



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos  
Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas  
Protectoras**

**INÊS FILIPA MARTINS DE ALMEIDA**

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

**Presidente:**

Doutor José António Mestre Prates

**Vogais**

Doutor António Salvador Ferreira  
Henriques Barreto

Doutora Teresa de Jesus da Silva  
Matos

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres  
Ferreira

**ORIENTADOR**

Doutora Teresa de Jesus da Silva  
Matos

**CO-ORIENTADOR**

Doutor António Salvador Ferreira  
Henriques Barreto

2009

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos Tradicionais  
Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras

Dissertação em Medicina Veterinária

**INÊS FILIPA MARTINS DE ALMEIDA**

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

**Presidente:**

Doutor José António Mestre Prates

**Vogais:**

Doutor António Salvador Ferreira  
Henriques Barreto

Doutora Teresa de Jesus da Silva  
Matos

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres  
Ferreira

**ORIENTADOR:**

Doutora Teresa de Jesus da Silva  
Matos

**CO-ORIENTADOR:**

Doutor António Salvador Ferreira  
Henriques Barreto

2009

LISBOA

Aos meus Pais, à Ana e  
Filipe pela dedicação,  
compreensão, inspiração  
e prestabilidade.  
Ao Manuel.  
Ao Tiago.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de manifestar a minha mais profunda gratidão àqueles que, de uma forma directa ou indirecta, ajudaram à realização deste trabalho, disponibilizando meios materiais, o saber e encorajamento.

À Professora Doutora Teresa Matos, orientadora científica, quero expressar o meu profundo reconhecimento pela sua inteira disponibilidade em compartilhar os seus conhecimentos e experiência, pelo entusiasmo com que sempre apoiou o trabalho realizado e pela amizade e apoio incondicional que sempre manifestou, a minha sincera estima e gratidão.

Ao Professor Doutor António Barreto, da Faculdade de Medicina Veterinária, manifesto o meu agradecimento por toda a disponibilidade, apoio, interesse e incentivo demonstrados e ainda pelos ensinamentos e sugestões, o meu profundo reconhecimento e gratidão.

À Professora Doutora Marília Ferreira e ao Professor Doutor José António Prates o meu agradecimento e reconhecimento pela vossa inteira disponibilidade em compartilhar comigo a larga experiência e pelo apoio que demonstraram.

À Dra. Belmira Carrapiço expressei igualmente o meu agradecimento pelo apoio e amizade que nunca deixou de me oferecer.

Parte dos resultados desta tese foram utilizados para a realização dos seguintes trabalhos:

Almeida, I.M., Barreto, A.S.H., Matos, T.J.S. - Mycological characterization of Portuguese traditional dry sausages (in modified atmosphere package) MicroBiotec 09 (Vilamoura 28, 29 e 30 de Novembro)

Almeida, I., Matos, T. J., Barreto, A. S. - Actividade lipolítica de leveduras em enchidos tradicionais portugueses (Lipolytic activity of yeasts in Portuguese traditional dry sausages) – 4º Congresso de Ciências Veterinárias (Santarém, 27 a 29 de Novembro)



## Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras

### RESUMO

Os produtos cárneos tradicionais (enchidos) apresentam uma grande variedade comercial, como resultado da diversidade das matérias-primas, dos ingredientes e dos processos de fabrico utilizados. A qualidade do produto pode estar em causa sempre que se desenvolvem microrganismos que comprometam o sabor, o cheiro, a consistência e o aspecto destes produtos, ou seja, microrganismos envolvidos em processos glucolíticos, proteolíticos e lipolíticos. A presença de leveduras lipolíticas pode afectar a qualidade destes géneros alimentícios. A  $\beta$ -oxidação peroxissomal das leveduras resulta na produção de peróxido de hidrogénio e ácidos gordos livres pela degradação incompleta dos triacilgliceróis.

A micoflora dos enchidos tem, por isso, manifesta influência na decomposição, afectando assim negativamente a qualidade deste tipo de produtos.

Foram efectuados isolamentos e contagens da micoflora de contaminação de morcelas, chouriços, farinheiras e linguiças, embalados em atmosferas protectoras, em duas fases distintas do circuito comercial, de forma a avaliar o teor destes agentes: no início e no fim do prazo de validade do produto.

