<i>T</i>	3,64 c ± 0,28	1,00 ± 0,00	5,75 ± 0,50	4,50 b ± 1,00
Fábrica B	<i>LxS</i>	3,26 a ± 0,41	1,00 ± 0,00	2,25 a ± 0,96	2,25 ab ± 0,96
	<i>L</i>	3,73 ab ± 0,60	1,00 ± 0,00	2,00 a ± 0,82	1,75 a ± 0,96
	<i>S</i>	4,11 bc ± 0,38	1,00 ± 0,00	3,25 a ± 1,50	3,00 b ± 1,41
	<i>T</i>	4,71 c ± 0,13	1,25 ± 0,50	6,00 b ± 0,00	5,25 c ± 0,96
	<i>LxS</i>	3,09 a ± 0,53	1,00 ± 0,00	1,75 a ± 0,96	1,00 a ± 0,00
	<i>L</i>	3,93 b ± 0,72	1,00 ± 0,00	2,50 a ± 1,00	1,75 a ± 0,50
	<i>S</i>	3,78 ab ± 0,78	1,00 ± 0,00	2,00 a ± 0,82	1,50 a ± 0,58
	<i>T</i>	4,76 c ± 0,58	1,50 ± 0,58	4,50 b ± 1,00	3,75 b ± 0,96

Legenda: Modalidades de Inoculação – *LxS*: *Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *L*: *Lactobacillus sakei*; *S*: *Staphylococcus xylosus*; *T*: Testemunha.

Na mesma coluna: para cada uma das fases de fabrico dentro da mesma fábrica, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

[▲] Resultados para esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *E. Coli*.

Classe 1: < 1 esporo/bactéria g⁻¹

Classe 2: ≥ 1 e < 10 esporos/bactéria g⁻¹

Classe 3: ≥ 10 e < 100 esporos/bactéria g⁻¹

Classe 4: ≥ 100 e < 1000 esporos/bactéria g⁻¹

Classe 5: ≥ 1000 e < 10000 esporos/bactéria g⁻¹

Ainda relativamente ao 2º ensaio de inoculação, na fábrica B as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos totais, leveduras e esporos de bactérias aeróbias, no produto final (fase 4), foram superiores no lote testemunha relativamente às restantes modalidades de inoculação. No caso dos microrganismos mesófilos e psicrotróficos aquela diferença existia já na fase 3 (meio da cura) e no caso dos esporos de bactérias aeróbias o lote testemunha apresentou valores superiores aos das restantes modalidades logo desde a fase 2 (pré-enchimento). As contagens de leveduras foram mais baixas nos lotes inoculados com *Staphylococcus xylosus*, em cultura pura ou em cultura mista. Microrganismos mesófilos, psicrotróficos e esporos de bactérias aeróbias exixtiram em menor número nos lotes inoculados com *Lactobacillus sakei*, tanto em cultura pura como em cultura mista.

Na fase 2, *Lactobacillus* spp. apresentaram contagens significativamente mais baixas no lote inoculado com *Staphylococcus xylosus*, relativamente às outras modalidades de inoculação, não havendo diferenças significativas entre estas. Os valores mais elevados verificaram-se nos lotes inoculados com *Lactobacillus sakei*. Nas restantes fases de fabrico as contagens de *Lactobacillus* spp. foram bastante semelhantes entre as 4 modalidades de inoculação.

As contagens de bactérias ácido lácticas evoluíram de modo semelhante ao apresentado para a contagem de *Lactobacillus* spp..

As contagens mais baixas de *Micrococcaceae* foram sempre as do lote testemunha e as mais elevadas foram sempre as dos lotes inoculados com *Staphylococcus xylosus*, em cultura pura e em cultura mista.

As *Enterobacteriaceae* existiram sempre em número superior no lote testemunha, sendo sempre os valores mais baixos os registados no lote inoculado com a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus*. Na fase 3 (meio da cura) a contagem de *Enterobacteriaceae* do grupo testemunha foi significativamente superior às contagens de todas as outras modalidades de inoculação. Por sua vez, a contagem correspondente ao lote inoculado com a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus* foi significativamente inferior à de todas as outras modalidades.

No produto final (fase 4) as *Enterobacteriaceae* continuaram a existir em número significativamente superior no lote testemunha relativamente às restantes modalidades de inoculação. As contagens de *Enterobacteriaceae* no lote inoculado com a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus* foram significativamente inferiores às registadas no lote inoculado com *Lactobacillus sakei* e no lote testemunha.

Streptococci do grupo D, esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *Escherichia coli*, no produto final (fase 4), existiram sempre em número superior no lote testemunha. Os valores deste lote foram quase sempre significativamente superiores aos das restantes modalidades de inoculação, exceptuando os resultados correspondentes aos esporos de *Clostridia* sulfito-redutores.

No produto final, *Streptococci* do grupo D, esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, bactérias coliformes e *Escherichia coli* existiram sempre em número inferior no lote inoculado com a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus*. Nas restantes fases os valores mais baixos registaram-se no mesmo lote ou no lote inoculado com cultura pura de *Lactobacillus sakei*.

Oliveira (1989) inoculou em chouriço industrial português (curado em 5 dias, com fumagem durante 3 horas onde se atingiram temperaturas de 65°C) culturas mistas contendo estirpes de *Lactobacillus plantarum* (aferidas a 8 log ufc/g) e estirpes de *Micrococcus* (aferidas a 5 log ufc/g) que havia seleccionado a partir de uma coleção isolada de queijos e produtos de salsicharia. Inoculou ainda uma cultura mista de

Lactobacillus plantarum e de uma estirpe comercial de *Staphylococcus xylosus*. Observou acção inibidora dos *Lactobacillus* spp., atribuída à produção de ácido láctico, face à presença de microrganismos indesejáveis, tais como bactérias coliformes, particularmente *Escherichia coli*.

Mataragas *et al.* (2003) demonstraram a acção protectora de *Leuconostoc mesenteroides* L124 e de *Lactobacillus curvatus* L442, duas estirpes de bactérias ácido lácticas, contra *Listeria monocytogenes* e *L. innocua*, em fiambre fatiado e conservado sob vácuo e sob um tipo de atmosfera modificada com 80% de CO₂ e 20% de N₂, ambas as condições ambientais favoráveis ao crescimento das bactérias ácido lácticas. No entanto, Gänzle *et al.* (1999) demonstraram que os teores de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus sakei* 265 (Lb 265) e por *Lactobacillus casei* 52 (Lb 52) quando estes existem em baixo número (3 log ufc/g) são insuficientes para inibir ou reduzir o número de *Listeria monocytogenes*. Estes resultados sugerem a ineficiência daquelas estirpes como agentes protectores em carnes não fermentadas refrigeradas onde, por questões relacionadas com a qualidade sensorial da carne (carne fresca fatiada e embalada sob vácuo, por exemplo), contagens iniciais de bactérias lácticas elevadas não são desejáveis (Gill, 1986). Por outro lado, Bredholt *et al.* (2001) comprovaram a acção protectora, contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, de uma estirpe de *Lactobacillus sakei*, isolada de fiambre e inoculada (5 – 6 log ufc/g) também em fiambre cozido que foi posteriormente fatiado e embalado sob vácuo durante 28 dias a 4°C. Estes resultados juntamente com a aceitabilidade do produto inoculado por um painel de provadores, idêntica à do produto testemunha, permitiram considerar aquela estirpe de *L. sakei* como adequada para uso como cultura protectora. Anteriormente, Bredholt *et al.* (1999) já haviam comprovado a eficácia de uma estirpe de *Staphylococcus sakei* isolada de alimentos comerciais contra *L. monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, com efeitos negligenciáveis sobre as características sensoriais de fiambre fatiado e mantido sob vácuo durante 28 dias a 10°C.

14.4 - Análise sensorial

A análise de variância feita aos resultados da análise sensorial realizada aos paios usados nos ensaios de inoculação (Quadros 93 e 94) considerou apenas o factor modalidade de inoculação uma vez que os dados foram tratados separadamente para cada uma das fábricas, tal como se explicou no início do Capítulo 14, e, tal como os testes reológicos, as provas sensoriais apenas se fizeram para o produto final.

No 1º ensaio de inoculação, na fábrica A apenas o atributo intensidade da cor apresentou diferenças significativas ($p<0,01$) entre as modalidades de inoculação. Na fábrica B apenas houve diferenças significativas ($p<0,05$) entre as modalidades de inoculação para os aromas estranhos.

No 2º ensaio, na fábrica A não houve diferenças significativas para nenhum atributo; na fábrica B os atributos cores estranhas, aromas estranhos, sabores estranhos e apreciação global apresentaram diferenças altamente significativas ($p<0,001$) entre as modalidades de inoculação.

Quadro 93 – 1º ensaio de inoculação: análise de variância para resultados da análise sensorial, considerando duas fábricas (A e B) e o factor modalidade de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
	Modalidade de inoculação	Modalidade de inoculação
	G.L.=3	G.L.=3
Intensidade da Cor	$F=5,3684$ $p=0,0012^{**}$	$F=0,5307$ $p=0,6616$
Cores estranhas	$F=0,3992$ $p=0,7536$	$F=1,4499$ $p=0,2290$
Intensidade do Aroma	$F=1,3753$ $p=0,2494$	$F=0,7825$ $p=0,5047$
Aromas Estranhos	$F=0,1170$ $p=0,9501$	$F=3,4210$ $p=0,0180^{*}$
Tenrura	$F=0,7489$ $p=0,5233$	$F=0,0311$ $p=0,9926$
Fibrosidade	$F=1,8679$ $p=0,1340$	$F=0,1514$ $p=0,9287$
Suculência	$F=1,1190$ $p=0,3408$	$F=0,2588$ $p=0,8550$
Intensidade do Sabor	$F=0,5148$ $p=0,6722$	$F=0,4424$ $p=0,7229$
Sabores Estranhos	$F=0,2903$ $p=0,8325$	$F=1,8575$ $p=0,1376$
Intensidade da Salga	$F=0,3564$ $p=0,7845$	$F=1,3317$ $p=0,2648$
Apreciação Global	$F=1,1000$ $p=0,3486$	$F=0,1278$ $p=0,9436$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade. Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$;
significativo para $p<0,01$; *significativo para $p<0,001$.

A observação dos valores das médias e dos desvios padrão dos resultados dos ensaios (Quadros 95 e 96) permite-nos verificar que no 1º ensaio de inoculação o atributo intensidade da cor teve maiores pontuações nos lotes testemunha, tanto da fábrica A como da fábrica B. Porém, o Quadro 83, que apresenta os resultados das análises físico-químicas relativas ao 1º ensaio de inoculação, mostra que no produto final (fase 4) os valores do parâmetro de cor a^* (valores positivos correspondem a tonalidades vermelhas) são mais baixos nos lotes testemunha de ambas as fábricas. Esta aparente contradição é explicada pelo facto do painel de provadores considerar como cor mais intensa aquela que apresenta tons de vermelho mais carregado, mais escuro portanto. Estes tons correspondem a valores de a^* mais baixos, já que este parâmetro da cor tem valores tanto mais elevados quanto mais aberta for a tonalidade vermelha. Por conseguinte, os lotes testemunha tiveram uma coloração vermelha mais carregada, em ambas as fábricas. Na fábrica A o lote inoculado com a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus* foi o que apresentou um vermelho mais vivo, mais aberto, e na fábrica B os lotes inoculados com as culturas puras de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus* foram os que tiveram paços com tonalidade vermelha mais aberta, mais clara.

Quadro 94 – 2º ensaio de inoculação: análise de variância para resultados da análise sensorial, considerando duas fábricas (A e B) e o factor modalidade de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A	Fábrica B
	Modalidade de inoculação	Modalidade de inoculação
	G.L.=3	G.L.=3
Intensidade da Cor	$F=1,3406$ $p=0,2627$	$F=1,1054$ $p=0,3494$
Cores Estranhas	$F=0,5466$ $p=0,6510$	$F=6,7902$ $p=0,0003***$
Intensidade do Aroma	$F=1,4322$ $p=0,2349$	$F=0,2130$ $p=0,8873$
Aromas Estranhos	$F=1,0467$ $p=0,3732$	$F=9,9595$ $p=0,0000***$
Tenrura	$F=0,3527$ $p=0,7873$	$F=1,5010$ $p=0,2173$
Fibrosidade	$F=0,1227$ $p=0,9466$	$F=2,2010$ $p=0,0910$
Suculência	$F=0,3253$ $p=0,8070$	$F=1,2482$ $p=0,2950$
Intensidade do Sabor	$F=0,5162$ $p=0,6717$	$F=0,6671$ $p=0,5737$
Sabores Estranhos	$F=1,6767$ $p=0,1737$	$F=7,6410$ $p=0,0001***$
Intensidade da Salga	$F=0,6371$ $p=0,5921$	$F=1,8199$ $p=0,1467$
Apreciação Global	$F=1,0045$ $p=0,3921$	$F=11,0313$ $p=0,0000***$

Legenda: G.L. - Graus de Liberdade.

Níveis de Significância - *significativo para $p<0,05$; **significativo para $p<0,01$;
***significativo para $p<0,001$.

Ainda a propósito do 1º ensaio, na fábrica B os aromas estranhos foram mais pontuados nos produtos dos lotes inoculados com *Lactobacillus sakei*, cabendo os valores mais baixos aos produtos do lote inoculado com *Staphylococcus xylosus*. A produção de ácido láctico pelas estirpes de *Lactobacillus sakei* poderá estar relacionada com aqueles resultados.

Para todos os outros atributos houve uma relativa semelhança entre os valores obtidos para as 4 modalidades de inoculação em estudo.

Estes resultados demonstraram não haver, do ponto de vista sensorial, uma acção negativa resultante da introdução daquelas culturas bacterianas num produto marcadamente representativo da salsicharia tradicional alentejana, como é o paio de porco Alentejano.

Quadro 95 – 1º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados da análise sensorial (valores registados numa escala pontuável entre 0 e 100) considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A				Fábrica B			
	L x S	<i>L. sakei</i>	<i>S. xylosus</i>	Testem.	L x S	<i>L. sakei</i>	<i>S. xylosus</i>	Testem.
Intensidade da Cor	69,66 a ± 11,48	71,81 ab ± 12,93	71,93 ab ± 13,09	75,67 b ± 12,20	74,65 ± 13,29	72,90 ± 12,52	72,92 ± 15,71	75,57 ± 14,59
Cores Estranhas	1,67 ± 5,79	0,92 ± 6,35	1,39 ± 4,97	1,22 ± 5,91	0,64 ± 2,42	0,17 ± 1,29	0,67 ± 2,52	1,08 ± 3,07
Intensidade do Aroma	67,55 ± 14,78	66,34 ± 13,30	68,82 ± 13,85	69,60 ± 14,15	65,90 ± 14,78	68,98 ± 13,75	66,73 ± 15,16	65,10 ± 14,61
Aromas Estranhos	1,48 ± 4,66	1,55 ± 6,31	1,23 ± 4,03	1,62 ± 7,22	2,03 a ± 6,10	1,03 ab ± 3,93	0,08 b ± 0,65	0,25 b ± 1,43
Tenrura	67,78 ± 16,38	68,05 ± 15,06	65,35 ± 17,89	66,57 ± 16,44	68,77 ± 18,83	67,90 ± 19,24	68,00 ± 17,22	68,50 ± 16,81
Fibrosidade	32,95 ± 17,48	32,53 ± 15,48	36,98 ± 18,66	34,64 ± 16,29	33,12 ± 18,99	33,88 ± 20,51	35,40 ± 18,83	33,98 ± 17,32
Suculência	71,04 ± 14,17	68,05 ± 15,65	69,58 ± 14,86	68,35 ± 15,04	68,82 ± 17,42	69,28 ± 19,78	67,05 ± 18,86	66,95 ± 16,85
Intensidade do Sabor	71,90 ± 12,16	70,14 ± 12,09	70,48 ± 12,82	71,23 ± 13,57	70,27 ± 14,19	71,30 ± 13,65	68,63 ± 15,04	71,05 ± 13,08
Sabores Estranhos	1,56 ± 4,19	1,98 ± 4,98	2,06 ± 5,82	1,75 ± 4,23	3,32 ± 8,13	3,24 ± 7,10	1,03 ± 2,93	1,69 ± 6,13
Intensidade da Salga	55,38 ± 9,24	55,04 ± 9,46	56,19 ± 11,46	55,93 ± 10,07	59,98 ± 12,83	60,32 ± 13,70	57,03 ± 11,85	56,95 ± 10,20
Apreciação Global	68,97 ± 13,07	66,51 ± 14,03	66,10 ± 14,85	67,13 ± 13,66	65,62 ± 16,54	64,82 ± 17,69	66,33 ± 15,31	66,40 ± 14,46

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

No decurso do 2º ensaio de inoculação realizado na fábrica B houve um problema tecnológico não identificado (tal como se referiu em 14.2). Neste ensaio, os produtos do lote testemunha tiveram pontuações significativamente mais elevadas para os atributos cores, aromas e sabores estranhos (Quadro 96) e pontuações significativamente mais baixas para o atributo apreciação global, comparativamente às restantes modalidades de inoculação. Relativamente àqueles atributos não houve diferenças significativas entre os lotes que foram inoculados, embora com valores mais favoráveis nos lotes em que houve inoculação de *Lactobacillus sakei*, principalmente em cultura pura.

Quadro 96 – 2º ensaio de inoculação: médias e desvios padrão para resultados da análise sensorial (valores registados numa escala pontuável entre 0 e 100) considerando 2 fábricas (A e B), onde se estudaram 4 modalidades de inoculação (*Lactobacillus sakei* x *Staphylococcus xylosus*; *Lactobacillus sakei*; *Staphylococcus xylosus*; testemunha).

Variáveis	Fábrica A				Fábrica B			
	L x S	<i>L. sakei</i>	<i>S. xylosus</i>	Testem.	L x S	<i>L. sakei</i>	<i>S. xylosus</i>	Testem.
Intensidade da Cor	70,87 ± 10,78	67,22 ± 12,26	69,91 ± 11,66	66,96 ± 10,93	63,18 ± 12,24	65,36 ± 12,25	68,47 ± 14,45	63,35 ± 15,35
Cores Estranhas	1,33 ± 6,11	2,78 ± 8,83	1,74 ± 9,02	0,96 ± 3,57	0,00 a ± 0,00	0,12 a ± 0,69	0,59 a ± 2,05	4,85 b ± 10,17
Intensidade do Aroma	61,15 ± 14,66	58,57 ± 14,85	63,93 ± 13,53	58,63 ± 14,62	61,15 ± 17,35	63,47 ± 14,04	63,79 ± 13,71	62,70 ± 13,63
Aromas Estranhos	1,52 ± 8,94	1,07 ± 2,94	3,00 ± 10,52	0,44 ± 2,95	0,29 a ± 1,71	0,12 a ± 0,69	0,73 a ± 2,50	10,91 b ± 19,22
Tenrura	64,41 ± 13,75	66,65 ± 14,43	63,59 ± 15,42	65,17 ± 15,83	64,97 ± 18,24	65,88 ± 12,83	65,41 ± 15,84	59,03 ± 13,77
Fibrosidade	36,00 ± 13,93	36,24 ± 14,62	35,33 ± 11,68	34,65 ± 14,93	33,62 ± 15,41	35,59 ± 14,25	35,15 ± 15,68	42,53 ± 16,86
Suculência	63,80 ± 13,56	64,13 ± 13,30	64,70 ± 13,58	66,33 ± 12,83	68,44 ± 15,06	67,38 ± 12,23	65,38 ± 15,02	62,35 ± 13,38
Intensidade do Sabor	67,89 ± 12,86	65,39 ± 13,20	68,61 ± 12,10	67,09 ± 14,00	66,85 ± 15,02	66,71 ± 12,92	68,50 ± 12,90	63,97 ± 12,06
Sabores Estranhos	4,41 ± 13,71	4,00 ± 7,64	1,56 ± 4,75	1,30 ± 3,86	3,85 a ± 8,70	1,29 a ± 4,12	4,74 a ± 7,64	13,82 b ± 19,50
Intensidade da Salga	54,76 ± 7,55	54,67 ± 8,04	56,63 ± 8,62	55,93 ± 7,95	64,30 ± 10,90	60,24 ± 7,53	62,94 ± 11,28	59,47 ± 8,62
Apreciação Global	64,74 ± 14,00	62,17 ± 14,15	67,07 ± 13,48	65,17 ± 12,84	64,50 a ± 15,41	65,35 a ± 11,72	60,97 a ± 15,55	46,68 b ± 17,48

Para a mesma fábrica e na mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

Na fábrica A, uma vez mais, não houve diferenças evidentes entre as modalidades de inoculação.

Deste modo, somos levados a crer que a introdução destas culturas de arranque não prejudicam a qualidade sensorial do paio de porco Alentejano quando produzido em condições normais de processo. Contudo, do ponto de vista sensorial, aquelas culturas especialmente *Lactobacillus sakei*, podem ter um papel fundamental na redução dos efeitos negativos que advêm de um pontual mau funcionamento do processo de fabrico.

Num trabalho já citado no Capítulo 14.3, realizado por Oliveira (1989), em que inoculou em massas de carne para fabrico de chouriço industrial português (curado em 5 dias), estirpes de *Micrococcus*, uma estirpe de *Lactobacillus plantarum* e uma estirpe comercial de *Staphylococcus xylosus*, foi notória a capacidade nitrato redutora de algumas estirpes da família *Micrococcaceae*, em associação com *Lactobacillus plantarum*, com

resultados positivos na melhoria da cor dos chouriços, exceptuando a estirpe comercial de *Staphylococcus xylosus* que foi totalmente incapaz de reduzir os nitratos. Quanto a outros atributos sensoriais, o cheiro e o sabor dos lotes testemunha, não inoculados, tiveram sempre pontuações superiores às dos lotes inoculados. Com base nos resultados obtidos a autora concluiu não ser aconselhável o uso das culturas de arranque estudadas em chouriço industrial, devido ao seu curto período de cura, mas sim em produtos de salsicharia de cura mais prolongada.

Stahnke (1994) inoculou uma estirpe de *Staphylococcus xylosus* (aferida a 7 log ufc/g) numa massa para fabrico de um tipo de enchido fermentado dinamarquês. Este estudo mostrou que os enchidos fermentados com *Staphylococcus xylosus* continham alguns ésteres que não foram encontrados no grupo controlo, este sem crescimento microbiano. Os enchidos do grupo controlo apresentaram um forte aroma a ranço, contrariamente ao que aconteceu com os inoculados com *S. xylosus*. Para o autor estes resultados indicam que certos ésteres são essenciais para a obtenção do aroma típico dos enchidos fermentados, por adição de aromas frutados e/ou mascarando aromas a ranço. Os enchidos inoculados com *S. xylosus* apresentaram menores níveis de produtos resultantes da autoxidação, comparativamente ao grupo controlo. Ainda na opinião daquele autor, este facto deveu-se, provavelmente, à produção de catalase por *S. xylosus* e não tanto à conversão de aldeídos em ésteres. Os enchidos inoculados com *S. xylosus* apresentaram teores mais elevados de ácidos gordos livres, sem que estes parecessem ter tido importância no desenvolvimento do aroma.

Garriga (1995) inoculou 12 estirpes de *Lactobacillus* em salsichões espanhóis. Entre aquelas estirpes existiam 5 de *L. sakei*, 4 de *L. curvatus*, 2 de *L. bavaricus* e 1 de *L. plantarum*. Após 30 dias de cura, os salsichões foram submetidos a análises sensoriais em que se utilizou uma prova preferencial. Os lotes inoculados com as distintas estirpes de *L. sakei* foram considerados menos ácidos enquanto que o lote inoculado com *L. plantarum* teve produtos com alta acidez, avaliada negativamente pelo painel de provadores. Os lotes testemunha tiveram uma classificação satisfatória, ainda que se tenham detectado aromas considerados “sulfídricos” e que se relacionaram com as elevadas contagens de *Enterobacteriaceae*.

Sharma e Mukhopadhyay (1992) estudaram o efeito de 3 estirpes (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus lactis*) usadas como culturas de arranque, individualmente e combinadas, no fabrico de enchidos fermentados. A análise sensorial foi realizada a partir do produto acabado com recurso a um painel de provadores treinados e a uma escala de avaliação hedónica. Os resultados obtidos indicaram não ter havido diferenças significativas entre os enchidos inoculados com *L. plantarum*, em cultura pura e em cultura mista. Os enchidos inoculados com a cultura mista de *S. lactis* e *S. acidophilus* apresentaram uma má textura e aparência geral, sendo esta ainda pior nos enchidos inoculados com a cultura pura de *S. lactis*. Os enchidos inoculados com *L. plantarum* foram considerados ter um aroma e sabor entre o bom e o muito bom. O aroma e o sabor foram classificados como bons nos lotes inoculados com a cultura mista de *L. acidophilus* e *S. lactis*.

Fernández (2000) procedeu à inoculação superficial de esporos de *Mucor racemosus* num tipo de paio espanhol e verificou que esta inoculação produziu um decréscimo significativo na dureza, gomosidade, masticabilidade, força máxima de corte e trabalho de corte. Estes resultados foram atribuídos à actividade lipolítica e, sobretudo, proteolítica desenvolvida pelo bolor na superfície do enchido. No entanto, na análise sensorial os enchidos inoculados com *M. racemosus* não apresentaram diferenças significativas, relativamente aos produtos testemunha, para os atributos relacionados com a textura.

Porém os enchidos inoculados tiveram pontuações significativamente superiores aos não inoculados para os atributos “aroma”, “sabor” e “qualidade global”.

Patarata (2002), na análise sensorial de linguiça tradicional transmontana constatou que a maioria dos atributos avaliados não se mostrou afectada pela utilização de culturas de arranque, excepto a intensidade global do gosto e o gosto picante, parâmetros a que se atribuíram pontuações significativamente mais elevadas no lote testemunha, quando comparado com um inoculado com uma cultura comercial contendo estirpes de *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* e *S. xylosus*. Em resposta a uma pergunta hedónica incluída na ficha de prova, os provadores preferiram claramente as amostras do lote testemunha, não inoculado, portanto.

15 - Perspectivas futuras

A aplicação de culturas de arranque nos processos de transformação de carnes é, no momento, inexistente em Portugal, embora as nossas unidades de transformação de carnes, incluindo as que fabricam produtos artesanais, sejam cada vez mais assediadas por vendedores de culturas comerciais liofilizadas.

Neste contexto, parece-nos pertinente estudar a inclusão no processo de fabrico de enchidos inoculados com culturas de arranque, de uma etapa a uma temperatura adequada para potenciar o desenvolvimento microbiano.

No momento actual há indícios científicos suficientes para acreditar que as culturas de arranque contribuem de forma objectiva para melhorar a qualidade dos enchidos. Contudo, em nosso entender, para melhor satisfazer estes propósitos seria mais adequada a utilização de culturas de arranque autóctones, em princípio melhor adaptadas aos processos de fabrico onde se pretende a intervenção daqueles microrganismos.

Num futuro não muito longínquo, acreditamos que a microbiologia molecular possibilitará o aparecimento de microrganismos recombinantes que incorporem várias das propriedades metabólicas com interesse que actualmente só podem ser conseguidas através de culturas mistas. A aplicação industrial daqueles microrganismos recombinantes dependerá, em grande medida, da sua aceitação por parte do consumidor, mais do que da hipotética suposição de que possam ser perigosos.

III - Conclusões

16 – Conclusões

O estudo realizado sobre as condições ambientais e duração das etapas de fabrico do paio de porco Alentejano mostrou que para a mesma fábrica foram encontradas diferenças significativas entre os 3 lotes estudados. Destacam-se as variações verificadas entre lotes de fabrico quanto à duração das etapas da cura e as relativas aos parâmetros ambientais (temperatura e humidade relativa do ar) usados para a cura dos vários lotes de paio. Se por um lado se pode alegar que um adequado ajuste entre os tempos de duração da cura e os parâmetros ambientais em que ela decorre pode resultar em produtos com características semelhantes, na prática aquelas variações quase sempre dão origem a enchidos com características diferentes, o que é indesejável quando se pretendem fomentar hábitos de consumo.