Cada tipo de colónia isolada foi observada para caracterização das morfologias (macro e microscópica) e para identificação bioquímica até à espécie. A identificação das leveduras foi realizada em galerias bioquímicas convencionais e a leitura das provas bioquímicas foi efectuada automaticamente através do sistema ATB. Cada levedura identificada foi submetida a testes para detecção de actividade lipolítica. Utilizando Tributirina Agar foram consideradas positivas as colónias que exibiam halos transparentes na sua periferia.

Na primeira fase do estudo (início do prazo de validade), 75,00% das amostras foram positivas e apresentaram contagens entre 5,9 log UFC/g e 1,8 log UFC/g. Na segunda fase do estudo (fim do prazo de validade), apenas 33,33% das amostras foram positivas (contagens entre 5,7 log UFC/g e 3,4 log UFC/g); registando-se assim uma considerável redução no teor das leveduras.

Identificaram-se *Saccharomyces cerevisiae* (53,57%), *Candida pelliculosa* (41,00%), *C. holmii* (1,32%), *Zygosaccharomyces* spp. (0,86%), *Kloeckera japonica* (0,04%) e *Penicillium* spp. A actividade lipolítica foi detectada em 98,60% dos isolados de leveduras estudadas.

Palavras-Chave: Produtos cárneos, Qualidade, Micoflora, Actividade Lipolítica

## **Preliminary Characterization of Mycobiota in Portuguese traditional dry sausages packed in modified atmospheres**

### **ABSTRACT**

Portuguese traditional meat products exhibit a great commercial variety, as a result of its raw materials, ingredients and processing diversity. Several microorganisms (lipolytic, glucolytic and proteolytic microorganism) can develop in dry smoked sausages and undertake changes on their taste, smell, consistency, flavour and aspect. Considering so, the presence and development of lipolytic yeasts can affect these products quality. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation of yeasts results in the production of hydrogen peroxide and free fatty acids due to their incomplete degradation.

In this way, mycobiota of these products has a great influence on their quality.

Random samples of Portuguese traditional dry sausages – “morcelas”, “chouriços”, “farinheiras” and “linguiças”, packed in modified atmospheres, were collected and subjected to mycological evaluation, both in the beginning and at the end of the shelf life of the products.

Yeast colonies were enumerated and each isolated colony was observed microscopically for morphological characterization and identification at genus level. Yeast identification was based in biochemical conventional kits. Lipolytic activity was tested using Tributyrin Agar. Positive colonies exhibit rise to clear digested zones surrounding the colonies.

In the first study phase (in the beginning of the shelf life), 75.0% of the samples were positive and with 5.9 log UFC/g to 1.8 log UFC/g. In the second study phase (at the end of the shelf life) only 33.3% of the samples were positives (with 5.7log UFC/g to 3.4 log UFC/g). *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa* (41%), *C. holmii* (1.32%), *Zygosaccharomyces* spp. (0.86%), *Kloeckera japonica* (0.04%) and *Penicillium* spp were isolated. 98.6% of them revealed lipolytic activity.

Key – words: Meat products, quality, mycobiota, lipolytic activity.

<b>ÍNDICE GERAL</b>	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
2.1. DESCRIÇÃO DOS ENCHIDOS TRADICIONAIS PORTUGUESES	4
2.1.1. Definição de enchidos	4
2.1.2. Composição e Estrutura	6
2.1.3. Ingredientes essenciais dos enchidos	9
2.1.4. Composição química e estrutura da carne de porco e da gordura	11
2.1.4.1. Proteínas	13
2.1.4.2. Gorduras	13
2.1.4.3. Hidratos de Carbono	16
2.1.4.4. Cinzas	16
2.1.4.5. Factores que influenciam na composição da carne	17
2.2. PROCESSO DE FABRICO DE ENCHIDOS	17
2.2.1. Selecção da matéria-prima: escolha	18
2.2.2. Miga	18
2.2.3. Preparação da massa e condimentação	18
2.2.3.1. Principais condimentos utilizados	18
2.2.4. Cura	21
2.2.4.1. Sais utilizados na cura	21
2.2.4.1.1. Cloreto de sódio	21
2.2.4.1.2. Nitratos e Nitritos	22
2.2.4.2. Principais aditivos utilizados na cura de carnes	24
2.2.4.2.1. Açúcar	24
2.2.4.2.2. Fosfatos e polifosfatos	25
2.2.4.2.3. Ácido ascórbico e sais	25
2.2.5. Maturação	26
2.2.6. Enchimento	26
2.2.7. Atadura e picado	26