Quanto às matérias primas subsidiárias utilizadas no fabrico do paio de porco Alentejano, verificou-se que, de um modo geral, foram mais estáveis e de melhor qualidade as matérias primas subsidiárias utilizadas na fábrica B, sobretudo a massa de alho, a tripa e o sal.

No que concerne ao estudo do processo de fabrico, houve diferenças significativas para a maioria das variáveis físico-químicas, tanto quando considerado o factor fábrica, como o factor tempo. Estes resultados pressupõem diferenças marcadas entre os produtos fabricados numa e noutra fábrica para as características físico-químicas estudadas. Supostamente, estas diferenças dever-se-ão aos desiguais processos de fabrico adoptados, principalmente pelo recurso à fumagem numa delas. As diferenças ao longo das fases de fabrico são normais e esperadas, resultando das modificações que decorrem da cura dos enchidos.

Os produtos originários da fábrica B foram mais salgados, em cerca de 1%, que os da outra fábrica (fábrica A, 5,02% NaCl; fábrica B, 5,97% NaCl). Os valores da a_w diminuíram progressivamente com a evolução da cura, atingindo valores finais semelhantes nas duas fábricas (fábrica A, 0,821; fábrica B, 0,818). Contudo, a a_w desceu mais rapidamente nos paios produzidos na fábrica B, consequência das condições ambientais da cura. Deste modo, os produtos da fábrica B são estabilizados mais rapidamente, com valores de a_w na fase 3 (meio da cura) de 0,921, para os paios da fábrica A e 0,895 para os da fábrica B. Também como resultado das condições ambientais, a meio da cura os valores do ABVT nos produtos da fábrica B (94,57 mg NH₃/ 100 g de produto) foram significativamente superiores aos da fábrica A (64,53 mg NH₃/ 100 g de produto).

A propósito do perfil de ácidos gordos, só se verificaram diferenças significativas entre as fases de fabrico para os ácidos mirístico ($p<0,05$), palmítico ($p<0,01$), oleico ($p<0,01$) e heneicosenoíco ($p<0,001$). Os ácidos gordos que apresentaram diferenças significativas entre fábricas (laurílico, palmitoleico, linoleico, linolénico e gadoleico), tiveram valores mais elevados nos produtos da fábrica A, quando considerada a mesma fase de fabrico, constituindo exceção o ácido palmitoleico.

Os teores de ácido oleico evidenciaram uma tendência para decrescerem ao longo da cura.

A maioria das determinações microbiológicas realizadas originaram resultados diferentes quando comparados os paios de uma e outra fábrica. Como esperado, os resultados foram também diferentes ao longo do tempo de cura.

De um modo geral existiram microrganismos em maior número nos produtos da fábrica A, onde não se recorre à fumagem.

Os microrganismos com interesse tecnológico (*Lactobacilli*, bactérias ácido lácticas e *Micrococcaceae*) multiplicaram-se, de um modo geral, desde o início até ao fim do processo de fabrico. Estes resultados revelam uma boa adaptação daquela microbiota autóctone às massas de carne, onde tem um papel decisivo no desenvolvimento das fermentações que caracterizam estes enchidos.

Os valores encontrados para *Enterobacteriaceae*, bactérias coliformes e *Escherichia coli*, principalmente estes dois últimos, põem em evidência as deficientes condições de higiene das massas de carne, principalmente na fábrica A. Contudo, os processos de fabrico utilizados são eficazes na redução daqueles microrganismos para valores compatíveis com o seu uso na alimentação humana.

As variáveis físico-químicas no âmbito do estudo da conservação do paio de porco Alentejano apresentaram diferenças entre fábricas, não foram influenciadas pelo modo de conservação (vácuo ou atmosfera modificada) e variaram todas elas de forma altamente significativa ($p<0,001$) com o tempo de conservação.

O pH, a a_w e o teor de cloretos baixaram ao longo do tempo de conservação. O ABVT, a acidez da gordura e os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* subiram ao longo da conservação.

O tratamento dos dados obtidos para o perfil de ácidos gordos durante o estudo de conservação mostrou que, quando considerado o factor fábrica, foram encontradas diferenças significativas para os ácidos gordos palmitoleico ($p<0,001$), margaroleico ($p<0,001$), oleico ($p<0,05$) e linolénico (($p<0,05$)).

Os teores dos ácidos gordos margárico e esteárico foram os únicos a variar de forma significativa ($p<0,05$) com o modo de conservação. Nos produtos conservados sob vácuo os teores daqueles ácidos mantiveram-se relativamente constantes ao longo do tempo de conservação, enquanto nos paios conservados em atmosfera modificada houve variações nas concentrações daqueles ácidos com o tempo.

Os resultados das análises reológicas mostraram que, uma vez mais, o factor modo de conservação foi o que causou menos variações. Por outro lado, os factores fábrica e tempo de conservação foram os responsáveis pelas principais alterações verificadas na análise do perfil da textura e na força e área de corte durante a conservação do paio de porco Alentejano.

Os resultados obtidos para os produtos da fábrica B foram superiores para a totalidade dos parâmetros. Estes resultados não significam uma pior qualidade destes produtos, antes pelo contrário. Com efeito, o consumidor deseja, para os enchidos, um grau de consistência, de resistência à mastigação, mínimo, abaixo do qual deprecia o produto. Neste estudo, os paios da fábrica A foram adquirindo uma consistência mais mole, demasiado branda, porventura como resultado de reacções proteolíticas que continuaram a ocorrer com alguma intensidade, como resultado do insuficiente grau de estabilização dos paios produzidos na fábrica A no momento em que foram embalados.

A análise de variância feita com os resultados das análises microbiológicas mostrou que, uma vez mais, o modo de conservação (vácuo ou atmosfera modificada) não interferiu de forma significativa durante a conservação dos enchidos.

Tal como havia acontecido no estudo do processo de fabrico, no estudo da conservação dos paios o número de microrganismos, de um modo geral, foi significativamente superior nos enchidos da fábrica A. As excepções foram as contagens de *Micrococcaceae* e a estimativa do número de esporos de *Clostridia* sulfito-redutores, cujos valores foram significativamente superiores nos produtos da fábrica B.

Quanto à avaliação sensorial dos produtos conservados, uma vez mais o modo de conservação (vácuo ou atmosfera modificada) praticamente não resultou em variações nas pontuações atribuídas pelo painel de provadores. Os factores fábrica, principalmente, e tempo de conservação foram os responsáveis pelas maiores variações nas pontuações atribuídas. De um modo geral os melhores produtos foram os da fábrica B. Todos os enchidos, do ponto de vista sensorial, conservaram-se bem até aos 6 meses. Foi possível prolongar o período de conservação até aos 9 meses, contudo com alguma perda na qualidade, assinalada sobretudo por pontuações mais elevadas para os parâmetros cores, aromas e sabores estranhos, e pontuações menores na intensidade do aroma, sobretudo para os paiois da fábrica A.

No que respeita às provas de selecção realizadas sobre estirpes de *Micrococcaceae* e de *Lactobacilli* isoladas de enchidos em várias fases do processo produtivo, os estudos iniciaram-se com uma colecção de 61 estirpes do primeiro grupo e 150 estirpes do segundo grupo. Concluídas todas as provas selectivas foram consideradas com potencial para virem a ser usadas como culturas de arranque 6 estirpes de *Micrococcaceae* e 10 de *Lactobacilli*. Das estirpes de *Micrococcaceae*, 5 consideraram-se pertencer à espécie *Staphylococcus xylosus* e 1 à espécie *Staphylococcus simulans*. De entre as 10 estirpes de *Lactobacilli*, 5 foram classificadas como *Lactobacillus sakei*, 2 *Lactobacillus curvatus*, outras 2 *Lactobacillus plantarum* e 1 estirpe foi identificada como sendo da espécie *Lactobacillus alimentarius*.

Quanto aos ensaios de inoculação realizados, em que se testou o efeito de duas estirpes por nós seleccionadas, uma de *Staphylococcus xylosus* e outra de *Lactobacillus sakei*, aplicadas em cultura pura e em cultura mista, verificámos que os lotes testemunha, não inoculados, foram os que, de um modo geral, apresentaram valores de pH mais elevados. Verificou-se uma tendência para valores de pH mais baixos nos lotes inoculados com *L. sakei*, sobretudo em cultura pura.

Em ambos os ensaios de inoculação e em ambas as fábricas, os lotes inoculados com *S. xylosus*, sobretudo em cultura pura, foram os que tiveram, no produto final, valores de a_w mais baixos. Por outro lado, os lotes não inoculados foram os que apresentaram, também no produto final, valores de a_w mais elevados.

Quanto aos parâmetros da cor, verificou-se que *L. sakei* contribuiu para tornar os enchidos mais claros (valores de L^* superiores) e com um vermelho mais intenso (valores de a^* superiores).

As análises reológicas efectuadas para o 1º ensaio de inoculação mostraram que a dureza foi superior nos lotes testemunha, em ambas as fábricas, sendo essa diferença muito mais notória nos produtos da fábrica A. A coesividade foi menor nos lotes testemunha, denotando uma pior ligação das massas de carne nos produtos não inoculados. Em ambas as fábricas os paiois inoculados com a cultura mista de *L. sakei* e *S. xylosus* foram os que tiveram valores de coesividade mais elevados.

No 2º ensaio de inoculação a coesividade apresentou, em ambas as fábricas, os valores mais elevados nos paiois inoculados com *L. sakei*, tanto em cultura pura como em cultura mista.

Durante a realização deste ensaio, na fábrica B, ocorreu um problema tecnológico não identificado. Com os resultados das análises reológicas foi demonstrada a utilidade das culturas de arranque testadas como atenuantes dos impactos negativos causados por problemas tecnológicos imprevistos.

Os resultados das análises microbiológicas mostraram que *Enterobacteriaceae* existiram em maior número nos lotes testemunha. Os lotes inoculados com *L. sakei*,

sobretudo em cultura mista, foram os que apresentaram valores mais baixos. As contagens de *Streptococci* do grupo D, tendencialmente, têm valores mais baixos nos lotes inoculados com *L. sakei*, sobretudo em cultura pura no caso dos ensaios realizados na fábrica A.

A avaliação sensorial feita pelo painel de provadores mostrou que a introdução das culturas de arranque que testámos não prejudicou a qualidade sensorial do paio de porco Alentejano, quando produzido nas condições de processo normais. Contudo, do ponto de vista sensorial, aquelas culturas, especialmente *L. sakei*, podem ter um papel fundamental na redução dos efeitos negativos que resultam de um pontual mau funcionamento do processo de fabrico. Com efeito, no decurso de 2º ensaio de inoculação realizado na fábrica B ocorreu um problema tecnológico não identificado, tal como já havíamos referido neste capítulo. Neste ensaio, os paios do lote testemunha, não inoculados, tiveram pontuações significativamente mais elevadas para os atributos cores, aromas e sabores estranhos e pontuações significativamente mais baixas para o atributo apreciação global.

Como sinopse dos resultados dos ensaios de inoculação podemos dizer que a estirpe de *Staphylococcus xylosus* que testámos, sobretudo em cultura pura, foi responsável pelos decréscimos mais significativos nos valores da a_w . A estirpe de *Lactobacillus sakei* que inoculámos teve um papel fundamental na redução dos efeitos negativos sobre as propriedades sensoriais dos enchidos que resultaram de um mau funcionamento no processo de fabrico. *Lactobacillus sakei*, sobretudo em cultura pura, promoveu reduções significativas nos valores do pH e, umas vezes em cultura pura e outras em cultura mista, foi responsável por decréscimos nas contagens de *Enterobacteriaceae* e de *Streptococci* do grupo D. Por último, assinalamos a cultura mista de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus* como responsável pela boa ligação entre as massas de carne, traduzida através dos valores mais elevados para o parâmetro coesividade registados nos lotes inoculados com aquela cultura mista.

A metodologia adoptada para o desenvolvimento do trabalho experimental revelou-se adequada para conhecer melhor alguns aspectos relacionados com o fabrico, a conservação e a melhoria da qualidade do paio de porco Alentejano e poderá ser aplicada a outros produtos da salsicharia tradicional portuguesa. Deve ser equacionada a possibilidade de introduzir alterações tecnológicas no processo de fabrico, designadamente ao nível da temperatura, que favoreçam o desenvolvimento dos microrganismos que vierem a ser usados como culturas de arranque.

III - Bibliografia

1. A.P.I. 1986. Catalogue analytique API STAPH. A.P.I. Montalieu, Vercieu.
2. Abreu, F.M.M.; Correia, A.A.D.; Martins, A.A.R.L. 1962. Contribuição para o estudo dos produtos de salsicharia portuguesa. O chouriço de carne. Boletim Pecuário. AnoXXX, nº1: 184-303.
3. Abuja, O.J.S. 1993. Caracterización parcial, bioquímica e inmunologica, de una sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus sake* 148. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Veterinária. Universidade Complutense de Madrid.
4. Acton, J.C.; Dick, R.L. 1976. Composition of commercial dry sausages. Journal of Food Science 41: 971-974.
5. Acton, J.C.; Price, P.L.; Friesen, R.K. 2001. Microflora changes at high (30-40° C) versus low (15-25° C) Fermentation temperatures for beef salami inoculated with *Pediococcus pentosaceus*. Proceedings of 47th International Congress of Meat Science and Technology. Kraków, Polónia. Vol.II, p. 21-22.
6. Adetumbi, M.; Javor, G.T.; Lau, B.H. 1986. *Allium sativum* (garlic) inhibits lipid synthesis in *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother. 30: 499-501.
7. Aguirrezábal, M.M.; Mateo, J.; Domínguez, M.C.; Zumalacárregui, J.M. 2000. The effects of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. Meat Science 54(1): 77-81
8. Alexander, J.W. 1998. Immunonutrition: the role of α-3 fatty acids. Nutrition 14: 627-633
9. Alford, J.A.; Smith, F.L.; Lilly, H.D. 1971. Relationship of microbial activity changes in lipids of foods. J. Appl. Bacteriol. 34: 133-146.
10. Alhir, S.; Markakis, P.; Chandam, R.C. 1990. Lipase of *Penicillium caseicolum*. J. Agric. Food Chem. 38 (3): 598-601.
11. Alley, G.; Cours, D.; Demeyer, D. 1992. Effect of nitrate, nitrite and ascorbate on colour stability of dry fermented sausage prepared using "black slopping". Meat Science 32: 279-232.
12. Almeida, A. 2001. Selecção de estirpes da família *Micrococcaceae* para obtenção de uma cultura de arranque para enchidos tradicionais do Alentejo. Relatório do Trabalho de fim de curso, Licenciatura em Engenharia Zootécnica, Universidade de Évora.
13. Alvarez, M.F. 1994. Efectos de la adición de lipasa pancreática en la maduración de embutidos crudos curados. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Faculdade de Veterinária. Universidade Complutense de Madrid.
14. American Public Health Association (A.P.H.A.). 1984. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 2^a edição. M. L. Speck (eds.), Washington, USA.
15. Amerine, M.A.; Pangborn, R.M.; Roessler, E.B. 1965. Principles of sensory evaluation of foods. Academic Press (eds.), New York.
16. Anders, R.F.; Jago, G.R. 1970. The effect of fatty acids on the metabolism of pyruvate in lactic acid *streptococci*. Journal of Dairy Research 37: 445-456.
17. Andersen, G.; Ten-Cate, L. 1965. Zuckerzusatz und pH-wert-senkung bei der rohwurstherstellung. Fleischwirtschaft 45: 599-604.
18. Andersen, H.J.; Hinrichsen, L.L. 1995. Changes in curing agents, microbial counts and volatile compounds during processing of green bacon using two different production technologies. Journal of the Science of Food and Agriculture 68: 477-487.
19. Anderson, R.E. 1980. Microbial lipolysis at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 39: 36-41.
20. Andersen, S.J. 1995. Compositional changes in surface microflora during ripening of naturally fermented sausages. Journal of Food Protection 58(4): 426-429.

21. Andersen, S.J.; Frisvald, J.C. 1994. Penicillin production by *Penicillium nalgiovense*. Lett. Appl. Microbiol. 19: 486-451.
22. Andrade, A.S. 1938. Notas históricas de interesse pecuário. Boletim Pecuário. AnoVI, nº1: 81-275.
23. Andrés, A. L.; Ruiz, J.; Cava, R.; Tello, M- L.; Mayoral, A. I. 2000. Influence de la composition fibrillaire des trois muscles du porc Ibérique sur la couleur de la viande. Options Méditerranéennes. 41:197.
24. Anónimo. 1977. Limites Microbiológicos de los Productos Alimenticios. Orden del Ministerio de Sanidad y Consumo de 21 de Junio de 1977. Boletín Oficial del Estado Español 12/07/77.
25. Anónimo. 1991a. Jamón aneto comienza una importante campaña de promoción del jamón. Cárnica 2000. 90: 87-90
26. Anónimo. 1991b. Perspectivas del jamón serrano español ante los consumidores europeos. Cárnica 2000. 88: 38-43.
27. Anónimo.1983. Métodos Oficiales de Análisis Microbiológicos de Aguas Potables de Consumo Directo. Orden del Ministerio de Sanidad y Consumo de 27 de Julio de 1983. Boletín Oficial del Estado Español 13/08/83, nº193: 22393-22397.
28. Anónimo. 1991. Perspectivas del jámon serrano español ante los consumidores europeos. Cárnica 2000 (88): 39-43.
29. Ansorena, D.; Astiasarán, I. 2004a. Effect of storage and packaging on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausages made with added olive oil and antioxidants. Meat Science 67: 237-244.
30. Ansorena, D.; Astiasarán, I. 2004b. The use of linseed oil improves nutritional quality of the lipid fraction of dry-fermented sausages. Food Chemistry 87: 69-74.
31. Ansorena, D.; de Pena, M.P.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1997. Colour evaluation of "chorizo de Pamplona", a Spanish dry fermented sausage: comparision between the CIE L*a*b* and the Hunter Lab systems with illuminants D65 and C. Meat Science 46: 313-318.
32. Ansorena, D.; Gimeno, O.; Astiasaran, I.; Bello, J. 1998a. Instrumental measures of sensory attributes for the characterization of "chorizo de Pamplona". Proceedings of. 44th International Congress of Meat Science and Technology. Barcelona, Espanha. Vol.II, p. 846-847.
33. Ansorena, D.; Zapelena, M.J.; Astiasaran, I.; Bello, J. 1998b. Simultaneous addition of palatase M and protease P to a dry fermented sausage (chorizo de Pamplona) elaboration: Effect over peptidic and lipid fractions. Meat Science 50: 37-44.
34. Antoine, L. 1989. La qualité bactériologique des boyaux de porc salés. Dissertaçāo para obtenção do grau de Doutor. École National Vétérinaire de Toulouse.
35. A.P.H.A. 1984. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2^aed. Speck M.L. (eds.) A.P.H.A. Washington.
36. Aparício-Macarro, J.B. 1987. El cerdo Ibérico. Prémio de investigación convocado por Sánchez Romero Carvajal, Jabugo S.A., Huelva, Espanha
37. Apsimon, J.W. 1994. The biosynthetic diversity of secondary metabolites. In: Micotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin. Vol.3. Miller, J.D. e Trenholm H.L. (eds.) Eagan Press. Saint Paul, Minn. USA.
38. Artigas, J.M.; Gil, J.C.; Felipe, A. 1985. El espacio uniforme de color CIELAB. Utilización. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 25(3): 316-320.
39. Arihara, K.; Luchansky, J.B. 1994. Dairy lactobacilli. Food biotechnology: Microorganisms. Hui, Y.H., Khachatourians, G.G. (eds.), VCH Publishers, New York. p.609-643.

40. Arihara, K.; Ota, H.; Itoh, M.; Kondo, Y.; Sameshima, T.; Yamamaka, H.; Akimoto, M.; Kanai, S.; Miki, T. 1996. Utilization of probiotic lactic acid bacteria for meat products. Proceedings 42th International Congress of Meat Science and Technology. p. 501-502.
41. Arihara, K.; Yamamaka, H.; Akimoto, M.; Kanai, S.; Sameshima, T.; Miki, T.; Itoh, M.; Kondo, Y. 1997. Utilization of intestinal lactobacilli in non cooked meat products. Japan pat. 9-74995.
42. Arihara, K.; Ota, H.; Itoh, M.; Kondo, Y.; Sameshima, T.; Yamamaka, H.; Akimoto, M.; Kanai, S.; Miki, T. 1998. Lactobacillus acidophilus group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. Journal of Food Science 63: 544-547.
43. Arkoudelos, J.S.; Nychas, G.J.E. 1995. Comparatives studies of the growth of *Staphylococcus carnosus* with or without glucose. Letters in Applied Microbiology 20:19-24.
44. Asghar, A.; Bhatti, A.R. 1987. Advances in food research. E.M. Mark e B.S. Scheigert (eds.), Academic Press, San Diego.
45. Asghar, A.; Gray, J.I.; Buckley, D.J.; Pearson, A.M.; Booren, A.M. 1988. Perspectives on warmed-over flavor. Food Technology 42: 102-108.
46. Asplund, K.; Nurmi, E.; Hirn, J.; Hirvi, T.; Hill, P. 1993. Survival of *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages manufactured with different levels of nitrite and different levels of nitrite and different starter cultures. Journal of Food Protection 56: 710-712.
47. Astiasarán, I.; Redin, R.; Cid, C.; Iriarte, J.; Bello, J. 1993. Comparision of dry sausages produced by different methods: addition of nitrite/nitrate salts and sodium chloride at different phases. Meat Science 34: 255-254.
48. Astiasarán, I.; Villanueva, R.; Bello, J. 1990. Analysis of proteolysis and protein insolubility during the manufacture of some varieties of dry sausage. Meat Science 28: 111-117.
49. Axelsson, L.T.; Chung, T.C.; Dobrogosz, W.J.; Lindgren, S. 1989. Production of a broad-spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microb. Eclo. Health Dis. 2: 131-136
50. Ayhan, K.; Kolsarici, N.; Ozkan, G.A. 1999. The effects of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjouks. Meat Science 53: 183-188.
51. Aymerich, M.T.; Hugas, M.; Monfort, J.M. 2000. Bacterion-producing *Lactobacilli* in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. Food Microbiology 17: 33-45.
52. Ayres, J.C. 1955. Microbial implications in the handling slaughtering and dressing of meat animals. Advances in Food Research 6: 109-161.
53. Ayoulet, M.; Fournaud, J. 1976. Bacteriological interactions during the manufacture of dry sausages. Fleischwirtschaft 56: 1331-1334.
54. Bacus, J.N. 1984. Historical perspective. p.1-14. In: Utilization of microorganisms in meat processing. A.N. Sharpe (eds.), Research Studies Press Ltd., John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
55. Bacus, J.N. 1986. Fermented meat and poultry productions. p.123-164. In: Advances in meat research. A.M. Pearson and T.R. Dutson (eds.), AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA.
56. Bacus, J.N.; Brown, W.L. 1981. Use of microbial cultures: meat products. Food Technology 1: 74-78, 83
57. Bacus, J.N.; Brown, W.L. 1985a. The *pediococci* meat products. p.85-96. In: Bacterial starters cultures for foods, Vol.7. S.E. Gilliland (eds.), CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida.
58. Bacus, J.N.; Brown, W.L. 1985b. The *Lactobacilli* meat products, p.41-56. In: Bacterial starters cultures for foods, Vol.4. S.E. Gilliland (eds.), CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida.
59. Bailey, A.J.; Robins, S.P. 1976. Current topics in the biosynthesis structure and function of collagen. Sc. Prog. Oxford 63: 89-93.

60. Bailey, M.E.; Swain, J.W. 1973. Influence of nitrite in meat flavour. Proc. Meat Ind. Res. Conf. American Meat Institute Foundation, Chicago. p. 29-32.
61. Baird-Parker, A.C. 1979. Methods for identifying *Staphylococci* and *Micrococcii*. p.201-210. In: Identification methods for microbiologists. F.A. Skinner e P.W. Lovelock (eds.), Academic, London.
62. Balabanian, O. 1980. Les exploitations et les problèmes de l' agriculture en Estremadure espagnole et dans le haut Alentejo – Contribution à l'étude des campagnes méditerranéennes. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor. Universidade de Clermont Ferrant.
63. Baldini, P.; Bernardi, E.P.; Raczyński, R. 1977. Indagini sul prosciutto tipico di Parma: influenza della fase de salagione sull'evoluzione dei parametri chimico-fisici della popolazione batterica. Industria Cosevare 52(1): 16-27.
64. Banerjee, M.; Sarkar, P.K. 2003. Microbiological quality of some retail spices in India. Food Research International 36(5): 469-474.
65. Bannon, C.D.; Craske, J.D.; Hillikes, A.E. 1985. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reability. IV. Fats with fatty acids containing four or more carbon atoms. J.A.O.C.S. 62: 1501-1507.
66. Barbosa, M.H.N. 2000. Evolução da flora microbiana em enchidos de porco Alentejano mantidos sob vácuo e sob atmosfera modificada. Relatório do trabalho de fim de curso, Licenciatura em Engenharia Zootécnica. Universidade de Évora.
67. Bard, J.; Townsend, W.E. 1976. Curado de la carne. p.463-480. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. J.F. Price Y.B.S. Schweigert (eds.), Acribia, Zaragoza.
68. Barone, C. M.; Abbatiello, M.; Esposito, I.; Cappuccio, A.; Occidente, M.; Matassino, D. 2000 Some aspects of meat prodution in pig autochthonous genetic types. III. Morphometric characteristics of fiber types and adipocytes. Options Méditerranéennes. 41: 233-236.
69. Barranco, S.; Crespo, A. F.; Padrón, J. C.; Heredia, F. B.; Moreno, C. M.; Pérez-Barquero, E. M.; Martins C. 1985. Modificaciones de la composición química y de las características de estabilidad del chorizo durante el proceso de maduración en condiciones naturales. Alimentaria 165: 35-40.
70. Barrierre, J-C.; Bacque, E.; Puchalt, G.; Quenet, Y.; Molherat, C.; Cassayre, J; Paris, J-M. 1998. Reactivity of 1-(des-3-hydroxy-picolinoyl) pristinamycin I_A. Tetrahedron 54(42): 35-40.
71. Battistotii, B.; Bottazzi, V.; Vola, G. 1977. Impiego di *Streptococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e Bacilli lattici nella caseificazione del fromaggio fontina. Sci. Tecn. Latt. Cas. 28: 331-341.
72. Bello, J.; Sanchez-Fuertes, M.A. 1995. Application of a mathematical model to describe the behaviour of the *Lactobacillus* spp. during ripening of a Spanish dry fermented sausage (Chorizo). International Journal of Food Microbiology 27: 215-227.
73. Bengmark, S. 1998. Ecoimmunonutrition: A challenge for the third millenium. Nutrition. 14: 563-572.
74. Berdagué, J.L.; Monteil, P.; Montel, M.C.; Talon, R. 1993. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. Meat Science 35: 275-287.
75. Berdagué, J.L.; Montel, C.; Talon, R.; Monteil, P. 1992. Influence of starter cultures on the volatile content and aroma of dry sausage. Proceedings of 38th. International Congress of Meat Science and Technology. Clermont-Ferrand, France. p. 771-776.
76. Bergdoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. p.463-542. In: Foodborne bacterial pathogens. Doyle, M. P. (eds.), Marcel Dekker Inc., New York, USA.
77. Berger, R.G.; Macku, C.; German, J.B.; Shibamoto, T. 1990. Isolation and identification of dry salami volatiles. Journal of Food Science 55: 1239-1242.

78. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. P.H.A. Sneath, N.S. Mair (eds.), M.E. Sharpe and J.G. Holt, Williams & Wilkins Co., Baltimore, Reino Unido.
79. Beriain, M.J.; Lizaso, G.; Chasco, J. 2000a. Free amino acids involved in "salchichón" processing. Food Control 11: 41-47.
80. Beriain, M.J.; Lizaso, G.; Chasco, J. 2000b. Relationship between biochemical and sensory quality characteristics of different commercial brands of salchichón. Food Control 11: 231-237.
81. Beriain, M.J.; Peña, M.P.; Bello, J. 1993. A study of the chemical components which characterize Spanish saucisson. Food Chemistry 48: 31-37.
82. Beriain, M.J.; Santamaría, I.; Bello, J. 1990. Relación estadística entre el proceso de curación del chorizo y algunas de las propiedades funcionales de las proteínas. Alimentaria 63.
83. Bermell, S.; Molina, I.; Miralles, C.; Flores, J. 1992. Studies on the microflora of dry cured ham. Proteolytic activity. Fleischwirtschaft 72: 1703-1705.
84. Bernáldez, M.J.B.; Ramos, J.J.C. 2001. Semiconservas cárnicas tratadas por el calor. Tecnología de elaboración. Defectos y alteraciones. Conservabilidad. Vol II, p.1305-1315. In: Encyclopédia de la carne y de los productos cárnicos. Martín e Macias (eds.), Plasencia, Espanha.
85. Bernardo Lima, S. 1965. História natural e económica do porco. O Arquivo Rural. VIII: 91-96.
86. Bettencourt, A.J. 1984. Salsicharia do porco Alentejano. Jornadas Luso-Espanholas de cerdo Ibérico. Badajoz, Espanha.
87. Beuchat, L.R.; Golden, D.A. 1989. Antimicrobial occurring naturally in foods. Food Technology 43: 134-142.
88. Bhowmik, T.; Marth, E.H. 1989. Esterolytic activities of *Pediococcus* species. Journal of Dairy Science 72: 2869-2872.
89. Bhunia, A.K.; Johnson, M.C.; Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology 65: 261-268.
90. Bianchi, M.A.; Pilosof, A.M.R.; Bartolomai, G.B. 1985. Rheological behaviour of comminuted meat systems containing soy protein isolates. J. Texture Studies 16 (2), 193-198.
91. Bjeldanes, L.F.; Schultz, D.E.; Morris, M.M. 1978. On the aetiology of scombrotoxicity: cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea pig. Food and Cosmetics Toxicology 16: 157-159.
92. Björck, L. 1985. The lactoperoxidase system. p.18-30. In: Natural Antimicrobial Systems. IDF (eds.). Brussels, Bélgica.
93. Björkroth, K.J.; Korkeala, H.J. 1997. Evaluation of *Lactobacillus sake* contamination in vacuum – packaged sliced cooked meat products by ribotyping. Journal of Food Protection 59: 398-401.
94. Blumenthal, H.J. 1972. Glucose catabolism in *Staphylococcus*. p.111-133. In: The *Staphylococci*. J.O. Cohen (eds.), Willer. New York, USA.
95. Boissonnet, B.; Callon, C.; Larpent,-Gourgaud, M.; Michaux, O.; Sirami, J.; Bonnin, P. 1994. Isolation and selection of lipolytic yeasts from fermented dry sausages. Viandes et Produits Carnés 15: 64-67.
96. Borch, E.; Berg, H.; Holst, O. 1991. Heterolactic fermentation by a homofermentative *Lactobacillus* sp. During glucose limitation in anaerobic continuous culture with complete cell recycle. Journal of Applied Bacteriology 71: 265-269.
97. Borch, E.; Kant-Muermans, M-L.; Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. International Journal of Food Microbiology 33: 103-120.

98. Börjesson, T.; Stöllman, U.; Schnürer, J. 1990. Volatil metabolites and other indicatours of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. Applied and Environmental Microbiology 56: 3705-3710.
99. Börjesson, T.; Stöllman, U.; Schnürer, J. 1993. Off- odorous compounds produced by moulds on oatmeal agar: identification and relation to other growth characteristics. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41: 2104-2111.
100. Bousset, J.; Fournaud, J. 1976. L'emploi des nitrates et des nitrites pour le traitement des produits carnés: aspects technologiques et microbiologiques. Ann Nutr. Alim. 30: 707-714.
101. Bover-Cid, S.; Hugas, M.; Izquierdo-Pulido, M.; Vidal-Carou, M.C. 2001b. Amino acid-descarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. International Journal of Food Microbiology 66: 185-189.
102. Bover-Cid, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Vidal-Carou, M.C. 1999a. Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology 46: 95-104.
103. Bover-Cid, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Vidal-Carou, M.C. 2001a. Effect of the interaction between a low tiramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic *Staphylococci* on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. International Journal of Food Microbiology 65: 113-123.
104. Bover-Cid, S.; Schoppen, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Vidal-Carou, M.C. 1999b. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. Meat Science 51: 305-311.
105. Braathen, O.S. 1998. For the sake of safety, let's stop including high pH meat in beef mince. Norks Veterinaertidsskrift 110: 27-29.
106. Brankova, R.; Markov, E.; Tsetkov, T.; Dineva, B. 1987. Studies on the activity of micrococci in view of the selection of starter cultures. Proceedings of 32nd International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finland. Vol.II. p. 334-336.
107. Bredholt, S.; Nesbakken, T.; Holck, A. 1999. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum-packaged meat. Int. J. Food Microbiol. 53: 43-52.
108. Bredholt, S.; Nesbakken, T.; Holck, A. 2001. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum packaged meats. International Journal of food Microbiology 66: 191-196.
109. Brennan, C.P.; Ha, J.K.; Lindsay, R.C. 1989. Aroma properties and thresholds of some branched-chain and other minor volatile fatty acids occurring in milkfat and meat lipids. Journal of Sensory Studies 4: 105-120.
110. Breslin, P.A.S.; Beauchamp, G.K. 1995. Supression of bitterness by sodium: variation among bitter taste stimuli. Chemical Senses 20: 609-623.
111. Briozzo, J.; Lagarde, E.A.; Shirife, J.; Parada, J.L. 1986. Effect of water activity and pH on growth and toxin production by *Clostridium* type G. Applied and Environmental Microbiology. 51(4): 844-848.
112. British Nutrition Foundation. 1992. Unsaturated fatty acids: nutritional and physiological significance. The report of the British Nutrition Foundation's Task Force (eds.), Chapman & Hall, London, Reino Unido.
113. Britz, N.L.; Wilkinson, R.G. 1982. Leucin dissimilation to isovaleric and isocaprylic acids by cell suspensions of amino acid fermenting anaerobes: the Stickland reaction revisited. Canadian Journal of Microbiology 28: 291-300.
114. Brockerhoff, H. 1966. Fatty acid distribution patterns of animal depot fats. Comparative Biochemistry and Physiology 19: 1-4.

115. Brody, A.L. 1996. The market. p.19-40. In: Principles and applications of modified atmosphere packaging of food. R.T. Parry (eds.), R. T., Blackie Academic & Professional, London, Reino Unido.
116. Bromberg, R.; Moreno, I.; Oliveira, J.; Delboni, R.R.; Cintra, H.C.A. 2003. Bacteriocin-like inhibitor of *Lactococcus lactis* subsp. *Hordniae* CTC484 against *Listeria Monocytogenes*. Proceedings of 49th International Congress of Meat Science and Technology. Campinas, Brasil. p. 377-378.
117. Bromberg, R.; Moreno, I.; Oliveira, V.; Teixeira, P. 2003. Effect of bacteriocins produced by *LC. Lactis* subsp. *Cremoris* CTC 204, *Enterococcus Avium* 483, and *LC. Lactis* subsp. *Hordniae* CTC 484 on mesophilic aerobic counts of minced beef during refrigerated storage. Proceedings of 49th International Congress of Meat Science and Technology. Campinas, Brasil. p. 385-386.
- 118.
119. Broome, M.C.; Krause, D.A.; Hickey, M.W. 1990. The use of non-starter *Lactobacilli* in Cheddar cheese manufacture. Australian Journal of Dairy Technology 45: 67-73.
120. Brown, C.L.; Hedrick, H.B.; Bailey, M.E. 1974. Characteristics of cured hams as influenced by levels of sodium nitrite and sodium ascorbate. Journal of Food Science 39: 977-979.
121. Buchanan, R.L.; Palumbo, S.A. 1985. Aeromonas hydrophila and Aeromonas sobria as potential food poisoning species: a review. Journal of Food Safety 7: 15-29.
122. Buchanan, R.L.; Solberg, M. 1972. Interaction of sodium nitrite, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Science 37: 81-85.
123. Burchales, C.; Girard, J.P.; Sirami, J.; Pascal, G. 1984. Characteristics of a dry sausage showing excessive acidity. Sciences des Aliments 4: 137-143.
124. Burgos, J. 1981. Factores tecnológicos que controlan la calidad de los embutidos crudos y maduros. Filón. Diciembre: 16-24.
125. Buscaillon, S.; Berdagué, J.L.; Monin, G. 1993. Time-realted changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. Journal of the Science of Food and Agriculture 63: 69-75.
126. Buyze, G.; Van Den Hamer, J.A.; De Haan, P.G. 1857. Correlation between hexose-monophosphate shunt, glycolytic system and fermentation type in *lactobacilli*. Antonie van Leeuwenhoek 23: 345-350.
127. Buzzini, P.; Haznedari, S. 1995. Characterization of yeasts isolated from fermented sausages produced in Umbria (Italy) and preliminary evaluation of their proteolytic and lipolytic activity. Industrie Alimentaire 10: 791-795, 798.
128. Byun, M.W.; Lee, J.W.; Jo, C.; Yook, H.S. 2001. Quality properties of sausage made with gamma-irradiated natural pork and lamb casing. Meat Science 59(3): 223-228.
129. Cabaço, P.A.L.O. 1995. Inventariação e caracterização da salsicharia do Norte alentejano. Comissão de Coordenação da Região Alentejo (eds.), Évora.
130. Cáceres, L. M. 2001. Alteraciones físico-químicas de la carne. Vol I, p.403-414. In: Enclopédia de la carne y de los productos cárnicos. Martín e Macias (eds.), Plasencia, Espanha.
131. Caine, W.R.; Aalhus, J.L.; Best, D.R.; Dugan, M.E.R.; Jeremiah, L.E. 2003. Relatiochip of texture profile analysis and Warne-Bratzler shear force with sensory characteristics of beef rib steaks. Meat Science 64(4): 333-339.
132. Callewaert, R.; Hugas, M.; Vuyst, L. 2000. Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococci* in the production of Spanish style dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology 57(1-2): 33-42.

133. Cambero, M.I.; Fernandez, L.; Fernanado, G.G.; Hoz, L.; Selgas, M.D. 1998. Tecnología de los alimentos. Componentes de los alimentos y procesos. Vol.I. Juan A. Ordoñez (eds.).
134. Campanini, M.; Mutti, P.; Previdi, M.P. 1987. Caractterizzazione di *Micrococcaceae* da insaccati stagionati. Ind. Conserve 62: 3-6.
135. Cantoni, C.; Bersani, C.; Ludrini, R. 1992. Tipizzazione di *lattobacilli* negli insaccati stagionati. Industria Conserve XXI: 1160-1163.
136. Cantoni, C.; Bianchi, M.A.; Beretta, G. 1973. Ricerche sulla maturazione acida degli insaccati (salami). Industrie alimentari 2(2): 87-91.
137. Cantoni, C.; Cattaneo, P.; Perlasca, M. 1977. Irransidimento ossidativo del prosciutto crudo. Industrie Alimentari 1: 99-102.
138. Cantoni, C.; D'Aubert, S.; Bianchi, M.A.; Beretta, C. 1975. Alcuni aspetti del metabolismo dei lattobacilli durante la madurazione degli insaccati stagionati (salami). Ind. Aliment. 13(113): 88-102.
139. Cantoni, C.; Massacra, G.; Renon, P.; Giolitti, G. 1964. Recherches sull'azine delle Micrococcaceae sul grasso suino. Atti Soc. Ital. Vet. 189: 455-462.
140. Cantoni, C.; Molinar, R.; Renon, P.; Giolitti, G. 1967a. Untersuchung über die Lipide von dauerweursten. Die Nahrung 11: 341-353.
141. Cantoni, C.; Molinar, R.; Renon, P.; Giolitti, G. 1967b. Micrococci in pork fat. Journal of Applied Bacteriology 30:190-196.
142. Cantoni, C.; Molnar, M.R.; Renon, P.; Giolitti, G. 1967c. Lipolytic *Micrococci* in pork fat. Journal of Applied Bacteriology 30: 190-196.
143. Cantoni, C.; Molnar, R.; Renon, P.; Giolitti, G. 1966. Richerche sui lipidi degli insaccati stagionatti. Ind. Conserve. 41: 188-191.
144. Careri, M.; Mangia, A.; Barbieri, G.; Bolzoni, L.; Virgili, R.; Parolari, G. 1993. Sensory property relationship to chemical data of Italian-type dry-cured ham. Journal of Food Science 58: 968-972.
145. Carlsson, J.; Iwami, Y.; Yamada, T. 1983. Hydrogen peroxide excretion by oral *Streptococci* and effects on lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. Infect. Immun. 40: 70-80.
146. Carrascosa, A.V. 1989. Aspectos microbiológicos e físico-químicos del curado industrial del jamón serrano de cerdo blanco. Selección de cepas de interés tecnológico. Dissertaçao para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas. Universidade Complutense de Madrid.
147. Carrascosa, A.V. 2001. Cultivos iniciadores para la industria cárnica. Vol II, p.943-965. In: Encyclopédia de la carne y de los productos cárnicos. Martín e Macias (eds.), Plasencia, Espanha.
148. Carrascosa, A.V.; Cornejo, I. 1989. Culturas microbianas iniciadoras ou “starters” utilizadas en la industria de transformación de carnes.Caso especial del curado del jamón. Cárnica 2000 66: 70-77.
149. Carvalho, J.O. 1964. Contribuição para o estudo económico da Montanheira. Junta Nacional dos Produtos Pecuários (eds.), Lisboa.
150. Cassens, R.G.; Greaser, M.L.; Ito, T.; Lee, M. 1979. Reactions of nitrite in meat. Food Technology 33: 46-57.
151. Castaño, A.; Garcia Fontan, M.C.; Fresno, J.M.; Tornadijo, M.E.; Carballo, J. 2002. Survival of *Enterobacteracaceae* during processing of *Chorizo de cebolla*, a Spanish fermented sausage. Food Control 13(2): 107-115.
152. Castro, A.; Montaño, A.; Sánchez, A.H.; Rejano, L. 1998. Lactic acid fermentation and storage of blanched garlic. International Journal of Food Microbiology 39: 205-211.

153. Cava, R.; Ventanas, J.; Ruiz, J.; Andrés, A.I.; Antequera, T. 2000. Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of rearing system and muscle location. *Food Sci. Tech. Int.* 6(3): 235-242.
154. Cavett, J.J. 1963. A diagnostic key for identifying the lactic acid bacteria of vacuum packed bacon. *Journal of Applied Bacteriology* 26: 453-470.
155. Cavoski, D.D.; Obradovic, D.; Radavanovic, R; Perunivic, M.; Fridl, T. 1988. The effect of starter cultures on sensory and physicochemical properties of long ripened dry sausage. *Proceedings of 34th International Congress of Meat Science and Technology*, Brisbane. p. 368-370.
156. Cerise, L.; Bracco, U.; Horman, I.; Sozzi, T.; Wuhrmann, J.J. 1973. Changes in the lipid fraction during ripening of a pure pork salami. *Fleischwirtschaft* 53: 223-225.
157. Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L.; Collins, J.K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology* 35: 1- 27.
158. Chasco, J.; Beriain, M.J. 1993. A study of changes in the fat content of some varieties of dry fermented sausages during curing process. *Meat Science* 34: 191-204.
159. Cheah, K.S.; Cheah, A.M.; Waring, J.C. 1986. Phospholipase A2 activity, calmodulin, Ca²⁺ and meat quality in young and adult halothane-sensitive and halothane-insensitive British Landrace pigs. *Meat Science* 17: 37-53.
160. Cheftel, J.C.; Cheftel, H. 1976. In: *Introduccion a la Bioquímica y Tecnologia de los Alimentos*. Vol. I. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
161. Cheftel, J.C.; Cheftel, H. 1984. In: *Introduccion a la Bioquímica y Tecnologia de los Alimentos*. Vol. I. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha
162. Chizzolini, R.; Novelli, E.; Campanini, G.; Dazzi, G.; Madarena, G.; Zanardi, E.; Pacchioli, M. T.; Rossi, A. 1996. Lean colour of green and matured Parma hams: comparative evaluation and technological relevance of sensory and objective data. *Meat Science* 44(3): 159-172.
163. Chizzolini, R.; Novelli, E.; Zanardi, E. 1998. Oxidation in traditional mediterranean meat products. *Proceedings 44th International Congress of Meat Science and Thecnology*. Barcelona. 1 p. 132-141.
164. Chizzolini, R.; Novelli, E.; Zanardi, E. 1998. Oxidation in traditional mediterranean meat products. *Proceedings 44th International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, Espanha. *Meat Science* 49, Supplement 1: S87-S99.
165. Cho, I.C.; Bratzler, L.J. 1970. Effect of sodium nitrite on flavor of cured pork. *J. Food Sci.* 35: 668-671.
166. Chouriço, A.C. 1999. Estudo comparativo de parametros microbiológicos e organolépticos de enchidos de porco Alentejano. Relatório de trabalho de fim de curso, Licenciatura em Engenharia Zootécnica, Universidade de Évora.
167. Christensen, J.E.; Dudley, E.G.; Pederson, J.A.; Steele, J.L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 217-246.
168. Church, P.N. 1993. Meat products. p.229-269. In: *Principles and applications of modified atmosphere packaging of food*. Parry. P.T. (eds.) Blackie Academic & Professional, London.
169. Cid, C.; Astiásaran, I.; Bello, J. 1992. Influencia de las tecnologías de elaboración de diferentes productos cárnicos crudo-curados sobre la fracción miofibrilar de las proteínas. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 32(1): 59-63.
170. Ciegler, A.; Mintzlaff, H. J.; Weisleder, D.; Leistner, L. 1972. Potential production and detoxification of penicillic acid in mold-fermented sausage (salami). *Appl. Microbiol.* 24(1): 114-119.

171. Cilla, I.; Martínez, L.A.; Beltrán, J.A.; Roncalés, p. 2004. Factors affecting acceptability of dry cured ham throughout extendend ripening under "Bodega conditions". Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
172. Clark, D.S.; Takacs, J. 1980. Gases as preservatives. p.170-180. In: Microbial Ecology of Foods. Silliker (eds.), J. H. Academic Press, London.
173. Cocolin, L.; Manzano, M.; Cantoni, C.; Comi, G. 2000. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented italian sausages using a polymerase chain reaction - temperature gradient gel electrophoresis. Letters in Applied Microbiology 30: 126-129.
174. Coelho, J. 2003. Jornada Técnica de Suinicultura Extensiva. Escola Superior Agrária de Castelo Branco.
175. Collins, E.B.; Aramaki, K. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 63: 353-357.
176. Collins, M.D.; Jones, D. 1981. The distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol. Rev. 45: 316-354.
177. Collins-Thompson, D.L.; Rodríguez-López. 1981. Depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed bologna. Journal Food Prot. 44: 593-595.
178. Comi, G.; Cantoni, C. 1980. I lieviti in insaccati crudi stagionati. Ind. Aliment. 19: 857-860.
179. Comi, G.; Cittero, B.; Manzano, M.; Cantoni, C.; De Bertoldi, M. 1992. Evaluation and characterization of Micrococcaceae strains in Italian dry sausages. Fleischwirtsch 72(12): 1679-1682.
180. Cook, P.E. 1995. Fermented meats. G. Campbell-Platt e P.E. Cook (eds.), Blackie Academic and Professional, Glasglow, Reino Unido.
181. Cook, P.E. 1995. Fungal ripened meats and meat products. p. 110. In: Fermented meats. G. Campbell-Platt e P. E. Cook (eds.), Blackie Academic and Professional. Suffolk, Reino Unido.
182. Coppola, R.; Giagnacovo, B.; Iorizzo, M.; Grazia, L. 1998. Characterization of Lactobacilli involved in the ripening of soppressata molisana, a typical southern Italy fermented sausage. Food Microbiology 15: 347-353.
183. Coppola, R.; Iorizzo, M.; Saotta, R.; Sorrentino, E.; Grazia, L. 1997. Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italian fermented sausage. Food Microbiology 14: 47-53.
184. Coppola, S.; Mauriello, G.; Aponte, M.; Moschetti, G.; Villani, F. 2000. Microbial sussession during ripening of Napoles-type salami, a southern Italian fermented sausage. Meat Science 56: 321-329.
185. Cordero, M.R.; Zumalacarregui, J.M. 2002. Characterization of Micrococcaceae isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. Letters in Applied Microbiology 31: 303-306.
186. Coretti, K. 1958. Rohwurstfehlfabrikate durch Laktobazillen. Fleischwirtschaft 10(4): 218-225.
187. Coretti, K. 1965. The ocorrrence and significance of lypolytic microorganisms in salami-type sausages intended for long storage. Fleischwirtsch. 45: 21-23.
188. Coretti, K. 1977. Starterkulturen in der Fleischwirtschaft. Fleischwirtsch. 3: 386-394.
189. Cosansu, S.; Ayhan, K. 2000. Survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157-H7 strain in Turkish soudjouck during fermentation, drying and storage periods. Meat Science. 54(4): 407-411.
190. Costa Júnior, J.J. 1947. Gados, riqueza nacional. Vol. 119. Biblioteca Cosmos (eds.).
191. Costell, E.; Durán, L. 1981a. El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos. I - Introducción. Rev. Agroquim. Tecnol. Alim. 21(1): 1-10.

192. Costell, E.; Durán, L. 1981b. El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos. II - Planteamiento y planificación: selección de pruebas. Rev. Agroquim. Tecnol. Alim. 21(2): 149-166.
193. Costell, E.; Durán, L. 1981c. El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos. III – Planificación, selección de jueces y diseño estadístico. Rev. Agroquim. Tecnol. Alim. 21(4): 455-470.
194. Costell, E.; Durán, L. 1981d. El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos. IV- Realización y análisis de los datos. Rev. Agroquim. Tecnol. Alim. 22(1):10-21.
195. Cross, C.K.; Ziegler, P. 1965. A comparison of the volatile fractions of cured and uncured meats. J. Food Sci. 30: 610-614.
196. Cruz, I. M.V. 1980. Noções de microbiologia dos alimentos. Curso para agentes de fiscalização. LNETI/DCEAI, Lisboa.
197. Cruz, I. M.V. 1986a. Origem e acção dos microorganismos nos alimentos. p.3-15. In: Microbiologia Aplicada às Indústrias Alimentares. 2^a Edição, Vol.38. Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, DTIA, Lisboa.
198. Cruz, I. M.V. 1986b. Factores que condicionam a actividade microbiana. p.17-38. In: Microbiologia Aplicada às Indústrias Alimentares. 2^a Edição, Vol.38. Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial (eds.), DTIA, Lisboa.
199. Currie, R.W.; Wolfe, F.H. 1977. Evidence for differences in post mortem intramuscular phospholipase activity in several muscle types. Meat Science 1: 185-193.
200. Daeschel, M.A.; McKenney, M.C.; McDonald, L.C. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7: 91-98.
201. Dainty, R.; Blom, H. 1995. Flavour chemistries of fermented sausages. In: Fermented Meats. G. Campbell-Platt e P.E. Cook (eds.), Blackie Academic and Professional. Suffolk, Reino Unido.
202. Dainty, R.H.; Edwards, R.A.; Hibbard, C.M.; Ramantanis, S.V. 1986. Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beefg. Journal of Applied Bacteriology 61: 117-123.
203. Dainty, R.H.; Hibbard, C.M. 1980. Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. Journal of Appl. Bacteriol. 48: 387-396.
204. Dainty, R.H.; Mackkey, B.M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement 21: 103S-114S.
205. Dainty, R.H.; Shaw, N.G.; Roberts, T.A. 1983. Microbial and chemical changes in chill stored red meats. p.151-178. In: Food Microbiology: Advances and Prospects. Roberts, T.A. e Skinner, F.A. (eds.), Academic Press Inc. London, Reino Unido.
206. Dalrymple, R.H.; Hamm, R. 1975. Postmortem glycolysis in ground skeletal muscle as influenced by prerigor freezing and subsequent thawing. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung 158: 333-339.
207. Daood, H.G.; Vinkler, M.; Márkus, F.; Hebshi, E.A.; Biacs, P.A. 1996. Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. Food Chemistry 55(4): 365-372.
208. Daun, H. 1975. Effects of salting, curing and smoking on nutrients of fresh foods. p.355-381. In: Nutritional Evaluation of Food Processing. 2^a edição. R.S. Harris and E. Karmas (eds.), AVI Publishing Co, Inc. Westport, Connecticut, USA.
209. De Laet, J.S. 1997. Do iníco da produção de alimentos aos primeiros estados. Visão geral. In: UNESCO – História da Humanidade. Verbo (eds.), Lisboa.

210. De Martinis, E.; Franco, B. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. International Journal of Microbiology 42: 119-126.
211. De Pedro, E. 1989. Factores que afectan a la calidad de los productos del cerdo Ibérico. I. Jornadas Técnicas Andaluzas sobre Ganado Porcino. Aracena, Espanha. p. 79-93.
212. Deibel, R.H. 1974. Technology of fermented, semi-dried and dried sausages. Proceedings. Meat Ind. Res. Conf. Am. Inst. Found. N°57.
213. Deibel, R.H.; Wilson, G.A.; Niven, Jr. C.F. 1961. Microbiology of meat curing. IV A lyophilised *Pediococcus cerevisiae* starter culture for fermented sausage. Appl. Microbiol. 9: 239-243.
214. DeKetelaere, A.; Demeyer, D.; Vandeckerckhove, P.; Vervaeke, I. 1974. Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. Journal of Food Science 39: 297-300.
215. DeMan, J.M. 1992. Chemical and physical properties of fatty acids. p.17-45. In: Fatty Acids in Foods and their Health Implications. C.K. Chow Marcel Dekker (eds.), New York, USA.
216. DeMasi, T.W.; Grimes, L.W.; Dick, R.L.; Acton, J.L. 1989. Nitrosoheme pigment formation and light effects on color properties of semi-dry, nonfermented and fermented sausages. J. Food Prot. 52: 189-193.
217. DeMasi, T.W.; Wardlaw, F.B.; Dick, R.L.; Acton, J.C. 1990. Nonprotein nitrogen (NPN) and free amino acid contents of dry, fermented and nonfermented sausages. Meat Science 27: 1-12.
218. Demeyer, D. 1992. New technologies for meat and meat products. F. J. M. Smulders, F. Toldrá (eds.), José Flores & Miguel Prieto. Ecceamst/AUDET tijdschriften, Nijmegen.
219. Demeyer, D.; Raemaekers, M.; Rizzo, A.; Holck, A.; De Smedt, A.; Ten Brink, B.; Hagen, B.; Montel, C.; Zanardi, E.; Murbrekk, E.; Leroy, F.; Vandendriessche, F.; Lorentsen, K.; Venema, K.; Sunesen, L.; Stahnke, L.; De Vuyst, L.; Talon, R.; Chizzolini, R.; Eerola, S. 2000. Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. Food Research International 33: 171-180.
220. Demeyer, D.I.; Claeys, E.; Ötles, S.; Verplaetse. 1992. Effect of meat species on proteolysis during dry sausage fermentation. Proceedings of 38th International Congress Meat Science. Technology. Clermont-Ferrant, França. p. 775-778.
221. Demeyer, D.I.; Hoozee J.; Mesdom, H. 1974. Specificity of lipolysis during dry sausage ripening. Journal of Food Science 39: 293-296.
222. Demeyer, D.I.; Vandekerckhove, P.; Moermann, R. 1979. Compounds determining pH in dry sausage. Meat Sci. 3:161-167.
223. Demeyer, D.I.; Verplaetse, A. 1985. The kinetics and stoichiometry of dry sausage fermentation as affected by starter culture and sausage diameter. Journal of Science of Food and Agriculture 36: 1345-1346.
224. Demeyer, D.I.; Verplaetse, A.; Gistelinck, M. 1986. Fermentation of meat: an integrated process. Proceedings of 32nd European Meeting Meat Research Workers. Ghent, Bélgica. Vol.I, p. 241-247.
225. Demeyer, D.I.; Verplaetse, A.; Gistelinck, M. 1987. Fermentation of meat: an integrated process. Proceedings of 33rd International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki: 241-247.
226. Diaferia, C.; Pirone, G.; La Pietra, L.; Magliano, V. 1995. Impiego di microrganismi autoctoni nella preparazione del salame stagionato. I. Caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche in funzione del tipo e del levello de zucchero. Industria Conserve 70: 138-143.
227. Diário da República, 1993. Portaria nº 1229/93 de 27 Novembro, I série B. Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo.
228. Diário da República. Portaria nº 252/96 de 10 de Julho, I série B. Ministérios da Economia, da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, da Saúde e do Ambiente.

- 229.** Dias, S.M. 2000. Caracterização da microflora dos enchidos regionais alentejanos. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Alimentar/Qualidade. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- 230.** Díaz, O; Fernandez, M.; Garcia de Fernando, G.D.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J.A. 1997. Proteolysis in dry fermented sausages: the effect of selected exogenous proteases. Meat Science 46: 115-128.
- 231.** Díaz, O; Fernandez, M.; Garcia de Fernando, G.D.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J. A. 1992. Effect of addition of the aspartyl proteinase from *Aspergillus oryzae* on dry fermented sausage proteolysis during ripening. Proceedings of 38th International Congress Meat Science and Technology. Clermont-Ferrant, França. 4: 779-782.
- 232.** Díaz, O; Fernandez, M.; Garcia de Fernando, G.D.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J.A. 1993. Effect of addition of pronase E on the proteolysis in dry fermented sausages. Meat Science 34: 205-216.
- 233.** Díaz, O; Fernandez, M.; Garcia de Fernando, G.D.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J.A. 1996. Effect of addition of papain on the dry fermented sausage protelysis. J. Sci. Food Agric. 71: 13-21.
- 234.** Diéguez, E.D. 1992. Evolución y situación actual del cerdo Ibérico. p.11-35. In: El cerdo Ibérico la naturaleza, la dehesa. MAPA (eds.), Secretaria General Técnica. Espanha
- 235.** Dierick, N.; Vandekerckhove, P.V.; Demeyer, D.I. 1974. Changes in non protein compounds during dry sausage ripening. J. Food Sci. 39: 301-305.
- 236.** Dillon, V.M.; Board, R.G. 1991. Yeasts associated with red meats. Journal of Applied Bacteriology 71: 93-108.
- 237.** Dines-Larsen, M.; Rotvig-Kristiansen, K.; Kronborg-Hansen, T. 1998. Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. International Journal of Food Microbiology 43: 215-221.
- 238.** Dineva, B.; Markov, E.; Brankova, R. 1987. Studies on the activity of *Micrococcii* in view of the selection of starter culture. I. Catalase activity of strains isolated from raw-dried meat products. Proceedings of the 33rd European Meeting Meat Research Workers. Helsink, Dinamarca. Vol.II, p. 330-333.
- 239.** Dobao, M.T.; Rodriñañez, J.; Silio, L.; Toro, M. A. 1988. Ibérican pig production in Spain. Pig News and Information 9: 277-282.
- 240.** Dobbertin, S.; Siems, H.; Sinell, H.J. 1975. The bacteriology of fresh Mettwurst. Fleischwirtsch. 55: 237-242.
- 241.** Dodds, K.L.; Collins-Thompson, D.L. 1984. Incidence of nitrite-depleting lactic acid bacteria in cured meats and in meat starter cultures. J. Food Protec. 47: 7-10
- 242.** Domínguez, M.C. 1988. Evolución de determinados parámetros proteolíticos y lipolíticos durante la maduración del chorizo elaborado en la provincia de León. Aportaciones a su caracterización. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Faculdade de Veterinária, Universidade de León.
- 243.** Domínguez, M.C.; Ferre, C.; Zumalacárregui, J.M. 1988. Aportaciones a la caracterización del chorizo elaborado en la provincia de León; parámetros químicos y fisicoquímicos. Alimentaria 198: 19-23.
- 244.** Domínguez, M.C.; Gutierrez, L.M.; Lopez, A.; Seco, F.; Zumalacárregui, J.M. 1989. Evolución de los principales grupos de microorganismos durante la maduración del chorizo de León. Alimentaria 199: 11-15
- 245.** Domínguez, M.C.; Zumalacárregui, J.M. 1991. Lipolytic and oxidative changes in "chorizo" during ripening. Meat Sci. 29: 99-107.
- 246.** Dragoni, I.; Cantoni, C.; D'Aubert, S. 1988. Ammuffimento grigio di insaccati crudi stagionati. Ind Alimnt. XXVII (Nov): 979-983.

247. Dransfield, E. 1993. Modelling post-mortem tenderisation. IV. Role of calpains and calpastatin in conditioning. Meat Science 34: 217-234.
248. Dransfield, E.; Etherington D.J.; Taylor, M.A.J. 1992. Modelling post-mortem tenderisation. II. Enzyme changes during storage of electrically stimulated and non-stimulated beef. Meat Science 31:75-84.
249. Eakes, B.D.; Blumer, T.N.; Monroe, R.J. 1975. Effect of nitrate and nitrite on colour and flavour of country-style hams. J. Food Sci. 40: 973-978.
250. Egan, A. F.; Shay, B.J.; Rogers, P.J. 1989. Factors affecting the production of hydrogen sulphide by *Lactobacillus sake* L13 growing on vacuum packaged beef. J. Applid Bacteriol. 67: 255 -262.
251. Eitenmiller, R.R.; Vakil, J.R.; Shahani, K.M. 1970. Production and properties of *Penicillium roqueforti*. J. Food Sci. 35: 130-133.
252. Eklund, T. 1984. The effect of carbon dioxin on bacteria growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. International Journal of Food Microbiology 1: 179-185.
253. El-Banna A.A.; Leistner, L. 1990. Prodution of penitrm A by *Penicillium crustosum* isolated from foodstuffs. Int. J. Food Microbiol. 7(1): 9- 13.
254. El-Banna, A.A.; Pitt, J.L.; Leistner, L. 1987. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. System. Appl. Microbiol. 42.
255. El-Gazzar, F.E.; Marth, E.H. 1986. Toxigenic and nontoxigenic strains of *Aspergillus* and *Penicillia* grown in the presence of sodium chloride cause enzyme-catalysed hydrolysis of protein, fat and hydrogen peroxide. J. Food Prot. 49(1): 29-33.
256. Elias, M. 1993. Caracterização de presuntos artesanais e industriais de suíno Alentejano. Modificações introduzidas pela embalagem sob vácuo. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa.
257. Elias M.; Carrascosa, A. 2000. Microbiological and physicochemical aspects of vacuum-packed Iberian ham. Effect of processing and slicing methods. Fleischwirtschaft International 2: 36-41.
258. Elias, M.; Marinho, M.; Palma, V.; Santos, C.; Roseiro, L.C. 2003. The influence of the starter cultures in the production of regional portuguese sausage – Microbiological, physical and chemical properties. Proceedings of 49th International Congress of Meat Science and Technology. Campinas, Brasil.
259. Elias, M.; Marinho, A.; Santos, A.C.; Barreto, A.; Oakinin, J.; Ferreira, M. 2000. The influence of the autochtonous starter cultures in the production of regional sausages- Mechanical properties and sensorial evaluation. Proceedings of 46th International Congress of Meat Science and Tecchnology, Buenos Aires, Argentina. Vol.I. p. 230-231.
260. Elias, M.; Marinho, A.; Santos, A.C.; Ribeiro, G.; Ribeiro, A.M.; Barreto, A.; Ouakinin, J.; Ferreira, M. 1999. Mechanical properties and sensorial evaluation from “Chouriço Grosso”. A regional Portuguese sausage. Proceeding of 45th International Congress of Meat Science and Technology. Yokohama, Japão.
261. Elias, M.; Santos, A.C.; Palma, V.; Santos, C.; Roseiro, L.C. 2004. Sensorial and rheological properties of “painho de Portalegre”. The influence of meat and size portions and NaCl concentration. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
262. Encinas, J.P.; López-Díaz, T.M.; Garcia-López, M.L.; Otero, A.; Moreno, B. 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. Meat Science 54: 203-208.
263. Encinas, J.P.; Sanz-Gómez, J.; García-López, M.L.; García-Armesto, M.R.; Otero, A. 1996. Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from Spanish fermented sausages. Meat Sciences 42: 127-131.

- 264.** Enser, M. 1984. The relationship between the composition and consistency of pig backfat. p.53-61. In: Fat quality and lean pigs. J. D. Wood (eds.), Meat Res. Inst. Spec. Rep., Bristol, Reino Unido.
- 265.** Enser, M. 1987. What is lipid oxidation? Oxidative stability of meat and meat products. Proc. Food Sci. Technol. Today. 1(3): 632-637.
- 266.** Enser, M. 2001. The role of fats in human nutrition. p.77-122. In: Oils and fats. Animal carcass fats. Vol.II. B. Rossel (eds.), Leatherhead, Surrey, Reino Unido.
- 267.** Enser, M.; Richardson, R.I.; Wood, J.D.; Gill, B.P.; Sheared, P.R. 2000. Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, leaver and sausages. Meat Science 55: 201-212.
- 268.** Eribo, B.E.; Jay, J.M. 1985. Incidence of *Acinetobacter* spp and other Gram-negative oxidise species (genus *Acinetobacter*). Appl. Environ. Microbilo. 49: 256-257.
- 269.** Erkkilä, S.; Petäjä, E.; Eerola, S.; Lilleberg, L.; Matilla/Sandholm, T.; Suihko, M-L. 2001. Flavour profiles of dry sausages fermented by slected novel meat starter cultures. Meat Science. 58(2): 111-116.
- 270.** Espinosa, V.; Fallola, A.; Osorio, E.; Sabio, E.; Benito, J. 1992. Efectos de diferentes reposiciones en montanera en la composición en ácidos grasos del texido adiposo subcutáneo de jamones frescos de cerdos Ibéricos. Jornadas Técnicas sobre Obtención de Productos Ganaderos Naturales en el Ecosistema de la Dehesa. Zefra, Badajoz. p.100-105.
- 271.** Evans, J.J.; Kloos, W.E. 1972. Use of shake cultures in a semisolid thioglycolate medium for differentiating *Staphylococci* from *Micrococci*. Appl. Microbiol. 23: 326-331.
- 272.** Fadda, S.; Sanz, Y.; Vignolo, G.; Aristoy, M.; Oliver, G.; Toldrá, F. 1999. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolisis caused by *Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology 65: 3540-3546.
- 273.** Fadda, S.; Vignolo, G.; Holgado, A.P.R.; Oliver, G. 1998. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry-fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. Meat Science 49: 11-18.
- 274.** Fallola, A.; Sanabria, C.; Sabio, E.; Vidal-Aragón, M.C.; Espárrago, F. 1998. The extensive pig quality. Proceedings of the International Symposium on Basis of the Quality of Typical Mediterranean Animal Products. European Association for Animal Production (EAAP). 90 p.320-338.
- 275.** Fang, C.H.S.; Post, L.S.; Solberg, M. 1985. Antimicroibial effect and desappearance of sodium nitrite in *Staphilococcus aureus* cultures. Journal of Food Science 50: 1412-1416.
- 276.** Farag, R.S.; Daw, Z.Y.; Hewedi, F.M.; El Baroty, G.S.A. 1989. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection 52: 655-657.
- 277.** Färber, P.; Geisen, R. 1994. Antagonistic activity of the food-related filamentous fungus *Penicillium nalgiovense* by the production of penicillin. Appl. Environ. Microbiol. 60(9): 3401-3409.
- 278.** Farelo, J. T. 1993. El jamón curado, matrícula-prima y calidad. Cárnica 2000. Suplemento: 135-149
- 279.** Farkas, J.; Incze, K.; Andrassy, E.; Reichardt, J. 1988. Microbiological changes in raw fermented sausages. Proceedings of International Symposium of Biotechnology Food Industry, Budapest. p. 479-486.
- 280.** Feldberg, R.S.; Chang, S.C.; Kotik, A.N.; Neuwirth, Z.; Sundstrom, D.C.; Thompson, N.H. 1988. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1763-1768.
- 281.** Felton, E.A.; Evans, J. B.; Niven, C.F. 1953. Production of catalase by the *pediococci*. Journal of Bacteriology 65: 481-482.

282. Fernández, J.M.B. 2000. Utilización de mohos y sus extractos enzimáticos intracelulares para potenciar la generación de substancias aromáticas y sápidas en embutidos curados. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Complutense de Madrid.
283. Fernández, M.; de la Hoz, L.; Díaz, O.; Cambero, M.I.; Ordoñez, J. A. 1995. Effect of the addition of pancreatic lipase on the ripening of dry-fermented sausages. I. Microbial, physico-chemical and lipolytic changes. Meat Science. 40: 159-162.
284. Fernandez, M.; Rodriguez, J. 1991. Lipolytic and oxidative changes in chorizo during ripening. Meat Science 29: 99-107.
285. Fernández-Fernández, E.; Romero-Rodriguez, M.A.; Vázquez-Odériz. 2001. Physicochemical and sensory properties of Galician chorizo sausage preserved by refrigeration, freezing, oil-immersion, or vacuum-packing. Meat Science 58: 99-104.
286. Ferrão, J.E.M. 1993. Especiarias. Cultura, tecnologia, comércio. Ministério do Planeamento e da Administração do Território (eds.), Instituto de Investigação Científica Tropical. Lisboa.
287. Ferreira, A.M. 2000. Evolução da flora microbiana em dois enchidos típicos da região de Estremoz e Borba, morcela e chouriço de carne. Relatório de trabalho de fim de curso, Licenciatura em Engenharia Zootécnica, Universidade de Évora.
288. Ferrer, J.; Arboix, P. 1986. The “salchichón de Vich” (Vich sausage). II. Evolution of chemical parameters during the curing process and valorisation of its organoleptic quality. Proceedings of the 32nd European Meeting Meat Research Workers. Ghente, Bélgica. Vol. I, p. 279-281.
289. Fink-Gremmels, J.; El-Banna, A.A.; Leistner, L. 1987. Toxicological evaluation of mould starter cultures. Mitteilungsbl. Bundesanstalt Feischforsh. Kulmbach. 105: 317-321.
290. Fink-Gremmels, J.; El-Banna, A.A.; Leistner, L. 1988. Developing mould starter cultures for meat products. Fleischwirtschaft. 68: 1292-1294.
291. Fink-Gremmels, J.; El-Banna, A.A.; Leistner, L. 1989. Desarrollo de los cultivos iniciadores de mohos para productos cárnicos. Fleischwirtschaft español. 2: 38-41.
292. Fischer, A. 1988. Produktbezogene Technologie – Herstellung von Fleischerzeugnissen. In: Fleisch, Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
293. Fischer, C.; Scott, T.R. 2000. Compuestos del flavour.p.19-68. In: Flavours de los alimentos. Biología y química. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
294. Fischer, K.; Augustini, C. 1977. Stages of post mortem glycogenolysis at various pH-values in pork. Fleischwirtschaft 57: 1191-1194.
295. Fischer, U.; Schleifer, K. H. 1980. Vorkommen von Staphylokokken und Mikrokokken in rohwurst. Fleischwirtsch. 60: 1046-1048.
296. Fiszer, W. 1970. Dynamics of dry sausage fermentation. Fleischwirtschaft 50: 325-328.
297. Flores, J.; Marcus, J.R.; Nieto, P.; Navarro, J.L. 1997. Effect of processing conditions on the proteolysis and taste of dry cured sausages. Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forshung 204: 168-172.
298. Flores, J.; Nieto, P. 1985. Composición y características de los lípidos de los tejidos adiposo y muscular del cerdo. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 25 (3): 305-315.
299. Flores, M.; Sanz, Y.; Toldrá, F. 1998. Curing agents as regulators of muscle and microbial aminopeptidase activity in dry fermented sausages. Proceedings of 44th International Congress of Meat Science and Technology. p. 868-869.
300. Fontan, C.G.; Vilar, I.; Castaño, A.; Marra, A.I.; Tornadijo, M.E.; Carballo, J. 1998. Microbial changes during the ripening of “chorizo de cebolla”, a traditional fermented sausage made in the

- NW of Spain. Proceedings of 44th International Congress of Meat Science and Technology, Barcelona, Espanha. II. p. 838-839.
301. Fooladi, M.H.; Pearson, A.M.; Coleman, T.H.; Merkel, R.A. 1979. The role of nitrite in preventing development of warmed-over flavour. *Food Chemistry* 4: 283-292.
302. Fooster, E.M.; Nelson, F.E.; Speck, M.L.; Dolstch, R.N.; Olson, J.-C. 1957. *Dairy Microbiology*. p.106-107. Prentice-Hall (eds.), Englewood Cliffs. New York, USA.
303. Fordyce, A.M.; Crow, V.L.; Thomas, T. D. 1984. Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 48: 332-337.
304. Forss, D.A. 1972. Odour and flavour compounds from lipids. Vol.13. p.177-190. In: *Progress in the Chemistry of fats and other lipids*. R. T. Holman (eds.), Pergamon Press, Oxford, Reino Unido.
305. Fox, P.F.; Law, J. 1991. Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology* 5: 239-262
306. Fox, P.F.; Lucey, J.A.; Cogan, T.M. 1990. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 29: 237-253.
307. Fraqueza, M.J.R. 1992. Utilização e valorização das tripas de animais de abate nas indústrias de carne portuguesas. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa.
308. Frazão, T.L. 1965. O porco Alentejano. *Boletim Pecuário XXXIII*: 5-33.
309. Frazier, W.C. 1967. *Food microbiology*. 2^a edição. McGraw Hill Book Co (eds.), New York, USA.
310. Frazier, W.C.; Westhoff, D.C. 1993. *Microbiología de los alimentos*. 4^a edição., Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
311. Freitas, A.B. 1998. Influência do nível e regime alimentar em pré-acabamento sobre o crescimento e desenvolvimento do porco Alentejano e suas repercuções sobre o acabamento em montanheira e com alimento comercial. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Agrárias. Universidade de Évora.
312. Freitas, A.B.; Cancela d'Abreu, M.; Kletschke, F.; Simões, F.; Almeida, J.A. 2000. Influence de l'alimentation avec triticale et foin de luzerne pendant le période de préfinition de porcs "alentejanos" sur la composition tissulaire dès carcasses au début et à la fin de la finition en "montanheira". *Options Méditerranéennes*, série A, Séminaires Méditerranéennes. 41: 155-158.
313. Frey, W. 1995. Fabricacion fiable de embutidos. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
314. Frisvad, J.C. 1989. The connection between *Penicillia* and *Aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18: 452-467.
315. Froelich, D.A.; Gullet, E.A.; Usborne, W.R. 1983. Effect of nitrite and salt on the color, flavor and overall acceptability of ham. *Journal of Food Science* 48: 152-154,171.
316. Gago, M.A.; Pérez, J.A.; Sayas, M.E.; Pagan, M.I.; Rodríguez, A.; Ballester, A.; Aranda, V. 1992. Colour study of Spanish "Salsichón" during fermentation and ripening. Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci. TTTechnol. Clermont-Ferrant, França. p.479- 484.
317. Gandemer, G.; Viau, M.; Navarro, J. L.; Sabio, E.; Monin, G. 2000 Lipides et qualité des jambons secs méditerranéens. *Options Méditerranéennes*. 41: 181-189.
318. Gänzle, M.G.; Weber, S.; Hammes, P. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Microbiology* 46: 207-217.
319. Garcia de Fernando, G.D.; de la Hoz, L.; Ordoñez, J.A. 1992. Cultivos iniciadores para fabricar embutidos crudos curados. AICE-Información Técnica 39: 11-14.

320. Garcia de Fernando, G.D.; Fox, P.F. 1991a. Extracellular proteinases from *Micrococcus* GF. I. Factors affecting growth and production. *Le Lait.* 71: 359-363.
321. Garcia de Fernando, G.D.; Fox, P.F. 1991b. Extracellular proteinases from *Micrococcus* GF. II. Isolation and characterization. *Le Lait.* 71: 371-374.
322. García-Garrido, J.A. ; Quiles-Zafra, R. ; Tapiador, J. ; Castro, M.D.L. 1999. Sensory and analytical properties of Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Food Chemistry* 67: 423-427.
323. Garcia, I.; Zumalacárregui, J.M.; Díez, V. 1995. Microbial succession and identification of *Micrococcaceae* in dried beef cesina, an intermediate moisture meat product. *Food Microbiology* 12: 309-315.
324. Garcia, M.L.; Selgas, M.D.; Fernández, M.; Ordóñez, J.A. 1992. Microorganisms and lipolysis in the ripening of dry fermented sausages. *Int. J. Food Sci. Technol.* 27: 675-678.
325. García, S.E.; Bejarano, S.M. 2001. Hierbas y especias. Vol I, p.653-688. In: Enciclopédia de la carne y de los productos cárnicos. Martín e Macias (eds.), Plasencia, Espanha.
326. García, S.; Iracheta, F.; Galván, F.; Heredia, N. 2001. Microbiological survey of retail herbs and spices from mexican markets. *Journal of Food Protection* 64: 99-103.
327. Garcia-Rebollo, A.J. 1996. Influencia del consumo de jamón de cerdo Ibérico criado en montañera, sobre el perfil lipídico aterogénico. Dissertaçao para obtenção do grau de Doutor em Medicina. Universidade da Extremadura.
328. Garcia-Rebollo, A.J.; Cansado, A.O.; Botejara, E.M.; Blanco, P.M.; Saavedra, B.M.; Gonzalez, S.A.; Bellido, M.M.; Fallola, A.; Arias, P.M.; Alvarez, J.E. 1998. Consumption of ham from pannaging Iberian pigs and its effects on human health. Proceedings of the International Symposium on Basis of the Quality of Typical Mediterranean Animal Products. European Association for Animal Production (EAAP). 90 p. 55-61.
329. Garcia-Varona, M.; Santos, E.M.; Jaime, I.; Rovira, J. 2000. Characterization of *Micrococacceae* isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology* 54:189-195.
330. Gardner, G.A. 1982. Microbiology of processing bacon and ham. Capítulo 5. p.129-178. In: Meat Microbiology. M.H. Brown. Elsevier Applied Science Publishers (eds.), London, Reino Unido.
331. Garriga, M. 1995. Diferencias tecnológicas en el uso de cultivos iniciadores en salchichón. *Eurocarne* 41: 75-78.
332. Garriga, M.; Calsina, M.D.; Monfort, J.M. 1988. Estúdio de la proteolisis en la maduración de salchichones manufacturados com carne de porcino de buena calidad. *Investigación Agraria Producción y Sanidad Animal* 3: 17-20.
333. Garvie, E. 1984. Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. p.35-46. In: Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. F.L. Davies e B.A. Law (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, London, Reino Unido.
334. Garvie, E.I. 1986. Gram positive cocci: Other genus. Genus *Pediococcus*. Vol.2. p.1075-1079. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.), Williams & Wilkins Co. Baltimore, Reino Unido.
335. Gasparik-Reichardt, J.; Cocolin, L.; Drosinos, E.; Gaitis, F. 2004. Comparison of microflora of traditional fermented sausages identified with traditional and molecular methods. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
336. Geisen, R. 1992. Heterologous gene expresion in *Penicillium nalgiovense*: optimization of fungal starter cultures. Dechema Biotechnology Conferences 5-VCH. Verlagsgesellschaft. p.777

337. Geisen, R. 1993. Fungal starter cultures for fermented foods: molecular aspects. Review. Trends in Food Technol. 4: 251
338. Geisen, R.; El-Banna, A.A.; Leistner, L. 1987. Einsatz gentechnologischer Methoden bei der Optimierung von Schimmelpilzstarterkulturen. Mittbl. Bundesanst. Fleischforch. 98: 7719-
339. Geisen, R.; Lücke, F.K.; Kröeckel, L. 1992. Starter and protective cultures for meat and meat products. Fleischwirtschaft 72: 894-898.
340. Genigeorgis, C.; Wilson, B.; Fanelli, M. S.; Metaxopoulos, J. 1986. Effects of processing parameters on certain microbiological and biochemical characteristics of fermented Italian dry salami manufactured under commercial conditions. Proc. 32nd Eur. Meet. Res. Work. Ghente, Bélgica. p. 267-271.
341. Gerhardt, U. 1975. Especias y condimentos. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
342. Gerhardt, U. 1980. Aditivos e ingredientes. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
343. Gibson, A.M.; Roberts, T.A. 1986. The effect of pH, sodium chloride, sodium nitrite and storage temperature on the growth of *Clostridium perfringens* and fecal *streptococci* in laboratory media. International Journal of Food Microbiology 3: 195-210.
344. Gibson, A.M.; Roberts, T.A. 1986. The effect of pH, water activity, sodium nitrito and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonellai* in a laboratory medium. International Journal of Food Microbiology. 3: 183-194.
345. Giddings, G.G. 1977. The basis of color in muscle food. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition 9: 81-114.
346. Giese, J. 1996. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. Food Technology 50: 73-74, 76, 78-81.
347. Gill, C.O.; Newton, K.G. 1978. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. Meat Science 2: 207-217.
348. Gill,C.O.; Newton, K.G. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. J. Appl. Bacteriol. 43: 189-195.
349. Gill, C.O. 1982. Microbial interactions with meats. Capítulo7. p.225-264. In: Meat Microbiology. M. H. Brown (eds.), Elsevier Applied Science Publishers. London, Reino Unido.
350. Gill, C.O. 1983. Meat spoilage and evaluation of potential storage life of fresh meat. Journal of Food. Prot. 46: 442-452
351. Gill, C.O. 1986. The control of microbial spoilage in fresh meats. Vol.2. p.49-88. In: Advances in meat research. Meat and poultry microbiology. Pearson, A.M. and Dutson (eds.), T.R. AVI Publishing Co. Inc. Westport, London, Reino Unido.
352. Gil, M.; Guerrero, L.; Sarrá, C. 1999. The effect of meat quality, salt and aging time on biochemical parameters of dry cured *longissimus dorsi* muscle. Meat Science 51: 329-337.
353. Gilliland, S.E. 1985. Role of starter culture bacteria in food preservation. p.175-186. In: Bacterial starter cultures for foods. Vol.13. S.E. Gilliland (eds.), CRSPress, Inc. Boca Raton, Florida.
354. Gimeno, O.; Ansorena, D.; Astiasarán, I.; Bello, J. 2000. Characterization of chorizo de Pamplona: instrumental measurements of colour and texture. Food Chemistry 69: 195-200.
355. Gimeno, O.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1999a. Chorizo de Pamplona: influence of a partial replacement of sodium chloride by a mixture of salts on texture. International Congress on Improved Traditional Foods for the Next Century, Valencia, Espanha: 123-126.
356. Gimeno, O.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1999b. Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on texture and color of dry fermented sausages. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 873-877.