<b>ÍNDICE GERAL (continuação)</b>	Pág.
2.2.8 Tratamentos para produtos curados crus e cozidos	27
2.2.8.1. Escaldão / Cozedura	27
2.2.8.2. Secagem	27
2.2.8.3. Fumagem	28
2.2.9. Evolução dos parâmetros físico-químicos	29
2.2.9.1. Actividade da água	30
2.2.9.2. pH	30
2.2.10. Evolução do microbiota saprófita dos enchidos	31
2.2.10.1. Bactérias ácido-lácticas	32
2.2.10.2. Leveduras e bolores	32
<b>2.3. QUALIDADE SENSORIAL DOS ENCHIDOS</b>	<b>34</b>
2.3.1 Análise sensorial dos enchidos	34
2.3.1.1. Propriedades sensoriais dos enchidos	35
2.3.2. Defeitos nos enchidos. Alterações na qualidade	37
2.3.2.1 Efeitos na textura e aspecto	37
2.3.2.2. Defeitos no sabor e odor	39
2.3.4. Influência dos microrganismos na qualidade sensorial dos enchidos	39
2.3.4.1 Efeitos do microbiota saprófita	39
<b>2.4. ACTIVIDADE LIPOLÍTICA DAS LEVEDURAS</b>	<b>42</b>
2.4.1. Lipases	42
2.4.2. Leveduras lipolíticas	42
2.4.2.1. Lipólise peroxissomal	44
2.4.2.2. Produtos da $\beta$ -oxidação peroxissomal	46
<b>3. OBJECTIVOS</b>	<b>47</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
4.1. AMOSTRAGEM	48
4.2. ISOLAMENTO E CONTAGENS DE LEVEDURAS E BOLORES	49
4.2.1. Preparação da amostra	49
4.2.2. Exame micológico	49

<b>ÍNDICE GERAL (continuação)</b>	Pág.
4.2.3. Pesquisa da actividade lipolítica	50
4.2.4. Identificação do micobiota	50
<b>5. RESULTADOS</b>	41
5.1 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS EM FUNÇÃO DO PRODUTO	51
5.1.1 Morcelas	51
5.1.2. Chouriços	53
5.1.3. Farinheiras	53
5.1.4. Linguiça	54
5.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS EM FUNÇÃO DO PRODUTO	54
5.2.1. Morcelas	57
5.2.2. Chouriços	58
5.2.3. Farinheiras	58
5.2.4. Linguiça	59
5.2.5. Actividade lipolítica	59
<b>6. DISCUSSÃO</b>	61
<b>7. CONCLUSÕES</b>	66
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	67

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Formação de óxido nítrico a partir de nitrato de sódio.	22
<b>Figura 2.</b> Mudanças químicas da mioglobina durante as reacções de cura	24
<b>Figura 3.</b> Formação de óxido nítrico a partir da reacção entre ácido ascórbico e nitrito.	25
<b>Figura 4.</b> Enzimas da $\beta$ -oxidação peroxissomal nas leveduras.	45
<b>Figura 5.</b> Leveduras e bolores em meio de Agar Dichloran Rose Bengal Chlortetracycline de uma amostra de Farinheira	49
<b>Figura 6.</b> Sistema API, ID32C – Bio-Merieux, 32200	50
<b>Figura 7.</b> Contagem micológica total por amostra de morcelas no início e no fim do prazo de validade (PV) dos produtos	52
<b>Figura 8.</b> Contagem micológica total por amostra de chouriços no início e no fim do prazo de validade (PV) dos produtos.	53
<b>Figura 9.</b> Contagem micológica total por amostra de farinheiras no início e no fim do prazo de validade (PV) dos produtos.	54
<b>Figura 10.</b> Percentagens da contagem de UFC de leveduras no início do prazo de validade.	57
<b>Figura 11.</b> Percentagens da contagem de UFC de leveduras no fim do prazo de validade	57
<b>Figura 12.</b> Teores micológicos em Morcelas na 1ª Fase do Estudo Analítico (início do prazo de validade)	57
<b>Figura 13.</b> Teores micológicos em Morcelas na 2ª Fase do Estudo Analítico (fim do prazo de validade)	58
<b>Figura 14.</b> Teores micológicos em Farinheiras na 1ª Fase do Estudo Analítico (início do prazo de validade)	55
<b>Figura 15.</b> Teores micológicos em Farinheiras na 2ª Fase do Estudo Analítico (fim do prazo de validade)	58
<b>Figura 16.</b> Aparência macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em Tributirina Agar, com actividade lipolítica.	59
<b>Figura 17.</b> Aparência macroscópica de <i>Kloeckera japonica</i> em Tributirina Agar, sem actividade lipolítica.	60