357. Gimeno, O.; Astiasarán, I.; Bello, J. 2001a. Calcium ascorbate as a potential partial substitute for NaCl in dry fermented sausages: effect on colour, texture and hygienic quality at different concentrations. *Meat Science* 57: 23-29.
358. Gimeno, O.; Astiasarán, I.; Bello, J. 2001b. Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on microbiological evolution of dry fermented sausages. *Food Microbiology* 18: 329-334.
359. Giolitti, G.; Cantoni, C.; Bianchi, M. A.; Renon, P. 1971a. Microbiology and chemical changes in raw hams of Italian type. *J. Appl. Bacterol.* 34: 51.
360. Giolitti, G.; Cantoni, C.; Bianchi, M.A.; Renon, P.; Beretta, G. 1971b. Microbiologia e cambiamenti biochimici nei prosciutti crudi durante la stagionatura. *Archivio Veterinario Italiano* 22: 61-84.
361. Girard, J.P. 1988a. La déhydratation. p.83-115. In: *Technologie de la viande et des produits carnés*. Girard, J.P. (eds.), Tec Doc-lavoisier, INRA.
362. Girard, J.P. 1988b. La fumaison. p.171-214. In: *Technologie de la viande et des produits carnés*. Girard, J.P. (eds.), Tec Doc-lavoisier, INRA.
363. Girard, J.P. 1988c. L'acidification. p.141-170. In: *Technologie de la viande et des produits carnés*. Girard, J.P. (eds.), Tec Doc-lavoisier, INRA.
364. Girard, J.P. 1991. *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha: 183-229.
365. Girard, J.P.; Bout, J.; Salort, D. 1988. Lipids et qualités d'unité adipeux, facteurs de variation. *Journées Rech. Porcine en France* 20: 255-278.
366. Girard, J.P.; Denoyer, C.; Desmoulin, B.; Gandemer, G. 1983. Facteurs de variation de la composition en acides gras des tissus adipeux (bardière) et musculaire de porc (long dorsal). *Revue Françoise des Corps Gras* 30(2): 73-79.
367. Girard, J.P. ; Talon, R. 1983. La fumaison. *Bulletin Technique C.R.Z.V. Theix. I.N.R.A.* 54: 31-34.
368. Girard, J.P.; Touraille, C. 1985. A la recherche du goût perdu. *Filiere Viande* 70: 25-29.
369. Glénat, P.A.J. 1969. *Technologie et microbiologie du boyau salé*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. École National Vétérinaire d'Alfort. Paris, França.
370. Glenn, E.; Geisen, R.; Leistner, L. 1989. Control of *Listeria monocytogenes* in mould ripened raw sausages by strains of *Penicillium*. *Mitteilungsbl. Bundesanstalt für Fleischforschung*. Kulmbach. 105: 317-324.
371. Gökalp, H.Y.; Ockerman, H.W. 1985. Turkish-style fermented sausage (sound-jouk) manufactured by adding different starter cultures and using different ripening temperatures. I. Growth of total, psychophilic, proteolytic and lipolytic micro-organisms. *Fleischwirtschaft* 65: 1235-1240.
372. Goll, D.E.; Otsuka, Y.; Nagainis, P.D.; Sathe, S.K.; Shannon, J.D.; Muguruma, M. 1982. Muscle proteinases and their possible roles in muscle growth and meat texture. *Biochemical Society Transactions* 10: 280-282.
373. Gonzalez-Fandos, E.; Sierra, M.L.; Garcia-López, M.L.; Otero, A.; Sanz, J. 1996. Effect of major herbs and spices in Spanish fermented sausages on *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria. *Archives für Lebensmittelhygiene* 47: 43-47.
374. Gonzalez-Fernandez, C.; Jaime, I.; Rovira, J. 1998. Effect of sugar concentration on "chorizo" dry sausage using different lactic acid bacteria as starter culture. *Proceedings of 44th International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, Espanha: 200-303.

375. Gonzalez-Fernandez, C.; Santos, E.M.; Jaime, I.; Rovira, J. 2003. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology* 20: 275-284.
376. Gottschalk, G. 1986. *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag (eds.), New York.
377. Götz, F.; Elstener, E. F.; Sedewitz, B.; Lengfelder, E. 1980. Oxygen utilization by *Lactobacillus plantarum*. II Superoxide and superoxide dismutation. *Arch. Microbiol.* 125: 215-220.
378. Goupy, S.; Rochut, N.; Robins, R. J.; Gentil, E. 2000. Evaluation of solid-phase microextraction for the isotopic analysis of volatile compounds produced during fermentation by lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2222-2227.
379. Goutefongea, R. 1991. *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. J. P. Girard (eds.), Acribia. Zaragoza, Espanha.
380. Govindarajan, S.; Hultin, H.O.; Kotula, A.W. 1977. Myoglobin oxidation in ground beef: mechanistic studies. *Journal of Food Science* 42: 571-577,582.
381. Grau, R. 1965. *Carne y productos cárnicos*. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
382. Gray, J.I.; Pearson, A.M. 1984. Cured meat flavor. *Adv. Food Res.* 29: 1-86.
383. Gray, J.I.; Pearson, A.M. 1987. Rancidity and warmed-over flavour. In: *Advances in meat research*. Vol.3. Restructured meat and poultry products. A.M. Pearson e T.R. Dutson (eds.), Van Nostrand Reinhold Co. New York, USA.
384. Grazia, L.; Romano, P.; Bagni, A.; Roggiani, D.; Guglielmi, G. 1986. The role of moulds in the ripening process of salami. *Food Microbiol.* 3: 19-24.
385. Greene, B.E.; Price, L.G. 1975. Oxidation-induce color and flavor changes in meat. *J. Agric. Food Chem.* 23: 164-168.
386. Greer, G.G.; Dilts, B.D. 2004. Competitive inhibition of meat spoilage bacteria and pathogenes. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
387. Grosch, W.; Milo, C.; Widder, S. 1994. Identification and quantification of odorants causing off-flavours. p. 409-415. In: *Trends in flavours research*. H.Maarse & D.G. Van der Heij (eds.). Elsevier Publisher.
388. Guerrero, L.; Gou, P.; Arnau, J. 1999. Influence of meat pH on mechanical and sensory textural properties of dry-cured ham. *Meat Science* 52: 267-273.
389. Guo, S.L.; Chen, M.T. 1991. Studies on the microbial flora of Chinese-style sausage. I. The microbial flora and its biochemical characteristics. *Fleischwirtschaft* 71: 1425-1426.
390. Halász, A.; Barath, A.; Simon-Sarkadi, L.; Holzapfel, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science* 38: 310-312.
391. Hall, R.L.; Merwin, E.J. 1981. The role of flavours. *Food Technology* 35(6): 46-52.
392. Halvarson, H. 1973. Formation of lactic acid, volatile fatty and neutral, volatile monocarbonyl compounds in Swedish fermented sausage. *J. Food Sci.* 38: 310-314.
393. Hamm, R. 1960. Biochemistry of meat hydration. *Adv. Food Res.* 10: 355-463.
394. Hammes, W.P. 1986. Starter kulturen inder Fleischwirtschaft. *Chem Mikrobiol. Thecnol. Lebensmitt.* 9: 131-134.
395. Hammes, W.P.; Hertel, C. 1996. Selection and improvement of lactic acid bacteria used in meat sausage fermentation. *Lait* 76: 159-168
396. Hammes, W.P.; Hertel, C. 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Science*, 49 Supplement 1: S125-S138.

397. Hammes, W.P.; Hertel, C.; Bunte, C. 2001. The use of *Lactobacillus paracasei* as a starter culture with probiotic activity. Proceedings of 47th International Congress of Meat Science and Technology. Kraków, Polónia. Vol.II, p. 4-5.
398. Hammes, W.P.; Rölz, I.; Bantleon, A. 1985. Microbiological examination of starter culture preparation available on the german market for the production of dry sausage. *Fleischwirtsch.* 65: 729-734.
399. Hammes, W.P.A.; Bantleon, A.; Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 87: 165-154.
400. Hammes, W.P.A.; Bosh, I.; Wolf, G., 1995. Contribution of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans* to the fermentation of food proteins. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 79: 76S-83S.
401. Hanington, E. 1983. Migraine. p.155-180. In: Clinical reactions to food. Heinemann Medical Books (eds.), London, Reino Unido.
402. Hardie, J.M. 1986. Genus *Streptococcus*. p.1043-1071. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.), Williams & Wilkins Co. Baltimore, Reino Unido.
403. Harel, S. 1994. Oxidation of ascorbic acid and metal ions as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2402-2406.
404. Harrigan, W.F.; McCance, M.E. 1968. Laboratory methods in microbiology. Academic Press (eds.), New York, USA.
405. Hartmann, T. 1967. Biosynthesis of volatile amines in apples by aldehyde amination. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* 57: 368-375.
406. Hauschild, A.H.W.; Hilsheimer, R.; Jarvis, G.; Raymond, D.P. 1982. Contribution of nitrite to the control of *Clostridium botulinum* in liver sausage. *J. Food Prot.* 45: 500-506.
407. Havel, R.J.; Rapaport, E. 1995. Management of primary hiperlipidemia. *N. Engl. J. Med.* 332: 1491-1498.
408. Hechelman, H.; Kasprowiak, R. 1991. Microbiological criteria for stable products. *Fleischwirtschaft* 71: 1303-1308.
409. Hemme, D.; Bouillanne, C.; Métro, F.; Desmazeaud, N.J.; 1982. Microbial catbolism of aminoacids during cheese ripening. *Sciences des Aliments*. 2: 113-123.
410. Hermele, M.; Jessinger T.; Gschwind P.; Kottke, V.; Fisher, A. 2003. *Fleischwirtsch* 83(11): 74-81.
411. Hermele, M.; Jesinger, T.; Gschwind, P.; Kottke, V.; Fisher, A. 2004. Distribution of relative humidity in dependence of the inlet airflow direction in dry sausege ripening chambers. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
412. Hierro, E.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J. A. 1997. Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the lipolysis of dry fermented sausages. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2889-2894.
413. Hierro, E.; de la Hoz, L.; Ordoñez, J.A. 1999. Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the free amino acid and amine contents of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1156-1161.
414. Hinrichsen, L.L.; Pedersen, S.B. 1995. Relationship among flavour, volatile compounds, chemical changes, and microflora in Italian-type dry-cured ham processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2932-294.
415. Hoffman, H.P.; Scharner, E. 1980. Mikrobiologische und sensorysche untersuchungen zur reifungsdynamik von rohwürsten, ausgereift. 1 Mitt. Veränderung der mikroflora während der reifung. *Die Nahrung* 24(3): 285-293.

416. Högberg, A.; Pickova, J.; Andersson, K.; Lundstron, K. 2003. Fatty acid composition and tocopherol content of muscle in pigs fed organic and conventional feed with different n-6/n-3 ratios, respectively. *Food Chemistry* 80: 177-186.
417. Holley, R.A. 1997. Impact of slicing hygiene upon shelf life and distribution of spoilage bacteria in vacuum packaged cured meat. *Food Microbiology* 14: 201-211.
418. Holzapfel, W.H. 1998. The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. p.35-84. In: *The Microbiology of Meat and Poultry*. A. Davies e R. Board (eds.), Blackie Academic and Professional Press. London, Reino Unido.
419. Hotchkiss, J.H.; Cassens, R.G. 1987. Nitrate, nitrite and nitroso compounds in foods. *Food Technology* 41(4): 127-136.
420. Hotchkiss, J.H.; Scanlan, R.A.; Libbey, R.N. 1977. Formation of bis (hydroxyalkyl)-N-nitrosamines as products of the nitrosation of espermidine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Easton 25(5): 1183-1189.
421. Houtsma, P.C.; Kant-Muermans, M.L. ; Rombouts, F.M. ; Zwietering, M.H. 1996. Model for the combined effects of temperature, pH, and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and Bologna-type sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1616-1622.
422. Hoz, L.; D'Arrigo, M.; Cambero, I.; Ordóñez, J. A. 2004. Development of an n-3 fatty acid and α-tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science* 67: 485-495.
423. Hudson-Arnold, S.; Duane-Brown, W. 1978. Studies on the quality of sausages meat as affected by lactic acid bacterial fermentation. *Food Science* 19: 417-425.
424. Hueppe, F. 1884. Milchsäurebazillus syn. *Bacterium acidi lactic*. *Zopf. Mitt. Kaiserl. Gesundheitsamt.* 2: 337-340.
425. Huerta, T.; Querol, A.; Hernández-Haba, J. 1988b. Yeast of dry cured hams: quantitative and qualitative aspects. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* 6: 227-231.
426. Huerta, T; Hernández, J.; Guamis, B.; Hernández, E. 1988a. Microbiological and physico-chemical aspects in dry salted Spanish ham. *Zentralbl. Mikrobiol.* 143: 475-450.
427. Hugas, M. 1994. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science* 49, Suplemento1: S139-S150.
428. Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science* 49, Suplemento1: S139-S150.
429. Hugas, M.; Garriga, M.; Aymerich, M. T.; Monfort, J. M. 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 322-330.
430. Hugas, M.; Garriga, M.; Aymerich, T.; Monfort, J. M. 1993. Biochemical characterizations of *Lactobacilli* from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiol.* 18: 107-113.
431. Hugas, M.; Garriga, M.; Pascual, M.; Aymerich, M. T.; Monfort, J. M. 2002. Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. *Food Microbiol.* 19: 519-528.
432. Hugas, M.; Neumeyer, B.; Pagés, F.; Garriga, M.; Hammes, W. P. 1997. Comparasion of bacteriocin – Producing *Lactobacilli* on *Listeria* growth in fermented sausages *Fleischwirtschaft Int.* 76: 649-652.
433. Hugas, M.; Roca, M. 1997. Selección de cepas autóctonas de *Staphylococcus* spp. como cultivos iniciadores en embutidos cárnicos. *Rev. Eurocarne* 54: 45-47.
434. Hull, R.R.; Conway, P.L.; Evans, A.J. 1992. Probiotic foods – a new oportunity. *Food Australia*. 44: 112-113.

435. Hultin, H.O. 1980. Enzyme-catalysed lipid oxidation in muscle microsomes. p.505 .In: Autoxidation in Food and Biological Systems. M.G. Simic e M. Karel (eds.), Plenum Press. New York, USA.
436. Ibañez, C.; Quintanilla, L.; Irigoyan, A.; García-Jalón, I.; Cid, C.; Astiasáran, I.; Bello, J. 1995. Partial replacement of sodium chloride with potassium chloride in dry fermented sausages: influence in carbohydrate fermentation and the nitrosation process. Meat Science 40: 45-53.
437. Igene, J.O.; Pearson, A.M. 1979b. Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. Journal of Food Science 44: 1285-1288.
438. Igene, J.O.; Pearson, A.M.; Merkel, R.A.; Coleman, T.H. 1979a. Effect of frozen storage time, cooking and holding temperature upon extractable lipids and TBA values of beef and chicken. Journal of Animal Science 79: 701-707.
439. Igene, J.O.; Yamauchi, K.; Pearson, A.M.; Gray, J.I. 1985. Mechanisms by which nitrite inhibits the development of warmed-over flavour (Wof) in cured. Food Chemistry 18: 1-18.
440. Incze, K. 1987. The technology and microbiology of Hungarian salami. Tradition and current status. Fleischwirtsch. 67: 445-447.
441. Incze, K. 1992. Raw fermented and dried meat products. Fleischwirtsch. 72: 58-62.
442. Incze, K. 2000. Research priorities in fermented and dried meat products. Proceedings of the 46th International Congress of Meat Science and Technology. Buenos Aires, Argentina: 210-215.
443. Infante, F. 1988. Características generales de los mohos. Taxonomía fúngica. p.3-21. In: Mohos en los alimentos. Asociación de Científicos y Tecnólogos de los Alimentos de Andalucía (ACTA-A). Córdoba, Espanha.
444. Ingram, M. 1949. Science in the imported meat industry. II Hygiene and stored. J.R. Sanit. Inst. 69: 35-47.
445. Ingram, M. 1973. Meat chilling the first reason why. p.1-3. In: Meat chilling, why and how. Meat Research Institute. Bristol, Reino Unido.
446. Ingram, M.; Kitchell, A.G. 1967. Salt as a preservative for foods. J. Food Technol. 2: 1-5.
447. Ingram, M.; Simonsen, B. 1980. Meat and Meat Products. In: ICMSF Microbial Ecology of Foods Vol.2 (5). Academic Press (eds.), New York, USA.
448. I.C.M.S.F. (International Commission on the Microbiological Specifications for Foods). 1983. Microorganismos en los alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
449. Itoh, T. 1994. Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. Jpn. J. Dairy Food Science. 43: 7-16.
450. Jacobsen, T.; Hinrichsen, L. 1996. Bioformation of flavour by *Penicillium candidum*, *Penicillium nalgiovense* and *Geotrichum candidum* on glucose, peptone, maize oil and meat extract. Food Chemistry 60: 409-416.
451. Jay, J.M. 1978. Meat, poultry and seafoods. p.155-173. In: Food and Beverage Mycology. L.R. Beuchat. (eds.), AVI Publishing, New York, USA.
452. Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol. 44: 525-531.
453. Jay, J.M. 1996. Modern Food Microbiology. 5^a edição. (eds.). Chapman & Hall (eds.), New York, USA.
454. Jelén, H.; Wasdowicz, E. 1998. Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. Food Reviews International 14: 391-426.
455. Jessen, B. 1998. Starter cultures for meat fermentations. p.130-159. In: Fermented Meats. G. Campbell-Platt e P.E. Cook (eds.). Blackie Academic and Professional, Glasgow, Reino Unido.

456. Jóciles, A.; Herrero, H.; Larriba, G. 1983. Evolution de la flora microbiana durante la maduración del jamón Ibérico. IX Congr. Microbiol. Vol.I: 469-472.
457. Joerger, M.C.; Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. Journal of Bacteriology 167: 439-446
458. Johansson, G.; Berdaagué, J.L.; Larsson, M.; Tran, N.; Borch, E. 1994. Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentasaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. Rev. Meat Science 38: 203-218.
459. Jones, B.; Nilsson, T.; Ekman, L.; Östlund, K. 1979a. The contamination of pig carcasses with scalding water studied with a radiolabelled colloid. Fleischwirtsch 59: 1511-1513.
460. Jones, B.; Nilsson, T.; Sörquist, S. 1979b. Contamination of pig carcasses with scalding water. Continue studies with radiolabelled solutes and particles. Fleischwirtsch 64: 1226-1228.
461. Jones, D. 1988. Composition and properties of the family Enterobacteriaceae. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 1S-19S.
462. Jouve, J.L.; Carlier, V.; Rosier, J. 1980. Les effets antimicrobiens des nitrites dans les produits carnés. Ann. Nutr. Alim. 34: 807-826.
463. Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 49: 209-224.
464. Kandler, O.; Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. p.1208-1234. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.), Williams & Wilkins Co., Baltimore, Reino Unido.
465. Kang, C.K.; Donnelly, T.H.; Jodlowski, R.F.; Warner, W.D. 1981. Partial purification and characterization of a neural protease from bovine skeletal muscle. Journal of Food Science 46: 702-704, 707.
466. Kanner, J.; Ben-Gera, I.; Berman, S. 1980. Nitric-oxide myoglobin as an inhibitor of lipid oxidation. Lipids 51(11): 944-948.
467. Karaioannoglou, P.G.; Mantis, A.J.; Panetsos, A.G. 1977. The effect of garlic extract on lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*) in cultura media. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 10: 148-150.
468. Kato, H.; Rhue, M.R.; Nishimura, T. 1989. Role of free amino acids and peptides in food taste. Proceedings of the 195th National Meeting of the American Chemical Society. Toronto, Canadá. p.158-174.
469. Katsaras, K.; Budras, K.D. 1992. Microstructure of fermented sausage. Meat Science 31:121-126.
470. Kenneally, P.M.; Schwartz, G.; Fransen, N.G.; Arendt, E.K. 1998. Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages. Journal of Food Science 63: 538-543.
471. Kenney, P.B.; Hunt, M.C. 1990. Effect of water and salt content on protein solubility and water retention of meat preblends. Meat Science 27: 173-177.
472. Khayat, A.; Schwall, D. 1983. Lipid oxidation in seafood. Food Technol. 37: 130-133.
473. Kilara, A. 1985. Enzyme-modified lipid food ingredients. Process Biochemistry. April: 35-38.
474. King, A.D.; Nagel, C.W. 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Food Science 40: 362-366.
475. Kirimura, J.; Shimizu, A.; Kimizuka, A.; Ninomiya, T.; Katsuya, N. 1969. The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. Journal of Agricultural and Food Chemistry 17: 689-695.

476. Klement, J.T.; Cassens, R.G.; Fennema, O.R. 1973. The association of protein solubility with physical properties in a fermented sausage. *Journal Food Science* 38: 1128-1131.
477. Klement, J.T.; Cassens, R.G., Fennema, O.R. 1974. The effect of bacterial fermentation on the protein solubility in a sausage model system. *Journal of Food Science* 39: 833-835.
478. Klettner, P.G. 1980. Evolution de la consistance du saucisson sec au cours de la maturation. *Die Fleischerei*. V: 10-80.
479. Klettner, P.G.; Rödel, W. 1978. Testing and controlling parameters important to dry sausage ripening. *Fleischwirtschaft* 58: 57, 63, 66, 74.
480. Klettner, P.G.; List, D. 1980. Effect of type of carbohydrate on course of dry sausage ripening. *Fleischwirtschaft* 60: 1589-1590, 1592-1593.
481. Klettner, P.G.; Rödel, W. 1980. Beitrag zum einflub des speckanteils auf die rohwurstreifung. *Fleischerei*. 31: 1101-1103.
482. Klima, B. 1997. Do período do *Homo sapiens* aos primórdios da produção de alimentos. Visão geral. In: UNESCO – História da Humanidade. Verbo (eds.), Lisboa.
483. Kloos W.E.; Tornabene, T.G.; Schleifer, K.H. 1974. Isolation and characterization of *Micrococcaceae* from human skin including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *Int. J. Syst. Bact.* 24: 79-101.
484. Kloos, W.E.; Schleifer, K.H. 1986. Genus IV *Staphylococcus*. p.1013-1035. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2, Sec.12:. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.), Williams & Wilkins Co. Baltimore, Reino Unido.
485. Knight, P.; Parsons, N. 1988. Action of NaCl and polyphosphates in meat processing: responses of myofibrils to concentrate salt solutions. *Meat Science* 24: 275-279.
486. Kocur, M. 1986. Gram-positive cocci family I. *Micrococcaceae*. Genus I: *Micrococcus*. p.1004-1007. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2. Sec.12. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J. G. Holt (eds.), Williams & Wilkins Co. Baltimore, Reino Unido.
487. Koehler, P.E; Eitenmiler, R.R. 1978. High pressure liquid chromatographic analysis of tyramine, phenylethylamine and tryptamine in sausage, cheese and chocolate. *Journal of Food Science* 43: 1245-1247.
488. Kraft, A.A., Rey, C.R. 1979. Psychrotrophic bacteria in foods: an update. *Food Technology* 33: 66-71.
489. Kramlich, W.E.; Pearson, A.M.; Tauber, F.W. 1973. Processed Meats. AVI Publishing Co (eds.), Westport. USA
490. Kröckel, L. 1995. Bacterial fermentation of meats. p.69-98. In: Fermented Meats. G. Campbell-Platt e P.E. Cook (eds.), Blackie Academic and Professional, Suffolk, Reino Unido.
491. Kröckel, L. 2004. Influence of fermentation on creatine and lactate concentration in white efflorescences on dry fermented sausage. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
492. Kubícková, J.; Grosch, W. 1998a. Evaluation of flavour compounds of Camembert cheese. *International Dairy Journal* 8: 11-16.
493. Kubícková, J.; Grosch, W. 1998b. Quantification of potent odorants in Camembert cheese and calculation of their odour acidity values. *International Dairy Journal* 8: 17-23.
494. Kuchling, E. 1965. Beobachtungen über beziehungen zwischen redoxpotential und farbhaltung bei der rowhurstreifung. Proc. 11st Conf. Eur. Meat Meet. Res. Work. Belgrado. I p.11.
495. Kunz, B. 1984. Cultivo de microorganismos para la produccón de alimentos. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.

496. Kwoh, T.L. 1971. Catalysis of lipid peroxidation in meats. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 48: 550-555.
497. Kyung, K.; Park, K.S.; Kim, Y.S. 1996. Isolation and characterization of bacteria resistant to the antimicrobial activity of garlic. *J. Food Sci.* 61: 226-229.
498. Labie, C.H. 1987. Les contaminants des boyaux naturels. *Viande et Produits Carnés*, Vol.8(2): 73-79.
499. Labuza, T.P. 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* 2: 355-405.
500. Lago, J.L.V. 1997. Tecnología de los embutidos curados. *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol.1(5): 129-133.
501. Landvogt, A.; Fischer, A. 1991. Dry sausage ripening. Targeted control of the acidification achieved by starter cultures. *Fleischwirtschaft* 71: 902-905.
502. Langner, H.J. 1972. Aroma substances in dry sausages. *Fleischwirtsch.* 52: 1299-1302.
503. Larpent-Gourgaud, M.; Michaux, O.O.; Callon, C.; Brenot, O.; Sirami, J.; Bonnin, C.; Boisonnet, B. 1993. Comparative study of the flavour-forming microflora of industrially or manually manufactured sausages. *Viandes et Produits Carnes* 14: 23-27
504. Larsen, T.O. 1999. Volatile flavour compounds by *Penicillium caseifulvum*. *International Dairy Journal* 8: 883-887.
505. Larsen, T.O.; Frisvad, J.C. 1995. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Microbiological Research* 99: 1153-1166.
506. Law, B.A. 1980. Microorganisms and their enzymes in the maturation of cheeses. *Progr. In Ind. Microbiol.* 19: 245-250.
507. Law, B.A.; Kolstad, J. 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoeek.* 49: 225-259.
508. Lawrie, R.A. 1977. Meat Science. Pergamon Press (eds.), New York, USA.
509. Lawrie, R.A. 1985. Chemical and biochemical constitution of muscle. p.43-56. In: *Meat Science*. M.C. Robert Maxwell (eds.), Oxford, Reino Unido.
510. Leal, M.; González de Mejía, E. 1997. Toxicological and nutritional implications of T-2 toxin. *Food Sci. Technol. Int.* 3: 241-244.
511. Lee, Y.; Howard, L.R.; Villalón, B. 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annum*) cultivars. *Journal of Food Science* 60: 473-476.
512. Lee, Y.B.; Kauffman, R.G. 1974. Cellularity and lipogenic enzyme activities of porcine intramuscular adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 38: 532-537.
513. Lehninguer, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. 1993. Principios de Bioquímica. Omega (eds.), Barcelona, Espanha.
514. Leistner, L. 1984. Notions générales sur bactéries. *Die Fleischerei* IV: 1-84.
515. Leistner, L. 1986a. Nitrite (nitrite curing salt) and meat products- Situation in west Germany. *Die Fleischerei. Industrieausgabe Englisch* 37 (4): 11-13.
516. Leistner, L. 1986b. Algemeines über rohwurst. *Fleischwirtsch* 66 (3): 290-300
517. Leistner, L. 1986c. Mould-ripened foods. *Fleischwirtschaft* 66: 1385-1388.
518. Leistner, L. 1987. Review: perspectives of fermented meats. *Proceedings of 32nd International Congress of Meat Science and Technology*, Helsinki, Finlandia.2 p.323-326.
519. Leistner, L. 1990. Mould-fermented foods: recent development. *Food Biotechnology* 4: 433-441.
520. Leistner, L.; Ayres, J. C. 1968. Molds and meats. *Die Fleischwirtschaft*. 1: 62-64.

521. Leistner, L.; Eckart, C. 1979. Occurrence of toxigenic Penicillia in meat products. *Fleischwirtsch.* 59: 1892-1896.
522. Leistner, L.; Ayres, J.C.; Lillard D.A. 1965. Occurrence and significance of fungi in cured meat. Proceedings of the 4th Symposium of the World Association of Veterinary Food-Hygienists, Lincoln, USA. p. 262-268.
523. Leistner, L.; Rödel, W. 1976. The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms. *Water Relations of Foods:* 309-323.
524. Lemay, M.J.; Rodrigue, N.; Gariépy, C.; Saucier, L. 2000. Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stresses. *International Journal of Food Microbiology.* 55: 249-253.
525. León Crespo, L.; Millán, R.; Serrano, A. 1978. Características del salchichón tipo "casero". *Alimentaria* 98: 29-34.
526. León, F. 1992. Factores que determinan la calidad de la canal del cerdo Ibérico. *Jornadas sobre Tecnología de Valoración de Canales y Carnes y Defensa de la Calidad de los Productos Ganaderos.* Zafra, Espanha.
527. Leroy, F.; Verluyten, J.; Messens, W.; Vuyst, L. 2001. The success of using bacteriocin-producing starter cultures for sausage fermentation is strongly strain dependent. *Proceedings of 47th International Congress of Meat Science and Technology.* Kraków, Polónia. Vol.II, p.2-3.
528. Leseigneur-Meynier, A.; Gandemer, G. 1991. Lipid composition of pork muscle in relation to the metabolic type of the fibres. *Meat Science* 29: 229-241.
529. Leuschner, R.G.K.; Hammes, W.P. 1998. Tyramine degradation by *micrococci* during ripening of fermented sausage. *Meat Science* 49: 289-296.
530. Liepe, H.U. 1985. Starter cultures in meat production *Food and Feed Production with Microrganisms.* p.399-424. In: *Biothechnology.* Vol.5, G. Reed (eds.), Verlag Chemie, Weinheim.
531. Liepe, H.U. 1986. Using a new *Lactobacilli* starter culture in dry sausage technology. *Fleischwirtschaft* 66(6): 1027-1028.
532. Liepe, H.U. 1987. Keimverteilung in einer Rohwurst. *Fleischwirtsch. español* 1: 32-36.
533. Lightfoot, N.F.; Maier, E.A. 2003. Análise Microbiológica de alimentos e água. Fundação Calouste Gulbenkian (eds.), Lisboa.
534. Lindgren, S.E.; Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 7: 149-163.
535. Little, C.L.; Monsey, H.A.; Nichols, G.L.; Louvois, J. 1998. The microbiological quality of ready-to-eat dried and fermented meat and meat products. *International Journal of Environmental Health Research* 8: 277-284.
536. Lizaso, G.; Chasco, J.; Beriain, M. J. 1999. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, and Spanish dry cured sausage. *Food Microbiology* 16: 219-228.
537. Llewellyn, G.C.; Mooney, R.L.; Cheattle, T.F.; Flannigan, B. 1992. Mycotoxin contamination of spices - An update. *International Biodeterioration and Biodegradation* 29: 111-121.
538. Lois, A.L.; Gutiérrez, M.L.; Zumalacárregui, J.M.; López, A. 1987. Changes in several constituents during the ripening of 'Chorizo' – a Spanish dry sausage. *Meat Science* 19: 169-177.
539. López, R.C.; Nieto, A.I.A. 2001. Clasificación de canales. Sistemas de clasificación. Métodos para evaluar la calidad de la canal. Vol I, p.258-269. In: *Encyclopédia de la carne y de los productos cárnicos.* Martín e Macias (eds.), Plasencia, Espanha.
540. López, V.M.T. 1997. Acción da la flora fúngica durante la maduración de los embutidos. Dissertação para obtenção do grau de doutor en Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidad Complutense de Madrid.

541. López-Bote, C.; Antequera, T.; Córdoba, J.J.; García, C.; Asensio, M.A.; Ventanas, J. 1990. Proteolytic and lipolytic breakdown during the ripening of Iberian hams. Proc. 36th Int Congr. Meat Sci. Technol. Havana, Cuba. p. 883-887.
542. López-Díaz, T.M. 1993. Estudio microbiológico y físico-químico del queso de Valdeón (León) para su tipificación y posible industrialización. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Faculdade de Veterinária, Universidade de León.
543. López-Lorenzo, P.; Burgos, J.; Sanz, B. 1962. Comportamiento de la flora bacteriana durante la maduración de los embutidos. An. Fac. Vet. León. 8: 99
544. Lotzsch, R.; Rödel, W. 1974. Investigations into the viability of *Trichinella spiralis* in dry sausages as a function of water activity. Fleischwirtsch 54: 1203-1208.
545. Love, J.D. 1983. The role of heme iron in the oxidation of lipids in red meats. Food Technology 7: 117-120.
546. Lu, J.; Townsend, W.E. 1973. Feasibility of adding freeze-dried meat in the preparation of fermented dry sausage. J. Food Sci. 38: 837-841.
547. Lücke, F.K. 1984. Fermented sausages. p.41-49. In: Microbiology of Food Fermentation. Vol.2. B.J.B (eds.), Applied Science Publishers. London, Reino Unido.
548. Lücke, F.K. 1985. The microbiology of fermented meats. Journal Science Food Agric. 36: 1342-1343.
549. Lücke, F.K. 1986. Microbiological process in the manufacture of dry sausage and raw ham. Fleischwirtschaft 66(10): 1505-1509.
550. Lücke, F.K. 1998. Fermented sausages. p.441-483. In: Microbiology of Food Fermentation. Vol.2. B.J.B (eds.), Wood. Applied Science Publishers, London.
551. Lücke, F.K.; Hechelmann, H. 1987. Starter cultures for dry sausages and raw ham. Fleischwirtsch 67(3): 307-314. Atenção que estava Hechelman
552. Lücke, F.K., 1987. Procesos microbiológicos en la elaboración de embutidos secos y jamones crudos. Fleischwirtsch. Español. 2: 39-43.
553. Lücke, F.K.;Hechelman, H. 1988. Cultivos starter para embutidos seco y jamón crudo. Composición y efecto. Fleischwirtsch. español. 1: 38-42.
554. Mac Donald, B.; Gray, J.I.; Gibbins, L.N. 1980. The role of nitrite in cured meat flavor: antioxidant role of nitrite. J. Food Sci. 45: 889-892.
555. Mackey, B.M.; Derrik, C. H. 1979. Contamination of the deep tissues of carcasses by bacteria present on the slaughter instruments or in the gut. J. Appl. Bacteriol. 46: 355-366.
556. MacLeod, A.J. 1994. The flavour of beef. p.4-37. In: Flavor of Meat and Meat Products. F. Shahidi (eds.), Blackie Academic and Professional. Glasgow, Reino Unido.
557. Maga, J.A. 1994. Umami flavor of meat. p.98-115. In: Flavor of Meat and Meat Products. F. Shahidi (eds.), Blackie Academic and Professional. Gasgow, Reino Unido.
558. Magee, P.N. 1996. Nitrosamines and human cancer: introduction and overview. European Journal of Cancer Prevention 5: 7-10.
559. Maier, H.G. 1970. Volatile flavoring substances in foodstuffs. Angew. Chem. 9: 917-923.
560. Maijala, R.; Nurmi, E.; Fisher, A. 1995. Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. Meat Science 39: 9-22.
561. Malagón, C.P. 1988. Maduración del jamón de cerdo ibérico (jabugo): fenómenos proteolíticos. Dissertação para obtenção do título de Doutor. Universidade de León.
562. Mano, S.B. 1997. Comportamiento de la microbiota natural y *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolita* en carne envasada en atmosferas modificadas.

- Dissertação para obtenção do título de Doutor em Veterinária. Universidad Computense de Madrid.
563. Marquina, P.; Beltrán, J.A.; Jaime, I.; Roncalés, P. 1993. Caracterización y diferenciación fisico-química de los tipos comerciales de la longaniza de Aragón. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment. 33: 631-635.
564. Martín, A. 1999. Contribución de la población fúngica seleccionada al desarrollo de características deseables del jamón curado. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Veterinária. Universidade da Extremadura.
565. Martín, A.; Córdoba, J.J.; Rodríguez, M.M.; Núñez, F.; Ascencio, M.A. 2001. Evaluation of microbial proteolysis in meat products by capillary electrophoresis. Journal of Applied Microbiology 90(2): 163-171.
566. Martin, M. 1975. Technologie du saucisson sec: contribuition a l'étude des phénomènes physico-chimiques. Dissertação para obtenção do título de Doutor. Universidade Paul Sébatier, Toulouse.
567. Martin Peña, G.; Bujarabal, M.C.; Galiana, J.R. 1992. El cerdo Ibérico: un animal con grasa de alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados. Nutr. Hospitalaria 7: 329-322.
568. Martín, R.; Hernández, P.E.; Sanz, B. 1990. Intoxicaciones alimentarias de origen fúngico: Micotoxicosis. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. 30: 315-320.
569. Martinez, O.; Salmeron, J.; Guillén, M.D.; Casas, C. 2004. Texture profile analysis of meat products treated with commercial liquid smoke flavourings. Food Control 15: 457-461.
570. Martley, F.G.; Jayashankar, S.E.; Lawrence, R.C. 1970. An improved agar médium for the detection and enumeration of proteolytic organisms in total bacterial counts. J. Appl. Bacteriol. 33: 363-370.
571. Martuscelli, M.; Crudele, M.A.; Gardini, F.; Suzzi, G. 2000. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* starins from artisanal fermented sausages. Letters in Applied Microbiology 31: 228-232.
572. Masson, F.; Hinrichsen, L.; Talon, R.; Montel, M.C. 1999. Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*. International Journal of Food Microbiology 49: 173-178.
573. Masson; F. 1998. Catbolisme des acides aminés par les fermentes bacterienes du saucisson. . Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Universidade Blaise Pascal. Clermont Ferrand, França.
574. Mataix, F.J.; Martinez, V.E. 1988. El aceite de oliva. Bases para el futuro. Diputación Provincial de Jaén (eds.), Espanha.
575. Mataragas, M.; Drosinos, E.H.; Metaxopoulos. 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured porck shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2 °C. Food Microbiology 20: 259-265.
576. Mateo, J.; Aguirrezábal, M. Dominguez, C.; Zumalacárregui, J.M. 1997. Volatile compounds in Spanish paprika. Journal of Food Composition and Analysis 10: 225-232.
577. Mc Dougall D.B.; Mottram, D.S.; Rhodes, D.N. 1975. Contribuition of nitrite and nitrate to the colour and flavour of cured meats. Journal of Science and Food Agriculture 26: 1734-1754.
578. McMeekin, T.A. 1982. Microbiqal spoilage of meats. p.1-40. In: Developments in Food Microbiology. Vol.1, R. Davies (eds.), Applied Science Publishers. London, Reino Unido.
579. Mead, G.C.; Hinton, M.H.; Rowlings, C.; Fries, R.; Hildebrandt, A.G.; Humphrey, T.J.; Nesbakken, T.; Mulder, R.W.; Schott, W.; Skovgaard, N. 1996. Microbial control in the meat industry. 7. Bacterial pathogens on raw meat and their properties. University of Bristol Press, Concerted Action CT94-1456. pp: 5-28.

580. Melgar, J.; Cid., C.; Astasarán, I.;Bello, J. 1993. Influencia de la alimentacion del cerdo ibérico en las características de los compuestos relacionados com la grasa del jamón curado. Carnica 2000 111: 44-48.
581. Melgar, M.J.; Beriain, M.J.; Bello, J. 1990. Estudio de las modificaciones de las características químicas de los lípidos neutros del salami durante el proceso de curación. Rev. Agroquím. Tecnol. Alim. 30: 363-371.
582. Melo, R.S.; Palminha, M.; Cruz, I.V.; Morgado, R. 1986. Preservation of the Portuguese "chouriço". Chemical and microbial evolution related to packing and storage time and temperature. Proc. 32nd Europ. Meet. Meat Res. Work. Ghent, Belgica. 4:13,217-220.
583. Mendoza, S.; Flores, J.; Silla, H. 1983. Influencia de la temperatura de estufado sobre las características microbiológicas y químicas del chorizo. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 23 (1): 86-89.
584. Merino, F.L.; bejarano, S.M. 2001. La nueva carnicería-charcutería. Vol I, p.777-859. In: Enciclopédia de la carne y de los productos cárnicos. Martín e Macias (eds.), Plasencia, Espanha.
585. Messi, P.; Bondi, M.; Sabia, C.; Battini, R.; Manicarde, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. International Journal of Food Microbiology 64: 193-198.
586. Meynier, A.; Novelli, E.; Chizzolini, R.; Znardi, E.; Gandemer, G. 1999. Volatile compounds of commercial Milano salami. Meat Science 51: 175-183.
587. Migaud, M.; Frenz, J. C. 1978. La charcuterie crue et les produits saumurés. Soussana S. A. (eds.), France.
588. Miralles, M.C.; Flores, J.; Perez-Martinez, G. 1996. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. Food Microbiol. 13: 227-236.
589. Miranda do Vale, J. 1949. Gado bissulco.p.35-69. Coleção A Terra e o Homem. Vol.17. Livraria Sá da Costa (eds.), Lisboa.
590. Mitchell, J.M.; Griffiths, M.W.; McEven, S.A.; McNab, W.B.; Yee, A.J. 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. Journal of Food Protection 61: 742-756.
591. Miteva, E.; Kirova, E.; Gadjeva, D.; Radeva, M. 1986. Sensory aroma and taste profiles and raw-dried sausages manufactured with a lipolytically active yeast culture. Nahrung 30: 829-832.
592. Moat, A.G.; Foster, J.W. 1988. Microbial Physiology. John Wiley & Sons. New York, USA.
593. Mohino, M. 1986. Caracterización de bacterias lipolíticas aisladas de alimentos y determinación de sua actividad lipásica exocelular y endocelular. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas. Universidade Complutense de Madrid.
594. Möhler, K. 1980. El ahumado. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
595. Möhler, K. 1984. El curado. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
596. Molimard, P.; Spinnler, H.E. 1996. Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. Journal of Dairy Science 79: 169-184.
597. Molina, I.; Flores, J.; Silla, H.; Bermell, S. 1991. Study of the microbial flora in dry-cured ham. Fleischwirtsch 71 (8): 906-908.
598. Møller, J.K.S.; Hinrichsen, L.L.; Anderson, H.J. 1998. Formation of amino acid (L-leucine, L-phenylalanine) derived volatile flavour compounds by *Moraxella phenylpyruvica* and *Staphylococcus xylosus* in cured meat model systems. International Journal of Food Microbiology 42: 101-117.
599. Møller, J.K.S.; Jansen, J.S.; Knøchel, S.; Skibsted, L.H. 2000. Formation of cured meat colour in meat model systems and fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* strains

- (JCM1173 & FO3956). Proceedings of 46th International Congress of Meat Science and Technology. Buenos Aires, Argentina. Vol. I p.226-227.
600. Molly, K.; Demeyer, D.; Civera, T.; Verplaetse, A. 1996. Lipolysis in a Belgian sausage: relative importance of endogenous and bacterial enzymes. *Meat Sci.* 43: 235-240.
601. Molly, K.; Demeyer, D.; Johansson, G.; Raemaekers, M.; Ghistelinck, M.; Geenen, I. 1997. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of an European project. *Food Chemistry* 59: 539-545.
602. Monfort, J.M. 1989. Influencia de la calidad de la carne en el jamón curado. *Cárnia* 2000 72: 37-42.
603. Montel, M. C.; Masson, F.; Talon, R. 1998. Bacterial role in flavour development. Proceedings of 44th International Congress of Meat Science and Technology. Barcelona. *Meat Science* 49, Supplement 1: S111-S124
604. Montel, M. C.; Talon, R.; Berdagué, J.L.; Cantonnet, M. 1993. Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of french dry sausages. *Meat Science* 35: 229-240.
605. Montel, M.C.; Reitz, J.; Talon, R.; Berdagué, J.L.; Rousset-Akrim, S. 1996. Biochemical activities of *Micrococcaceae* and the effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology* 13: 489-499.
606. Montel, M.C.; Séronie, M.P.; Talon, R.; Hébraud, M. 1995. Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus sake*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 837-839
607. Montel, M.C.; Talon, R.; Cantonnet, M.; Cayrol, J. 1992. Peptidasic activities of starter cultures. Proc 38th Int. Congr. Meat Sci. Technol. Clermont-Ferrand, France. p.811-814.
608. Montel, M.C.; Talon, R.; Champomier, M.C. 1989. Identification of some lactic acid bacteria from meat. Proceedings of 35th International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen, Dinamarca. II p.299-301.
609. Montilla, R.D. 1953. Ganado porcino. Salvat Editores S.A (eds.), Madrid, Espanha.
610. Moon, N.J. 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*. 55: 453-460.
611. Moreau, C. 1979. Moisissures toxiques dans l'alimentation. Masson et Cie (eds.) Paris.
612. Morgado, R. 1983. Tripas naturais e sintéticas. Problemática da sua utilização em salsicharia. 1º Congresso Nacional das Indústrias Agro-alimentares. D.T.I.A. Nº22. L.N.E.T.I. Lisboa.
613. Morioka, Y.; Nohara, H.; Araki, M.; Suzuki, M.; Numata, M. 1996. Studies on the fermentation of soft salami sausage by starter cultures. *Animal Science and Thechnology* 67: 204-210.
614. Morishita, Y.; Shiromizu, K. 1986. Characterization of *Lactobacilli* isolated from meats and meat products. *International Journal of Microbiology* 3: 19-29.
615. Morrissey, P.A.; Sheehy, P.J.A.; Galvin,K.; Kerry, J.; Buckley, D.J. 1998. Lipid stability in meat and meat products. Proceedings 44th International Congress of Meat Science and Thechnology. p. 120-131.
616. Morrissey, P.A.; Tchivangana, J.Z. 1985. The antioxidant activities of nitrite and nitrosyl-myoglobin in cooked meat. *Meat Science* 14: 175-190.
617. Motilva, M.J.; Díaz, M.A.; Vila, R. 1991. Fungal flora present on the surface of cured Spanish ham. Methodological study for its isolation and identification. *Fleischwirtsch.* 71: 1300-1308.
618. Motilva, M.J.; Toldrá, F.; Aristoy, M.C.; Flores, J. 1993. Subcutaneous adipose tissue lipolysis in the processing of dry-cured ham. *J. Food Biochem.* 16: 323-335.
619. Mottram, D.S.; Croft, S.E.; Patterson, R.L.S. 1984. Volatile components of cured and uncured pork: the role of nitrite and the formation of nitrogen compounds. *J. Sci. Food Agric.* 35: 233-239.

620. Mourey, A.; Kilbertus, G. 1976. Simple media containing stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in food and soils. *J. Appl. Bacteriol.* 40: 47-50.
621. Mourot, J.; Peiniau, P.; Mounier, A. 1994. Effects de l'acide linoléique alimentaire sur l'activité des enzymes de la lipogenèse dans les tissus adipeux chez le porc. *Reprod. Nutr. Dev.* 34: 213-220.
622. Muguerza, E.; Ansorena, D.; Astiasarán, I. 2003. Improvement of nutritional properties of chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Science* 65: 1361-1367.
623. Muguerza, E.; Gimeno, O.; Ansorena, D.; Astiasarán, I. 2004. New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier Applied Science Publishers (eds.), London, Reino Unido.
624. Mundt, J.O. 1986. *Enterococci* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.), Williams & Wilkins Co. Baltimore, Reino Unido.
625. Næs, H.; Pederson, B.O.; Holck, A.L.; Axelsson, L.; Holten, V.; Blom, H. 1992. Fermentation of dry sausage. The effect of added proteinase and lipase from *Lactobacilli*. *Proc. 38th Int Congr. Meat Sci. Technol.* Clermont-Ferrand, France. p.815-818.
626. Nagy, A.; Mihályi, V.; Incze, K. 1989. Ripening and storage of Hungarian salami. Chemical and organoleptic changes. *Fleischwirtsch.* 69: 587-588.
627. Natividade, J.V. 1950. Subericultura. Ministério da Agricultura Pescas e Alimentação (eds.), Direcção Geral de Florestas. Lisboa
628. Nawar, W.W. 2000. Lipídos. p. 269-381. In: *Química de los Alimentos..* O.R. Fennema (eds.), Acribia. Zaragoza, Espanha.
629. Neves, J.; Freitas, A.; Eusébio, I.; Martins, J. M.; Nunes, J. 2004. Chemical and physical characteristics of fresh subcutaneous fat from Alentejano pig breed. *Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology*. Helsinki, Finlandia.
630. Neves, J.A.F.M. 1998. Influência da engorda em montanheira sobre as características bioquímicas e tecnológicas da matéria-prima e do presunto curado de porco Alentejano. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Agrárias. Universidade de Évora.
631. Newbold, R.P.; Scopes, R.K. 1971. Post-mortem glycolysis on skeletal muscle: effect of adding nicotinamide-adenine dinucleotide to diluted minced preparations. *J. Food Sci.* 36: 215-218.
632. Nielsen, H.J.S.; Kemner, M.K.B. 1989. Lipolytic activity of meat starter cultures. *Proc. 35th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Copenhagen, Dinamarca. p.318-322.
633. Nieto, P.; Molina, I.; Flores, J.; Silla, M.H.; Bermell, S. 1989. Lipolytic activity of microorganisms isolated from dry-cured ham. *Proc. 35th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Copenhagen, Dinamarca. p.323-329.
634. Niinivaara, F.P.; Pohja, M.S.; Komulainen, S.E. 1964. Some aspects about using bacterial puré cultures in the manufacture of fermented sausages. *Food Technol.* 18: 25-28.
635. Niinivaara, F.P.; Antila, P. 1973. El valor nutritivo de la carne. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
636. Nishimura, T.; Kato, H. 1988. Taste of free amino acids and peptides. *Food Reviews International* 4:175-194.
637. Nissen, H.; Holck, A. 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiology* 15: 273-279.
638. Nordal, J.; Slinde, E. 1980. Characteristics of some acid bacteria used as starter cultures in dry sausages production. *Applied and Environmental Microbiology* 40(3): 472-475.

639. Nordin, H.R.; Burke, T.; Webb, G.; Rubin, I.J.; Van Binnendyck, D. 1975. Effect of pH, salt and nitrite in heat processed meat on destruction and out-growth of P.A.3679. *Can. Inst. Food Science. Technology Journal* 8: 58-66.
640. Norma Portuguesa NP – 1224. 1982. Carnes, derivados e produtos cárneos Determinação do teor de matéria gorda livre. Lisboa.
641. Norma Portuguesa NP – 1422. 1979. Géneros Alimentícios derivados de frutas e de produtos hortícolas. Determinação do teor de cloretos. Processo de referência. Lisboa
642. Norma Portuguesa NP – 1612. 1979. Carnes, derivados e produtos cárneos Determinação do teor de azoto total. Método de referência. Lisboa.
643. Norma Portuguesa NP – 1614. 1979. Carnes, derivados e produtos cárneos Determinação da humidade. Processo de referência. Lisboa.
644. Norma Portuguesa NP – 1615. 1979. Carnes, derivados e produtos cárneos Determinação da cinza total. Lisboa.
645. Norma Portuguesa NP – 1736. 1986. Géneros alimentares e aditivos admissíveis. Lisboa.
646. Norma Portuguesa NP – 1829. 1982. Microbiologia Alimentar. Preparação de amostras para análise microbiológica. Lisboa
647. Norma Portuguesa NP–1845. 1982. Carnes, derivados e produtos cárneos Determinação do teor de cloretos, processo de referência. Lisboa.
648. Norma Portuguesa NP–1848. 1987. Carnes, derivados e produtos cárneos Determinação do teor de azoto básico volátil, método das células de Conway. Lisboa.
649. Norma Portuguesa NP–1995. 1982. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de microrganismos a 30°C. Lisboa.
650. Norma Portuguesa NP–2077. 1985. Microbiologia alimentar. Carnes e produtos cárneos. Contagem de bolores e leveduras. Lisboa.
651. Norma Portuguesa NP–2164. 1983. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a pesquisa de bactérias coliformes. Lisboa.
652. Norma Portuguesa NP–2262. 1986. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores. Lisboa.
653. Norma Portuguesa NP–2307. 1987. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a pesquisa de microrganismos psicrotróficos. Lisboa.
654. Norma Portuguesa NP–2308.1986. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a pesquisa de Escherichia coli. Lisboa.
655. Norma Portuguesa NP–3005.1985. Microbiologia alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica. Lisboa.
656. Norma Portuguesa NP–3441. 1990. Carnes, derivados e produtos cárneos Determinação do pH. Processo de referência. Lisboa.
657. Nottingham, P.M. 1982. Microbiology of carcass meats. p.13-65. In: *Meat Microbiology*. Capítulo 2.. M. H. Brown (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, London, Reino Unido.
658. Novel, G. 1993. Les bactéries lactiques. *Microbiologie Industrielle (Les micro-organismes d'intérêt industriel)*. Collection Science et Technique Agro-alimentaires. Lavoisier (eds.), Paris, França.
659. Novelli, E.; Zanardi, E.; Ghiretti, G.P.; Campanini, G.; Dazzi, G.; Madarena, G.; Chizzolini. 1998. Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadella. *Meat Science* 48: 29-40.
660. Nunes, J.L.T. 1992. A raça suína Alentejana. Simpósio del cerdo Ibérico. Zafra, Espanha. p.153-165.

661. Nunes, J.L.T. 1993. Contributo para a reintegração do porco Alentejano no montado. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Agrárias. Universidade de Évora.
662. Nuñez, F.; Rodriguez, M.; Aranda, E.; Martín, A.; Díaz, M.C.; Bermúdez, E. 1998. Influencia de la población fúngica en la maduración del jamón. Eurocarne 70: 39-48.
663. Nuñez, F. 1995. Flora fúngica en jamón ibérico y su importânciâ tecnológica y sanitária. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Veterinária, Universidade da Extremadura, Cáceres.
664. Nurmi, E. 1966. Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dried sausage. Acta Agr. Fenn. 108: 1-77.
665. Nychas, G.J.E.; Arkoudelos, J.S. 1990. *Staphylococci*: their role in fermented sausages. Journal of Applied Bacteriology Symposium Suplemento 19: 167S-188S.
666. O'Boyle, A.R.; Aladin-Kassam, N.; Rubin, L.J.; Diosady, L.L. 1992. Encapsulated cured-meat pigment and its application in nitrite-free ham. Journal of Food Science 57: 807-812.
667. Obadia, P. 1993. Produtos alimentares. In: Enciclopédia visual e temática. Larousse (eds.), Lisboa
668. Obradovic, D.; Kavoski, D.; Zerecki, Z.; Perunovic, M.; Radovanovic, R.; Popovic, J. 1989. Effect of *micococci* and *lactobacilli* on the production of dry sausages. Proc. 35th International Congress of Meat Science and Technology. Copenhagen, Dinamarca. II: p.313-317.
669. Ockerman, H.W.; Hansen, C.L. 1996. Industrialización de subproductos de origen animal. (eds.). Acribia. Zaragoza, Espanha.
670. Offer, G. 1984. Progress in the biochemistry, physiology and structure of meat. Proc. 30th Eur. Meet. Meat Res. Work. Bristol, Reino Unido. p.87-92.
671. Ojeda, M.; Bárcenas, P.; Pérez-Elortondo, F.J.; Albisu, M.; Guillén, M.D. Chemical references in sensory analysis of smoke flavourings. Food Chemistry. 78(4): 433-442.
672. Olesen, P.T.; Stahnke, L.H. 2000. The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. Meat Science 56: 357-368.
673. Oliveira, M.; Fonseca, H.R.; Brito, M.D. 1987. Relação *Lactobacillus/Micrococcus* no chouriço de carne. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. LXXXII(484): 341-348.
674. Oliveira, M.M.L. 1989. Aplicação de culturas de arranque no fabrico do chouriço de carne português. Trabalho apresentado para acesso à categoria de investigador auxiliar. INIA-ENTPA. Lisboa.
675. Ordóñez, J.A.; de Pablo, B.; Pérez de Castro, B.; Asensio, M.A.; Sanz, B. 1989. Selected chemical and microbiological changes in refrigerated pork stored in carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres. J. Agri. Food Chem. 39: 668-672.
676. Ordóñez, J.A.; Fernández, M.; Díaz, O.; García, de Fernando, G.D.; de la Hoz, L. 1995. Papel de los microorganismos en la maduración de los embutidos crudos-curados. AICE-Información Técnica 48: 9-13.
677. Ordóñez, J.A.; Hierro, E.M.; Bruna, J.M.; Hoz, L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 39: 329-367.
678. Orla-Jensen, S. 1919. The lactic acid bacteria. Andr. Fred. Host and Son (eds.), Copenhagen, Dinamarca.
679. Osei Abonyewa, A.A.; Laing, E.; Hugo, A.; Viljoen, B.C. 2000. The population change of yeasts in commercial salami. Food Microbiology 17: 429-438.