<b>ÍNDICE DE QUADROS</b>		<b>Pág.</b>
<b>Quadro 1.</b>	Ingredientes essenciais e facultativos dos enchidos tradicionais portugueses.	7
<b>Quadro 2.</b>	Características físico-químicas dos enchidos tradicionais portugueses.	8
<b>Quadro 3.</b>	Formato e dimensões dos enchidos tradicionais portugueses.	8
<b>Quadro 4.</b>	Composição química (g/100g) e conteúdo energético (Kcal/100g) médio da carne magra, crua e da gordura de alguns animais de abate.	10
<b>Quadro 5.</b>	Composição centesimal da carne de porco.	12
<b>Quadro 6.</b>	Composição em ácidos gordos e triacilgliceróis em depósitos de gordura subcutânea.	14
<b>Quadro 7.</b>	Teor relativo de ácidos gordos saturados e insaturados da carne de porco.	15
<b>Quadro 8.</b>	Teores médios de colesterol (mg/100 g).	15
<b>Quadro 9.</b>	Conteúdo de minerais em diferentes tecidos e alimentos.	16
<b>Quadro 10.</b>	Efeitos inibidores de algumas especiarias e ervas aromáticas.	19
<b>Quadro 11.</b>	Natureza química e acção de alguns condimentos.	21
<b>Quadro 12.</b>	Principais produtos originados durante o processo de fumagem.	28
<b>Quadro 13.</b>	Controlo das condições do fumeiro usado na secagem, fumagem e cozedura.	29
<b>Quadro 14.</b>	Valores médios ou intervalos de valores de pH e $a_w$ da carne e de produtos cárneos portugueses.	30
<b>Quadro 15.</b>	Características organolépticas exteriores e interiores dos enchidos tradicionais portugueses.	35
<b>Quadro 16.</b>	Etapas da análise sensorial da textura da carne e dos produtos à base de carne.	36
<b>Quadro 17.</b>	Principais defeitos de enchidos e sua relação com o microbiota.	41
<b>Quadro 18.</b>	Espécies de leveduras lipolíticas e localização celular das enzimas lipolíticas	43
<b>Quadro 19.</b>	Identificação das amostras analisadas.	48
<b>Quadro 20.</b>	Teores micológicos encontrados no início e no fim da vida comercial útil de produtos de salsicharia tradicional portugueses embaladas em atmosferas protectoras.	51
<b>Quadro 21.</b>	Distribuição do micobiota total identificado na 1ª Fase do estudo por amostra.	55
<b>Quadro 22.</b>	Distribuição do micobiota total identificado na 2ª Fase do estudo por amostra.	56

## Abreviaturas E Símbolos

$a_w$  – Actividade da água

CoA – Coenzima A

COPS - Produtos de oxidação do colesterol

DOP – Denominação de Origem Protegida

EFSA – European Food Safety Agency (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

Eh – Potencial de oxidação-redução

et al. – *et alii*

ETG - Especialidade Tradicional Garantida

FSIS - Food Safety Inspection Service

HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Points (Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos)

IGP - Indicação Geográfica Protegida

Kcal – Quilocaloria

NP – Norma Portuguesa

pH - Potencial hidrogeniónico

PV – Prazo de validade

QPS - Qualified Presumption of Safety (presuntivamente qualificado seguro)

SI – Sistema Internacional de Unidades

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

As unidades utilizadas seguem as unidades básicas (grandeza massa) e derivadas (grandeza temperatura) do Sistema Internacional de Unidades (SI) e para a grandeza tempo unidades não SI em uso com o Sistema Internacional.