680. Owen, J.E.; Lawrie, R.A.; Hardy, B. 1975. Effect of dietary variation with respect to energy and crude protein levels on the oxidative rancidity exhibited by frozen porcine muscle. *J. Sci. Food Agric.* 26: 31-41.
681. Paiva, O.C. 1944. Notícias sobre a indústria de salsicharia no distrito de Portalegre. *Boletim Pecuário*. Ano XII, nº1.
682. Paleari-Bianchi, M.A.; Beretta, G.; Cattaneo, P., Balzaretti, C. 1985. Solfito e maturazione degli insacati crudi stagionatti. *Ind. Aliment.* 4: 371-376.
683. Palma, L.; Rosário, L.; Onofre, N. 1986. Sugestões para a conservação económica da fauna silvestre dos montados. 1º Encontro sobre Montado de Sobro e Azinho. Universidade de Évora: p.233-249.
684. Palumbo, S.A. 1986. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? *J. Food Prot.* 49:1003-1009.
685. Palumbo, S.A.; Smith, J.L. 1976. Chemical and microbiological changes during sausage fermentation and ripening. p.279-294. In: *Enzymes in Food and Beverage Processing*. Vol.47. L. Orly and J. St. Angelo (eds.), ACS Symposium Series
686. Palumbo, S.A.; Smith, J.L. 1977. Chemical and microbiological changes during sausage fermentation and ripening. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 47: 279-294.
687. Palumbo, S.A.; Zaika, L.L.; Kissinger, J.C.; Smith, J.L. 1976. Microbiology and technology of the pepperoni process. *Journal of Food Science* 41: 12-17.
688. Paparella, A.; López, C.C.; Pittia, P.; Di Berardo, L. 2004. Microbiological, chemical and physical changes in italian "Lonza". *Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology*. Helsinki, Finlandia.
689. Papon, M.; Talon, R. 1988. Factors affecting growth and lipasem production by meat *lactobacilli* strains and *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology* 64: 107-115.
690. Papon, M.; Talon, R. 1989. Cell location and partial characterization of *Brochothrix thermosphacta* and *Lactobacillus curvatus* lipases. *Journal of Applied Bacteriology* 66:235-242.
691. Paredes, J.C.; Horta, A.A. 1910. Fiscalização das carnes do gado suíno em Aldegallega do Ribatejo nos meses de Fevereiro e Março de 1910.
692. Parejo, I.; Ordóñez, J.A.; Garcia, M.L.; López Lorenzo, P. 1979. Estudios sobre la flora láctica que participa en la maduración de los embutidos. Proc. VII Congreso Nacional de Microbiología (S.E.M.) Cádiz. Comunicación 314.
693. Parente, E.; Villani, F; Coppola, R.; Coppola, S. 1989. A multiple strain starter for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait*. 69: 271-279.
694. Parolari, G.; Virgili, R.; Shivazappa, C. 1994. Relationship between cathepsin B activity and compositional parametres in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Science* 38: 117-122.
695. Patarata, L.A.S.C. 2002. Caracterização e avaliação da aptidão tecnológica de bactérias do ácido láctico e *Micrococcaceae* em produtos de salsicharia. Efeito da sua utilização em culturas de arranque e formulação acidificante no fabrico de linguiça tradicional transmontana. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Alimentar. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
696. Patel, R.B.; Gandhi, T.P; Chakravarthy, B.K.; Patel, R.J.; Pundarikakshudu, K.; Ghiani, H.K. 1985. Antibacterial activity of phenolic and nonphenolic fractions of some Indian medicinal plants. *Indian Drugs* 23: 595-597.
697. Pearson A.M. 1975. Muscle function and post-mortem changes. p.208-218. In: *The science of meat and meat products*. Freeman A.D. (eds.), Company. San Francisco, USA.

698. Pearson, A.M.; Love, J.D.; Shorland, F.B. 1977. Warmed over flavor in meat, poultry and fish. *Adv. Food Res.* 23(1).
699. Pearson, A.M.; Tauber, F.W. 1984. Curing. p.46. In: *Processed meats*. AVI Publishing Co. (eds.), Westport, Connecticut, USA.
700. Penny, I.F.; Etherington, D.J.; Reeves, J.L.; Taylor, M.A.J. 1984. The action of cathepsin L and Ca-activated neutral proteases on myofibrillar proteins. *Proceedings of the 30th European Meeting of Meat Research Workers* p.133-134.
701. Pereira, J.G. 1945. Relatório da Intendência de Pecuária de Elvas. p.101-143. In: *Arrolamento geral de gados e animais de capoeira de 1940*. Boletim Pecuário, Ano XII (1).
702. Pereira-Lima, C.I. 1996. Identificación de las sustancias responsables del sabor de los caldos de carne de vacuno. *Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Veterinária*. Universidade Complutense de Madrid.
703. Pérez, B.S. 1986. Factores que influyen en sabores y olores del jamón. *Cárnicia* 2000 34: 57-61.
704. Pérez, D.B.S. 1985. Ecología microbiana de los alimentos. p.333-458. *Produtos alimentícios*. (eds.). Acribia, Zaragoza, Espanha.
705. Pérez-Alvarez, J.A.; Sayas-Barbará, M.E.; Fernández-López, J.; Aranda-Catalá, V. 1999. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Research International* 32: 599-607.
706. Pestka, J.J. 1986. Fungi and mycotoxins in meats. p.277-309. In: *Advances in Meat Research*. Vol.2, Cap.10. AVI Publishing Co (eds.), Westport, Connecticut, USA.
707. Petäjä, E. 1977. The efect of some Gram-negative bactéria on the ripening and quality of dry sausage. *J. Sci. Agri. Soc. Finland*. 49: 107-166.
708. Pexara, E.S.; Metaxopoulos, J.; Drosinos, E.H. 2002. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages—‘piroski’—stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10 °C. *Meat Science* 62: 33-43.
709. Pezacki, W. 1979. Some basic facts about dry sausages manufacture. *Fleischwirtsch.* 59(2): 219-223.
710. Pezacki, W.; Szostak, D. 1962. Die dynamik der rohwurstgärung. 1. Homo und heteromilchsäure fermentation. *Fleischwirtsch.* 42: 180-184.
711. Pfeil, E.; Liepe, H. U. 1974. Nitrate, nitrite and germs in the manufacture of raw cured meats. *Fleischwirtschaft* 54: 1717-1718.
712. Picão, J.S. 1944. Através dos campos. Usos e costumes agricolo-alentejanos. Neogravura (eds.), Lda. Lisboa.
713. Pierson, M.D.; Smooth, L.A. 1982. Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 17:141-147.
714. Pivnick, H.; Johnston, M.A.; Thacker, C.; Loynes, R. 1970. Effect of nitrite on destruction and germination of *Clostridium botulinum* and putrefactive anaerobes 3679 and 3679h in meat and in buffer. *Can. Institute Food Technology* 3: 103-109.
715. Póvoas-Janeiro, J. 1948. Noções de salsicharia, Vol.I, Vol.II. Livraria Luso-Espanhola (eds.), Lisboa.
716. Póvoas-Janeiro, J. 1951a. Ritmo de crescimento, em peso dos leitões Alentejanos, até às oito semanas. *Revista de Medicina Veterinária*, Vol. XLVI(339): 456-468.
717. Póvoas-Janeiro, J. 1951b. Subsidios para o estudo da conservação da bolota por processos práticos ao alcance da lavoura. Separata dos “Trabajos del II Congreso Internacional Veterinario de Zootecnia”. Madrid. p.15.

718. Pradhan, A.A.; Rhee, K.S.; Hernandez, P. 2000. Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation. *Meat Science* 54: 385-390.
719. Prandl, O.; Fisher, A.; Shmidhefer, T.; Sinell, H. 1994. *Tecnologia e higiene da carne*. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
720. Pratas, J. 1934. *Criação de porcos*. Colecção Rústica (eds.), Empresa Nacional de Publicidade. Lisboa.
721. Price, J.F.; Schweigert, B.S. 1994. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
722. Pyrcz, J.; Pezacki, W. 1975. Die technologische Steuerung der Rohwurstreifung. IV. Einfluss verschiedener Arten von Kohlenhydraten auf die Dynamik der Prozesse einer Ansammlung von nichtsauren Fermentationserzeugnissen. *Fleischwirtsch.* 55: 217-223.
723. Quintanilla, L.; Ibañez, C.; Cid, C.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1996. Influence of partial replacement of NaCl and KCl on lipid fraction of dry fermented sausages inoculated with a mixture of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus carnosus*. *Meat Science* 43: 225-234.
724. Qvist, S.; Liberski, D. 1986. Enumeration of lactic acid bacteria in meat products. Proc. 32nd European Meeting of Meat Research Workers. Ghent, Bélgica. Vol.I. p.229-231.
725. Raczyński, R.G.; Spotti, E.; Tagliavini, A. 1978. Indagini sul prosciutto típico di Parma: influenza della fase di salsgione sull'evoluzione dei parametri chimico-fisici e della popolazione batterica. *Industria Conserve* 53(1): 11-16.
726. Radovanovic, R.; Cavoski, D.; Valikovic, D.; Cracic, G. 1990. Study of a traditional dry beef meat product "Uzicka pruta" processing, quantitative and qualitative characteristics. Proceedings of 36th International Congress of Mreat Science and Technology. La Habana, Cuba. p.905-912.
727. Ramarathnam, R.; Rubin, L.J. 1994. *Flavor of Meat and Meat Products*. (eds.). F. Shahidi. Blackie Academic and Professional. Glasgow, Reino Unido.
728. Ramihone, M.; Sirami, J.; Larpent, J.P.; Girard, J.P. 1988. Gout acide des saucissons secs. *Viandes et Produits Carnes* 9: 291-298.
729. Ramon, D.; Molina, I.; Flores, J. 1992. Development of microbial cultures as starters for spanish dry-cured meat products. In: *New technologies for meat and meat products. Fermentation and starter cultures; Muscle enzymology and meat ageing; Quality control systems*. Smulders, F.J.; Toldra, F.; Flores, J. & Prieto, M. (eds.), p: 53-69. Utrecht. ECCEAMST, AUDET. Tijdschriften.
730. Ramos, J.J.C. 1990. Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo ibérico. Dissertaçao apresentada para a obtençao do grau de Doutor. Universidade da Extremadura, Cáceres.
731. Ramos, J.J.C.; Bernáldez, M.J.B. 2001. Limpieza desinfección, desinsectación y eliminación de roedores en la industria cárnica. Vol II, p.919-940. In: *Enciclopédia de la carne y de los productos cárnicos*. Martín e Macias (eds.), Plasencia, Espanha.
732. Rebecchi, A.; Crivori, S.; Sarra, P.G.; Cocconcelli, P. 1998. Phisiological and molecular technics for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1043-1049.
733. Rebollo, M.R. 1998. Manual de industrias cárnica. Publicaciones Tecnicas Alimentares y Cárnica 2000: 397-456.
734. Refai, M.; Mansour, N.; El-Naggar, A.; Abdel-Aziz, A. 1993. The fungal flora in modern egyptian slaughterhouses. *Fleischwirtschaft* 73: 191-193.
735. Rerat, A. 1978. Digestion and absorption of carbohydrates and nitrogenous matter in the hindgut of omnivorous nonruminant animal. *J. Anim. Sci.* 46: 1808-1837.

736. Rerat, A. 1981. Digestion and absorption of nutrients in the pig. Some new data concerning protein and carbohydrates. *World Rev. Nutr. Diet.* 37: 229-287.
737. Reuter, G. 1970. *Lactobacilli* and closely related microorganisms in meat products. I. Occurrence and significance (survey and literature). II Characterization of isolated *lactobacilli* starins. *Fleischwirtschaft* 50: 951-962.
738. Reuter, G. 1971. Laktobazillen und eng verwandte mikroorganismen in fleisch und fleischwaren. 6. Mitteilung: proteolytische enzymaktivitäten. *Fleischwirtsch.* 51: 945-952.
739. Reuter, G. 1975. Classification problems, ecology and some biochemical activities of *lactobacilli* of meat products. p.221-229. In: *Lactic Acid Bacteria Beverages and Food..* J.G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting (eds.), Academic Press, London, Reino Unido.
740. Rhee, K.S. 1988. Enzymatic and nonenzymic catalysis of lipid oxidation in muscle foods. *Food Technology* 42: 127-132.
741. Rhee, K.S. 1992. Fatty acids in meats and meat producys. p.65-93. In: *Fatty Acids in Foods and their Health Implications.* Ching Kuang Chow (eds.), Marcel Dekker Inc, New York, USA.
742. Rhee, K.S.; Dutson, T.R.; Savell, J.W. 1984a. Enzyme lipid peroxidation in beef muscle microsomes as affected by electrical stimulation and post-mortem muscle excision time. *J. Food Biochem.* 9: 27-36.
743. Rhee, K.S.; Dutson, T.R.; Smith, G.C. 1984b. Enzymic lipid peroxidation in microsomal fractions from beef skeletal muscle. *J. Food Sci.* 49: 675-679.
744. Rhee, K.S.; Smith, G.C.; Rhee, K.C. 1983a. Retardation by glandless cottonseed flour of lipid oxidation and discoloration in rae ground beef containing salt. *J. Food Sci.* 48: 351, 359.
745. Rhee, K.S.; Smith, G.C.; Terrel, R.N. 1983b. Effect of replacement of sodium chloride on rancidity developments in raw and cooked ground pork. *J. Food Prot.* 46: 578-582.
746. Rheinbaben, K.E.V.; Hadlok, R.M. 1981. Rapid distinction between *Micrococci* and *Staphylococci* with furazolodone agars. *Rev. Antonil Van Leeuwenhoek.* 47: 41-51.
747. Rheinbaben, K.E.V.; Seipp, H. 1986. Untersuchungen zur mikflora roher, stükiger. Pökelfleischerzgnisse unter besonderer. Berücksichtigung der familie Micrococcaceae. *Chem. Mikrob. Technol.* 9: 152-161.
748. Ribeiro, A.M.R. 1972. Produção de fiambre. Tecnologia e higiene e seus aspectos bacteriológicos. Ministério da Economia, Secretaria do Estado da Indústria. Instituto Nacional de Investigação Industrial. Lisboa.
749. Ribeiro, A.M.R. 1974. Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. *Revista de Microbiologia* 5(1): 17-25.
750. Ribeiro, A.M.R. 1978. Tecnologia de transformação de carne. 1º Seminário de Industria e Tecnologia de Carnes. Lisboa. p.7-15.
751. Ribeiro, A.M.R. 1986. Microbiologia dos diferentes produtos alimentares. p.38-67. In: *Microbiologia Aplicada às Indústrias Alimentares.* 2ª Edição, Vol.38. Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, DTIA, Lisboa.
752. Ribeiro, A.M.R.; Stocker, M.Z.; Tropa, E., 1968. Flore bactérienne du sel Portugais. Son importance pour l'industrie de conserves alimentaires. *Ann. Inst. Pasteur Lille XIX:* 191-204.
753. Rice S.; Eitenmiller, R.R.; Koehler, P.E. 1976. Biologically active amines in food: a review. *Journal of Milk and Food Technology* 39: 353-358.
754. Rice, S.; Eitenmiller, R.R.; Koehler, P.E. 1975. Histamine and tyramine content of meat products. *Journal of Milk and Food Technology* 38: 256-258.
755. Roberts, T.A. 1975. The microbiological role of nitrite and nitrate. *J. Sci. Food Agric.* 26: 1755-1763.

756. Robinson, R.K. 1983. Starter cultures for milk and meat processing. p.192-202. In: Biothecnology. Vol.3, cap.2. H. Dellwey. (eds.), Verlag Chemie, Wheinheim
757. Rödel, W.; Scheuer, R.; Stiebing, A.; Klettner, P. G. 1993. Measuring the oxygen contente in meat products. Fleischwirtschaft 73: 666-668.
758. Rodrígáñez, M.; Toro, M.; Rodriguez, C.; Silió, L. 2000. Alleles survival from Portuguese and Spanish starins in apopulation of Iberian pig. Options Méditerranéennes, série A, Séminaires Méditerranéennes. 41: 57-63.
759. Rodríguez, J.M.; Sobrino, O.J.; Moreira, W.L.; Cintas, L.M.; Casaus, P.; Fernandez M.F.; Sanz, B.; hernandez, P.E. 1994. Inhibition of *Yersinia enterocolitica* by *Lactobacillus sake* strains of meat origin. Meat Science 37: 305-313.
760. Rodriguez, J.M.Z. 1990. Métodos físico-químicos utilizados en el control de calidad de la carne y productos cárnicos. Cárnica 2000. 75: 21-27.
761. Rodriguez, M.; Núñez, F.; Córdoba, J.J.; Bermúdez, M.E.; Asensio, M.A. 1996. Gram-positive, catalase positive cocci from dry cured ham and their enterotoxigenic potential. Applied and Environmental Microbiology 62: 1897-1902.
762. Rodríguez, M.; Núñez, F.; Córdoba, J.J.; Bermúdez, M.E.; Asensio, M.A. 1998. Evaluation of proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry cured ham. Journal of Applied Microbiology 85: 905-912.
763. Rogers, L.A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16: 321-326.
764. Rogosa, M. 1961. Experimental conditions for nitrate reduction by certain strains of the genus *Lactobacillus*. J. Gen. Microbiol. 24: 401-408.
765. Rogosa, M. 1970. Characters used in the classification of *lactobacilli*. International Journal of Systematic Bacteriology. 20: 519-534.
766. Roig, A.X.; Hernandez, M.M.; Rodriguez, J.J.; Lopez, E.I.; Mora, M.T. 1998. Microbiological events and evolution of histidine and tyrosine descarboxilase-containing bacteria during the elaboration of "Fuet", a spanish ripened sausage. Proceedings of 44th International Congress of Meat Science and Technology. Barcelona, Espanha. Vol.II p. 860-861.
767. Roig-Sagués, A.X.; Hernández, Herrero, M.M.; López-Sabater, E.I.; Rodríguez-Gerez, J.J.; Mora-Ventura, M.T. 1999. Microbiological events during the elaboration of "fuet", a spanish ripenet sausage. European Food Research and Technology. 209: 108-112.
768. Rojas, M.T.A.; Sereno, J.F.T. 2001. Emulsiones y geles cárnicos. Vol II, p.1267-1277. In: Enclopédia de la carne y de los productos cárnicos. Martín e Macias (eds.), Plasencia, Espanha.
769. Roncalés, P. 1995. Tecnología, cambios bioquímicos y calidad sensorial de los embutidos curados. Alimentación, Equipos y Tecnología. Ene/Feb: 73-83.
770. Roncalés, P.; Aguilera, M.; Beltrán, J. A.; Jaime, I.; Peiro, J.M. 1991. The effect of natural or artificial casing on the ripening and sensory quality of a mould-covered dry sausage. International Journal of Food Science and Technology 26: 83-89.
771. Rönner, U. 1994. Modified atmosphere packaging of non-respiring products. p.51-58. In: Food Preservation by Combining Processes.. L. Leistner e L.G.M. Gorris (eds.), Final Report FLAIR, Concerted action nº 7, subgroup B.
772. Rosário, M.C.C.M.C. 1989. Efeitos de aditivos químicos nas características do salpicão tradicional de Vila Real ao longo do processo de cura. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Alimentar. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
773. Rose, D.P.; Connolly, J.M. 1999. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. Pharmacology and Therapeutics 83: 217-244.

774. Rosemberger, A.; Weber, H. 1993. Bacterial contamination of spice samples. Microbiological status in relation to guide values and warning values. *Fleischwirtschaft* 73: 830-833.
775. Rosenstein, R.; Gotz, F. 2000. *Staphylococcal lipases*: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*. 82: 1005-1014.
776. Rosset, R. 1982. Chilling, freezing and thawing. p.265-318. In: Meat Microbiology. Capítulo 8:. M.H. Brown (eds.), Elsevier Applied Science Publishers. London, Reino Unido.
777. Rovira, A.; Nieto, J.C.; Rodriguez, A.; Reguera, J.I.; Gonzalez, Z. 1997. Characterization and selection of *Lactobacilli* isolated from Spanish fermented sausages. *Microbiología SEM* 13: 201-208.
778. Rozier, J. 1969. Mécanismes de la maturation du saucisson sec. *Rec. Méd. Vét.* CXLV(10): 1069-1102.
779. Rubin, H.E. 1978. Toxicological model for a two-acid system. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 623-624.
780. Rubin, L.J.; Shahidi, F. 1988. Lipid oxidation and the flavour of meat products. Proceedings of 34th International Congress of Meat Science and Technology. Brisbane: 295-301.
781. Rubio, B.; Molinero, C.; Martínez, B.; González-Fernández, C.; García-Cashán, M.D. 2004. Effect of modified atmospheres packaging on the hygienic and organoleptic quality of "Cecina de León" kept for extended storage. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
782. Rubio, O.D. 1994. Efecto de la adición de proteasas en el proceso madurativo de los embutidos crudos curados. Dissertaçāo para obtenção do grau de Doutor em Veterinária. Universidade Complutense de Madrid.
783. Ruiz, J.; Cava, R.; Ventanas, J.; Jensen, M.T. 1998. Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: dry-cured Iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4688-4694.
784. Ruiz, J.; Garcia, C.; Carmen-Diaz, M.; Cava, R.; Florencio-Tejeda, J.; Ventanas, J. 1999. Dry cured Iberian ham non-volatile components as affected by the length the curing process. *Food Research International* 32: 643-651.
785. Ruusunen, M.; Puolanne, E. 2004. Sodium in meat products. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
786. Sabio, E.; Fallola, A.; Sanabria, C.; Vidal-Aragón, M.C. 1998. Iberian ham. Proceedings of International Symposium on Basis of the Quality of Typical Mediterranean Animal Products. European Association for Animal Production (EAAP). 90 p.353-358.
787. Sahl, H.Z. 1994. Staphylococcin-1580 is identical to the lantibiotic epidermin – implications for the nature of bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 60(2): 752-755.
788. Salavessa, J.J.; Barreto, A.S. 2004. Manufacturing process development on a ready to heat and eat portuguese traditional product: Maranhos. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
789. Saleh, B; Watts, B.M. 1968. Substrates and intermediates in the enzymatic reduction of metmyoglobin in ground beef. *J. Food Sci.* 33: 353-356.
790. Salminen, S.; Ouwehand, A.; Benno, Y.; Lee,Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*. 10(3): 107-110.
791. Samelis, J.; Aggelis, G.; Metaxopoulos, J. 1993. Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of Greek dry sausages. *Meat Sci.* 35: 371-385.
792. Samelis, J.; Kakouri, A.; Rogga, K.J.; Savvaidis, I.N.; Kontaminas, M.G. 2003. Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyro, a

traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. *Food Microbiology*. 20(6): 661-669.

793. Samelis, J.; Metaxopoulos, J.; Vlassi, M.; Pappa, A. 1998. Stability and safety of traditional Greek salami - a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology*. 22: 69-82.
794. Samelis, J.; Metaxopoulos, J. 1997. Lipolytic activity of meat *Lactobacilli* isolated from naturally fermented Greek dry sausage. *Fleischwirtschaft* 77: 165-168.
795. Samelis, J.; Stavropoulos, S; Kakouri, A.; Mataxopoulos, J. 1994. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiol.* 11: 447-460.
796. Sameshima, T.; Magome, C.; Takeshita, K.; Arihara, K.; Itoh, M.; Kondo, Y. 1998. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 1-7.
797. Sanabria, C.; Martín-Alvarez,P.J.; Carrascosa, A.V. 2004. Colour and moisture changes during the manufacture of Iberian dry-cured ham caused by some biotic and abiotic factors. *Food Science and Technology International* 110(2): 269-275.
798. Sandine, W.E. 1988. New nomenclature of the non rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochem.* 70: 519-522.
799. Sandler, M.; Youdim, M.B.H.; Hanington, E. 1974. A phenylethylamine oxidasing defect in migraine. *Nature* 250: 335-337.
800. San-Martín, J.P.E. 1993. Identificación de riesgos microbiológicos y puntos críticos durante la elaboración y maduración de embutidos crudos fermentados. *Dissertaçāo para obtenção do grau de Doutor. Faculdade de Veterinária, Universidade de León*.
801. Santamaría, I.; Lizárraga, T.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1992. Contribución a la tipificación del chorizo de Pamplona. Estudio fisicoquímico y sensorial. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 32: 431-438.
802. Santamaría, I.; Lizárraga, T.; Iriarte, J.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1994. Chorizo Pamplona. Correlation between sensory parameters and parameters related to nitrogen fractions in a Spanish dry sausage. *Fleischwirtschaft* 74: 961-974.
803. Santaolalla, J.C.; Colmenero, F.J. 2001. Refrigeración y congelación de carne y productos cárnicos. Vol I, p.475-509. In: *Encyclopédia de la carne y de los productos cárnicos*. Martín e Macias (eds.), Plasencia, Espanha.
804. Santos, C.; Partidário, A.; Padilha, M.; Silva, L.; Roseiro, C.; Elias, M. 2004. Chemical changes in the lipid fraction on traditional dry fermented sausage "painho de Portalegre" during ripening. *Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology*. Helsinki, Finlandia.
805. Santos, E.; González-Fernandez, C.; Jaime, I.; Rovira, J. 1998. Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of "Chorizo". *International Journal of Food Microbiology* 39: 123-128.
806. Santos, E.M.; Jaime, I.; Rovira, J.; Björkroth, J.; Korkeala, H. 2001. Characterization and identification of lactic acid bacteria in "Morcilla de Burgos". *Proceedings of 47th International Congress of Meat Science and Technology*. Kraków, Polónia. Vol.II, p. 14-15.
807. Santos-Buelga, C.; Peña-Egido, M.J.; Rivas-Gonzalo, J.C. 1986. Changes in tyramine during chorizo-sausage ripening. *Journal of Food Science* 51: 518-519, 527.
808. Sanz, B.; Selgas, D.; Parejo, I.; Ordóñez, J. A. 1988. Characteristics of *Lactobacilli* isolated from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 6: 199-205.

- 809.** Sanz, Y.; Fadda, S.; Vignolo, G.; Aristoy, M.C.; Oliver, G.; Toldrá, F. 1999. Hydrolysis of muscle myofibrillar proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*. International Journal of Food Microbiology 53: 115-125.
- 810.** Sanz, Y.; Vila, R.; Toldrá, F.; Nieto, P.; Flores, J. 1997. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. International Journal of Food Microbiology. 37: 225-229.
- 811.** Saramago, A. 1997. Para uma história de alimentação no Alentejo. Assíro e Alvim (eds.), Lisboa.
- 812.** Sardinha de Oliveira, A. J. 1959. A bolota e aveia na alimentação do porco Alentejano. Separata da Lavoura Portuguesa. Boletim da Associação Central da Agricultura Portuguesa.
- 813.** Sarra, P.G.; Cabras, M.; Dellaglio, F. 1982. Microbiological aspects of the manufacturing of "Coppa Piacenza" salami. Industrie Alimentari 21: 477-481.
- 814.** Sárraga, C.; Gil, M.; Arnaud, J.; Monfort, J.M. 1989. Effect of curing salt and phosphate on the activity of porcine muscle proteases. Meat Science 25: 241-249.
- 815.** Sárraga, C.; Gil, M.; Garcá-Regueiro, J.A. 1993. Comparision of calpain and cathepsin (B, L and D) activities during dry-cured ham processing from heavy and light large white pigs. Journal of Science of Food and Agriculture 62: 71-75.
- 816.** Schiffner, E.; Hagedorn, W.; Oppel, K. 1978. Cultivos bacterianos en la industria cárnica. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
- 817.** Schiffner, E.; Oppel, K.; Lötzing, D. 1996. Embutido crudo. p.83-128. In: Elaboración casera de carne y embutidos. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
- 818.** Schillinger, U.; Holzapfel, W.H. 1990. Antibacterial activity of carnobacteria. Food Microbiology 7: 305-310.
- 819.** Schillinger, U.; Lücke, F.K. 1987. Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. Food Microbiol. 4: 199-208.
- 820.** Schillinger, U.; Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906.
- 821.** Schleifer, K.H. 1986. Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2, Section12. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.), Williams & Wilkins Co. Baltimore, Reino Unido.
- 822.** Schleifer, K.H.; Kloos, W.E. 1975. Isolation and characterization of *Staphylococci* from human skin. I. Amend descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and description of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. Int J. System. Bacteriol. 25: 50-61.
- 823.** Schleifer, K.H.; Kraus, J.; Dvorak, C.; Kilpper-Bälz, R.; Collins, M.D.; Fisher, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related *Streptococci* to genus *Lactococcus* gen. nov. System Appl. Microbiol. 6:183-195.
- 824.** Seager, M.S.; Banks, J.G.; Blackburn, C.W.; Board, R.G. 1986. A taxonomic study of *Staphylococcus* spp. Isolated from fermented sausages. Journal of Food Science 51(2): 295-297.
- 825.** Sebranek, J. G.; Fox, J. B. 1985. A review of nitrite and chloride chemistry: interactions and implications for cured meats. J. Sci. Food Agric. 36:1169-1182.
- 826.** Secondi, F. 1997. Croissance, development tissulaire et composition lipidique des tissus musculaire et adipeux chez le porc Corse. Amelioration de la conduite alimentaire des porcs en élevage extensif méditerranéen. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Université Blaise Pascal.
- 827.** Selgas, D.; García de Fernando, G; Ordóñez, J.A. 1993. Lipolytic and proteolytic activities of micrococci isolated from dry sausages. Fleischwirtschaft 73: 1175-1176, 1179.

828. Selgas, M.D. 1985. Aptitud tecnológica de Gen. *Micrococcus*. Selección de cepas iniciadoras. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas. Universidade Complutense de Madrid.
829. Selgas, M.D.; Casas, C.; Toledo, V.M.; García, M.L. 1999. Effect of selected mould strains on lipolysis in dry fermented sausages. European Food Research and Technology 209: 360-365.
830. Selgas, M.D.; Domínguez, R. ; Ros, J.; García, M.L. 2000. Caracterización de la actividad de leveduras aisladas de embutidos madurados. XII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos, Oviedo. p.143-154.
831. Selgas, M.D.; Garcia, M.L.; Asensio, M.A.; Ordoñez, J.A.; Edwards, R.; Hibbard, C.H.; Dainty, R. 1988. Evolución de los ácidos grasos libres en embutidos preparados com diferentes cultivos iniciadores. VI Reun. Nac. Microb. Aliment. Madrid. (S.E.M.). p. 94-95.
832. Selgas, M.D.; Ordóñez, J.A.; Sanz, B. 1986. Selection of *Micrococci* strains for their use as starter cultures for dry fermented sausages. Proc. 32nd Europ. Meet. Meat Res. Work. Ghente, Belgica. 5: 2,251-253.
833. Selke, E.; Rohwedder, W.K.; Dutton, H.J. 1980. Volatile components from trilinolein heated in air. Journal of the American Oil Chemists Society 57: 25-30.
834. Seoknam, K.; Kim, B.; Jang, A.; Lee, S.O.; Min, J.S.; Lee, M. Effect of organic acids on microbial characteristics and *Salmonella typhimurium* in pork loins. Proceedings of 47th International Congress of Meat Science and Technology. Kraków, Polónia. Vol.II, p. 62-63.
835. Serrano, T.M. 2003. Isolamento de *Micrococcaceae* perspectivando a sua utilização como culturas de arranque no fabrico de enchidos regionais do Alentejo. Relatório do trabalho de fim de curso, Licenciatura em Engenharia Zootécnica, Universidade de Évora.
836. Serrano-Moreno, A. 1979. Evolución de varias microfloras y su interdependencia com las condiciones físico-químicas durante la maduración del salchichón. Alimentaria 100: 39-56.
837. Sesma, B.; Rodríguez, B. 1976. Estudio de la flora microbiana durante la maduración de embutidos. I. Características de la especie de la familia *Micrococcaceae* aisladas de salchichon de Pamplona. A.T.A. 16(1): 107-113.
838. Shahani, K.M. 1975. Enzymes in Food Processing.. G.R. Reed. Academic Press (eds.), New York, USA.
839. Shahidi, F. 1991. Developing alternative meat-curing systems. Trends in Food Science and Technology 2: 219-222.
840. Shahidi, F.; Pegg, E. 1991. Nitrite-free meat curing systems: update and review. Food Chemistry 43:185-191.
841. Shahidi, F.; Yun, J.; Rubin, L. J.; Wood, D.F. 1987. The hexanal content as an indicator of oxidative stability and flavour acceptability in cooked ground pork. Canadian Institute of Food Science and Technologie Journal 20: 104-106.
842. Sharma, N.; Mukhopadhyay, R. 1992. Processing of fermented sausage using starter cultures. Proceedings of 38th International Congress of Meat Science and Technology. 4, p.827-830.
843. Sharpe, M.E. 1979. Identification of the lactic acid bacteria. p.233-259. In: Identification Method for Microbiologists.. F.A. Skinner and D.W. Lovelock (eds.), Academic Press. London, Reino Unido.
844. Sharpe, M.E. 1981. The genus *Lactobacillus*. p.1653-1679. In: The prokaryotes. An handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.. Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schelegel (eds.), Springer. New York, USA.
845. Shehata, H. 1998. Production of buffalo salami. Effects of bacterial starter cultures, gelatine coat with pasterma spices and mold coat on product quality. Fleischwirtschaft 78: 499-501.

846. Shu, C.K.; Mookherjee, B.D. 1985. Volatile components of the phenolic fraction of cooked bacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 1107-1109.
847. Shu, C.K.; Mookherjee, B.D.; Bondarovich, H.A.; Hagedorn, M.L. 1985. Characterization of bacon odor and other flavor components from the reaction of isovaleraldehyde and ammonium sulfide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 130-132.
848. Sierra, I.; Campo, M.M.; Olleta, J.L.; Panea, B.; Sanudo, C.; Pardos, J.J. 1998. Quality in the denomination of origin "Jamón de Teruel". Proceedings of International Symposium on basis of the quality of typical Mediterranean animal products. EAAP Publication 90, p. 365-369.
849. Silla, M.; Innerarity, A.; Flores, J. 1985. Características de jamones con cristales de tirosina. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 25(1): 95-103.
850. Silla-Santos, M.H. 1998. Amino acid decarboxylase capacity of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal of Food Microbiology* 39: 227-230.
851. Silvano, C.S. 1999. Evolução da flora microbiana na produção de enchidos procedentes de porco da raça Alentejana. Trabalho de fim de curso, Licenciatura em Engenharia Zootécnica, universidade de Évora.
852. Simon, S.; Ellis, D.E.; Mac Donald, B.D.; Miller, D.G.; Waldman, R.C.; Westerberg, D.O. 1973. Influence of nitrite and nitrate curing ingredients on the quality of packaged frankfurters. *J. Food Sci.* 38: 919-923.
853. Simonne, A.H.; Simonne, E.H.; Eitenmiller, R.R.; Mills, H.A.; Cresman, C.P. 1997. Could the Dumas method replace the Kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods? *J. Sci. Food Agric.* 73: 39-43.
854. Simopoulos, A.P. 1994. Fatty acids. p.355-392. In: *Functional Foods*. 1^a edição. Golberg. Chapman & Hall (eds.), New York, USA.
855. Simopoulos, A.P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 70: 560-569.
856. Singh, B.; Falahee, M.B.; Adams, M. 2001. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiology* 18:133-139.
857. Skrinjar, M.; Horvat, T. 1992. Ochratoxin. A production in dry sausage by *Penicillium verrucosum* var. cyclopium strains. Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci. Technol. Clermont-Ferrant, França p.831-838.
858. Smith, J.L.; Alford, J.A. 1969. Action of microorganisms on the peroxides and carbonyls of fresh lard. *J. Food Sci.* 34: 75-83.
859. Smith, J.L.; Palumbo, S. A. 1981. Microorganisms as food additives. *J. Food Protect.* 44: 936-955.
860. Smith, J.L.; Palumbo, S.A. 1983. Use of starter cultures in meats. *J. Food Protect.* 46(11): 997-1021.
861. Smith, J.L.; Palumbo, S.A. 1973. Microbiology of Lebanon Bologna. *Applied Microbiology* 26(4): 489-496.
862. Smithard, R.R.; Smith, W.C.; Hellis, M. 1980. A note on the fatty acid composition of backfat from boars an comparaison with gilts and barrows. *Journal of Anim. Prod.* 31: 217-222.
863. Sneath, P.H. 1986. Numerical taxonomy. p.969-971. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2.. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.), Williams & Wilkins Co. Baltimore, Reino Unido.
864. Solomon, H.M.; Kautter, D.A. 1988. Outgrowth and toxin production by *Clostridium botulinum* in bottled chopped garlic. *J. Food Prot.* 51: 862-865.
865. Somavilla, J.F.; Iñigo, B.; Arroyo, V. 1973. Estudio microbiológico del proceso de fabricación de embutidos. II. Identificación de bacterias. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 13: 307-312.

866. Sorensen, B. 1997. Lipolysis of pork fat by the meat starter culture *D. hansenii* at various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 187-193.
867. Sousa, M.C.; Ribeiro, A.M. 1983. Chouriço de carne português: tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica. *Industria Alimentar* 1: 14-23.
868. Spinelli, A.M.; Lakritz, L.; Wasserman, A.E. 1974. Effects of processing on the amine content of pork bellies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22: 1026-1029.
869. Stackebrandt, E.; Rainey, F.A.; Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierachic classification system, *Actinobacteria classi nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 479-491.
870. Stadhouders, J. 1974. Dairy starter cultures. *Milchwissenschaft* 29: 329-337.
871. Stadhouders, J.; Veringa, H.A. 1973. Fat hydrolysis by lactic acid bactéria in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 27: 77-91.
872. Stahl, W.H. 1973. Compilation of odor and taste threshold values data. American Society for Testing and Materials. Filadelfia, USA.
873. Stahnke, L. H.; Holck, A.; Jensen, A.; Nilsen, A.; Zanardi, E. 2000. Flavour compounds related to maturity of dried fermented sausage. *Proceedings of 46th International Congress of Meat Science and Technology*. Buenos Aires, Argentina p.236-237.
874. Stahnke, L.; Zeuten, P. 1992. Identification of volatiles from Italian dried salami. *Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Clermont-Ferrant, França p.835-842.
875. Stahnke, L.H. 1994. Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Science* 38: 39-53.
876. Stahnke, L.H. 1995a. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. Part.II. Volatile components. *Meat Science* 41: 193-209.
877. Stahnke, L.H. 1995b. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. Part.III. Sensory evaluation. *Meat Science* 41: 211-223.
878. Stahnke, L.H. 1999a. Volatiles produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausages minces. Part.I. Collection and Identification. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 32: 357-364.
879. Stahnke, L.H. 1999b. Volatiles produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausages minces. Part.II. The influence of growth parameters. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 32: 357-364.
880. Stiebing, A.; Rödel, W. 1988. Influencia de la humedad relativa ambiente sobre el desarrollo de la maduración de embutidos secos. *Fleischwirtschaft* 70: 30-38.
881. Stiebing, A.; Rödel, W. 1990. Influence of the pH on the drying pattern in dry sausage. *Fleischwirtschaft* 70: 1039-1040, 1042-1043.
882. Stiles, M.E. 1991. Modified atmosphere packaging of meat, poultry and their products. p.118-147. In: *Modified Atmosphere Packaging of Food*. Ooraikul, B. e Stiles (eds.), Toronto, Canadá.
883. Stiles, M.E.; Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.
884. Strasters, K.C.; Winckler, K.C. 1963. Carbohydrate metabolism of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 33: 213-229.
885. Straub, B.W.; Tichaczek, P.; Kicherer, M.; Hammes, W.P. 1991. Formation of tyramine by *Lactobacillus curvatus* LTH972. *Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie*. München. 43: 317-321.

886. Straub, B.W.; Tichaczek, P.S.; Kicherer, M.; Hammes, W.P. 1994. Formation of tyramine by *Lactobacillus curvatus* LTH 972. Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung 199: 9-12.
887. Sykes, G. 1965. Disinfection and sterilization. 2^aedição. J.B. Lippincott (eds.), Philadelphia, USA.
888. Szántó, E. 1980. Inhibition of rancidity of fats by paprika and tomato seeds. Acta Alimentaria 9(2): 173-187.
889. Tabilo, G.; Flores, M.; Fiszman, S.M.; Toldrá, F. 1999. Postmortem meat quality and sex affect textural properties and protein breakdown of dry-cured ham. Meat Science 51: 255-260.
890. Tagg, J.R.; Dajani, A.S.; Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins or Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722-756.
891. Talaricco, T.L.; Casas, I.A.; Shung, T.C.; Dobrogosz, W.J. 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrob. Agents. Chemother. 32: 1854-1858.
892. Talaricco, T.L.; Dobrogosz, W.J. 1990. Purification and characterization of glycerol dehidratase from *Lactobacillus reuteri*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1195-1197.
893. Talon, R.; Chastagnac, C.; Vergnais, L.; Montel, M.C.; Berdagué, J.L. 1998. International. Journal of Food Microbiology. 45: 143-149
894. Talon, R.; Dublet, N.; Montel, M.C.; Cantonnet, M. 1995. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. Current Microbiology 30: 11-16.
895. Talon, R.; Montel, M.C.; Gandemer, G.; Viau, M.; Cantonnet, M. 1992. Lipolysis of pork fat by *Staphylococcus warneri*, *S. saprophyticus* and *Micrococcus varians*. Applied Microbiology and Biotechnology 38: 606-609.
896. Talon, R.; Walter, D.; Montel, M. C. 2000. Meat Science 54: 41-46.
897. Tetlow, A.L.; Hoover, D.G. 1988. Fermentation products from carbohydrate metabolism in *Pediococcus pentosaceus* PC39. J. Food Prot. 51: 804-89.
898. Thomas, T.D. 1976. Regulation of lactose fermentation in group N *streptococci*. Applied and Environmental Microbiology 32: 474-478.
899. Tichivangana, J.Z.; Morrissey, P.A. 1985. Myoglobin and inorganic metals as prooxidants in raw and cooked muscle systems. Meat Sci. 15: 107-112.
900. Toldrá, F.; Flores, M. 1998. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38: 331-352.
901. Toldrá, F.; Rico, E.; Flores, J. 1992. Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems. Biochimie 74: 291-296.
902. Toldrá, F.; Rico, E.; Flores, J. 1993. Cathepsin B, D, H and L activities in the processig of dry-cured ham. Journal of Science of Food and Agriculture. 62: 157-161.
903. Toledo, V.M.; Selgas, M.D.; Casas, M.C.; Ordoñez, J.A., García, M.L. 1997. Effect of selected mould strains on proteolysis in dry fermented sausages. Zeitschrift fur lebensmittel Untersuchung und Forschung 204: 385-390.
904. Torriani, S.; Dellaglio, F.; di Bucchianico, R.; Zabeu, G. 1995. Use of selected starter cultures in the production of traditional abruzzo salami. Italian Journal of Food Science: 113-123.
905. Torriani, S.; Dellaglio, F.; Palummerie, M. 1990. Characterization of *lactobacilli* isolated from italian salami. Annals of Microbiology 40: 225-233.
906. Toth, L. 1983. Nitrite reactions during the curing of meat products. Fleischwirtschaft 63: 208-211.

907. Townsend, W.E.; Olson, D.G. 1994. Las carnes curadas y su procesado. p.393-414. In: Ciencia de la carne y de los productos cárnicos.. J. F. Price and B. S. Schweigert (eds.), Acribia. Zaragoza, Espanha.
908. Treviño, E.; Beil, D.; Steinhart, H. 1997a. Determination of biogenic amines in minisalami during long-term storage. Food Chemistry 58: 385-390.
909. Treviño, E.; Beil, D.; Steinhart, H. 1997b. Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage. Food Chemistry 60: 521-526.
910. Trigo, M.J.; Fraqueza, M.J. 1998. Effect of gamma radiation on microbial population of natural casings. Radiat. Phys. Chem. 52(1-6): 125-128.
911. Trigo, M.J. 1992. Contribuição para o estudo dos efeitos da irradiação na carne de aves desossada mecanicamente. Dissertação para acesso à categoria de Investigador Auxiliar. Instituto Nacional de Investigação Agrária.
912. Trigueros, G.; Garcia, M.L.; Casas, C.; Ordóñez, J. A.; Selgas, M.D. 1995. Proteolytic and lipolytic activities of mould strains isolated from Spanish dry fermented sausages. Z-Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung. 201: 298-302.
913. Troeger, K.; Woltersdorf, W. 1986. Influence of scalding and dehairing during pig slaughtering on meat quality. Fleischwirtsch 66: 893-897.
914. Troller, J.A. 1987. Adaptation and growth of microorganisms in environments with reduced water activity. p.102-106In: Water Activity: Theory and Applications to Food.. L.B. Rockland e L.R. Beauchat (eds.), Marcel Dekker Inc., New York, USA.
915. Troller, J.A.; Christian, J.H.B. 1978. Water activity and food. Academic Press (eds.), New York, USA.
916. Trüper, H.G.; De Clari, L. 1997. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". International Journal of Systematic Bacteriology 47: 908-909.
917. Tuomilehto, J.; Jousilahti, P.; Rastenyte, D., Vladislav, M.; Tanskanen, A.; Pietinen, P. 2001. Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. Lancet 357: 848-851.
918. Turubatovic, L.; Hadziosmanovic, M.; Caklovica, F.; Petrohilou, I. 2004. Results of physicochemical and sensorial investigation of different type of fermented sausages during fermentation and ripening process. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia
919. Työpponen, S.; Markkula, A.; Petajä, E.; Suihko, M. L.; Mattila-Sandholm, T. 2003. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. Food Control 14: 181-185.
920. Ulmer, K.; Fischer, A. 2004. Comparision of sensory and analytical properties of dry sausages produced with different processing procedures. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
921. United States Department of Agriculture (USDA), 1983. Composition of foods: pork products. p.8-10. Raw processed prepared. Agriculture Handbook. Washington D.C. USA.
922. Urbach, G. 1997. The chemical and biochemical basis of cheese and milk aroma. p.253-298. In: Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. B.A. Law (eds.), Blackie Academic and Professional. London, Reino Unido.
923. Urbain, W. M. 1976. Conservación de la carne. p.359-367. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. J. F. Price e Schweigert (eds.), Acribia. Zaragoza, Espanha.
924. Üren, A.; Babayigit, D. 1997. Colour parameters of turkish-type fermented sausage during fermentation and ripening. Meat Science 45(4): 539-549.

925. Vacas, M.N. 1944. Aspectos antropogeográficos do Alentejo. Vol.3. p.53-56. Suplementos de BIBLOS.
926. Van der Klaauw, N.J.; Smith, D.V. 1995. Taste quality profiles for fifteen organic and inorganic salts. *Physiology and Behaviour* 58:295-306.
927. Vandeniessche, F.; Vandekerckhove, P.; Demeyer, D.I. 1980. The influence of spices on the fermentation of a Belgian dry sausage. Proceedings of the 26th European Meeting on Meat Research Work. Colorado Springs, USA p.128-133.
928. Varnam, A.H.; Evans, M.G. 1991. Foodborne pathogens. An illustrated text. Wolfe (eds.), Aylesbury, Reino Unido.
929. Verplaetse, A; de Bosschere, M.; Demeyer, D. 1989. Proteolysis during dry sausage ripening. Proceedings of 35th International Congress of Meat Science and Technology. Copenhagen, Dinamarca p.815-818.
930. Verplaetse, A; Demeyer, D.; Gerard, S.; Buys, E. 1992. Endogenous and bacterial proteolysis in dry sausage fermentation. Proceedings of the 38th International Congress Meat Science Technology. Clermont-Ferrant, França p.851-854.
931. Vignolo, G.M.; Ruiz Holgado, A.P.; Oliver, G. 1989. Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausages. *J. Food Prot.* 52: 787-791.
932. Villani, F.; Pepe, O.; Mauriello, G.; Salzano, G.; Moschetti, G.; Coppola, S. 1994. Antimicrobial activity of *Staphylococcus xylosus* from Italian sausages against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 159-161.
933. Villani, F.; Salzano, G.; Sorretino, E.; Pepe, O.; Marino, P.; Coppola, S. 1993. Enterocin 226nwc, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 380-387.
934. Virgili, R. 1994. Development of a sensory standart of quality for Perma and S. Daniele hams. *Industria Conserve* 69: 222-229.
935. Virgili, R.; Parolari, G.; Schivazappa, C.; Bordini, C. S.; Volta, R. 1995. Effects of raw material on proteolysis and texture of typical Parma ham. *Industria Conserve* 70: 21-31.
936. Voigt, M.N.; Eintenmiller, R.R. 1977. Production of tyrosine and histidine decarboxylase by dairy-related bacteria. *Journal of Food Protection* 40: 241-245.
937. Vösgen, W. 1993. Curado. Son necessários o superfulos el nitrito o el nitrato como agentes curantes? *Fleischwirtschaft español*. 2: 25-30.
938. Wallach, D.P. 1968. Isolation and characterization of four lipolytic preparations from rat skeletal muscle. *J. Lipid Res.* 9: 200-206.
939. Watts, B.M.; Kendrick, J.; Zipser, M.W.; Hutchins, B.; Saleh, B. 1966. Enzymatic reducing pathways in meat. *J. Food Sci.* 31: 855-859.
940. Weber, H. 1994. Dry sausage manufacture. The importance of protective cultures and their metabolic products. *Fleischwirtschaft* 74: 278-282.
941. West, C.A.; Warner, P.J. 1988. Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 163-165.
942. Westemberg, D.O. 1973. Cured meat flavor and the role of nitrite in its development. Proceedings of the 26th Reciprocal Meat Conference p.45-48.
943. Wettasinghe, M.; Shahidi, F. 1997. Oxidative stability, cooking yield and texture of pork treated with a low-sodium salt. *Journal of Muscle Foods* 8: 373-382.
944. Wheiling, H. 1973. *Tecnología práctica de la carne*. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
945. Whitaker, J.R. 1972. The esterases. p.481 In: *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker Inc (eds.), New York, USA.

946. Whittenbury, J.R. 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity of the lactic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 35: 13-26.
947. Willet, W.C.; Sacks, F.; Trichopoulou, A.; Drescher, G.; Ferro-Luzzi, A.; Helsing, E.; Trichopoulos, D. 1995. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am. J. Clin. Nutr. Suplemento* 61: 1402S-1406S.
948. Wirth, F. 1993. La reducción y el empleo de las sustancias de curado en los productos cárnicos. *Fleischwirtsch. Español.* 1: 3-7.
949. Wood, J.D. 1984. Fat quality in lean pigs. Special Report, Meat Research Institute 2: 166
950. Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R.; Enser, M. 2004. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science* 66(1): 21-32.
951. Woods, F.; Kinsella, J. 1980. Protease from *Saccharomyces carlsbergensis*: activity on food proteins. *Journal of Food Science* 45: 1200-1202.
952. Yang, H.; Shol, S.; Lee, J.; Kang, G.; Joo, S.; Park, G. 2004. Textural and sensory properties of oatmeal added low fat sausage with different btypes of meat. Proceedings of 50th International Congress of Meat Science and Technology. Helsinki, Finlandia.
953. Yasosky, J.J.; Aberle, E.D.; Peng, I.C.; Mills, E.W.; Judge, M.D. 1984. Effects of pH and time of grinding on lipid oxidation of fresh ground pork. *Journal of Food Science* 49:1510-1512.
954. Younathan, M.T.; Watts, B.M. 1959. Relationship of meat pigments to lipid oxidation. *Food Research.* 24: 728-732.
955. Zaika, L.L.; Kissinger, J.C. 1981. Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *Journal of Food Science* 46: 1205-1210.
956. Zaika, L.L.; Zell, T.E.; Smith, J.L.; Palumbo, S.A.; Kissinger, J.C. 1976. The role of nitrite and nitrate in Lebanon bologna, a fermented sausage. *Journal of Food Science* 41: 1457-1460.
957. Zalacain, I.; Zapelena, J.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1997d. Dry fermented sausages elaborated with lípase from *Cándida cylindracea*. Comparison with traditional formulations. *Meat Science* 40: 55-61.
958. Zalacain, I.; Zapelena, M.J.; Paz de Peña, M.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1997a. Use of lipase from *Rhizomucor miehei* in dry fermented sausages elaboration: microbial, chemical and sensory analysis. *Meat Science* 45: 99-105.
959. Zalacain, I.; Zapelena, M.J.; Paz de Peña, M.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1997b. Application of lipozyme 10,000 L (from *Rhizomucor miehei*) in dry fermented sausage technology: study in a pilot plant and at the industrial level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1972-1976.
960. Zalacain, I.; Zapelena, M.J.; Paz de Peña, M.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1997c. Lipid fractions of dry fermented sausages change when starter culture and/or *Aspergillus* lipase are added. *Journal of Food Science* 62: 1076-1079.
961. Zanardi, E.; Dorigoni, V.; Badiani, A.; Chizzolini, R. 2002. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing conditions. *Meat Science* 61: 7-14.
962. Zanardi, E.; Ghidini, S.; Battaglia, A.; Chizzolini, R. 2004. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science* 66: 415-423.
963. Zanardi, E.; Novelli, E.; Ghiretti, G.P.; Dorigoni, V.; Chizzolini, R. 1999. Colour stability and vitamin E content of fresh and processed pork. *Meat Science* 67: 163-171.
964. Zapelena, M.J.; Ansorena, D.; Zalacain, I.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1998. Dry fermented sausages manufactured with different amounts of commercial proteinases: evolution of total free α -NH₂-N groups and sensory evaluation on the texture. *Meat Science*. 49: 213-221.
965. Zapelena, M.J.; Zalacain, I.; Paz de Peña, M.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1997a. Addition of a neutral proteinase from *Bacillus subtilis* (Neutrase) together with a starter to a dry fermented

- sausage elaboration and its effect on the amino acid profiles and the flavor development. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 472-475.
- 966.** Zapelena, M.J.; Zalacain, I.; Paz de Peña, M.; Astiasarán, I.; Bello, J. 1997b. Effect of addition of a neutral proteinase from *Bacillus subtilis* (Neutrase) on nitrogen fractions and texture of Spanish fermented sausage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 2798-2801.
- 967.** Zee, J.A.; Simard, R.E.; Vaillancourt, R.; Boudreau, A. 1988. Effct of *Lactobacillus brevis*, *Saccaromyces uvarum* and grist composition on amine formations in beer. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal 14: 321-325.
- 968.** Ziegler, G.R.; Rizvi, S.S. H.; Acton, J.C. 1987. Relationship of water content to textural characteristics, water activity, and thermal conductivity of some commercial sausages. Journal of Food Science 52: 901-905, 915.