## 1. INTRODUÇÃO

As características orográficas do território nacional e a miríade de povos ou sociedades que se foram entrecruzando no território português ao longo da História, deram origem a uma fusão de culturas muito especial.

Entre as melhores expressões dessa fusão de influências que se conjugaram para encontrar soluções engenhosas que permitiram maximizar a utilização dos por vezes fracos recursos disponíveis, citam-se os produtos tradicionais portugueses. Os queijos dos Pastores Lusitanos dos montes Hermínios, o azeite, o vinho e as conservas de peixe dos Romanos, as azeitonas e os frutos secos dos Gregos, as carnes salgadas e os enchidos dos Visigodos e dos Judeus, as compotas dos monges de Cister, os cominhos, a canela e a pimenta desembarcados da Índia, o açúcar do Brasil. Tudo religiosamente guardado nas mais recônditas memórias no fundo dos vales e nas encostas das serras de Portugal; nas aldeias medievais, nos montes esquecidos da planura alentejana; tudo modelado pela alquimia das talhas, das dornas, dos alguidares, dos odres, dos fumeiros, dos roupeiros, nas melarias, das atafonas, das barricas de sal e dos fornos de lenha. Tudo memória, tudo cultura, tudo ancestralidade.

Os produtos alimentares tradicionais são um testemunho da memória, um valor que emerge do saber empírico, apurado pelo engenho, consagrado pelos laços afectivos que nos ligam às nossas origens; uma referência às nossas raízes mais sólidas e uma convocatória aos sentimentos que nutrimos pelos símbolos distintivos da nossa singularidade.

De facto, os nossos antepassados foram apurando saberes, afirmando sabores, cuidando de manter reserva nos pormenores, dos segredos milenares que ciosamente foram passando de geração em geração até chegarem aos nossos dias.

Carnes de vitela, de anho, de cabrito, de leitão, de porco, de caça, ervas aromáticas, sal, condimentos, são salgadas, malaxadas, fermentadas, curadas, fumadas, maturadas, escaladas, cozidas, salmouradas, esmiuçadas, enchidas, ensacadas, assadas, escaldadas secas, submetidas a manipulações cheias de pequenas sabedorias empíricas ou artesanais; produzidos com os sedimentos da experiência ancestral e da tradição; impregnados, por vezes, de afectividade e de simbolismos.

Paços, paiolas, painhos, salpicões, chouriços, linguiças, morcelas, farinheiras, alheiras, presuntos, duros, ácidos, avinhados, moles, doces, acres, ásperos, picantes, salgados, frescos. Todo um universo de possibilidades de gostos, de paladares, que povoam a nossa memória colectiva e que são um acervo de saberes únicos, modos de produção ancestrais, perpetuados, genuínos, respeitadores do ambiente, das terras e dos Homens..

Com a globalização e a adesão natural a novos hábitos de consumo, as sociedades ocidentais tendem a partir em busca de soluções mais simples e práticas para resolver o problema das suas rotinas alimentares. Nesta perspectiva adoptam-se

comportamentos alimentares relativamente padronizados, indiferenciados, iguais aos de todos os outros cidadãos de qualquer parte do mundo. Por vezes alguns dos enchidos tradicionais portugueses não se adaptam exactamente às necessidades restritivas de determinados regimes dietéticos, especialmente os que buscam o emagrecimento. Por isso muitos dos nossos produtos tradicionais não devem ser ingeridos na ração diária de modo sistemático. Os produtos alimentares tradicionais são mais vocacionados para assumir a dimensão de uma iguaria, de um acepipe, de uma quase relíquia, que encerra também em si toda a carga simbólica ligada à tradição, à cultura e à memória das coisas boas que herdámos dos nossos antepassados.

Os modos de produção alimentares portugueses são parte integrante do Mercado Único da União Europeia. Neste contexto estamos naturalmente obrigados a cumprir as regras e respeitar os requisitos que sejam considerados fundamentais para o funcionamento do Mercado interno europeu. Os produtos alimentares tradicionais portugueses não são excepção; são parte integrante desse “Mercado”, embora a uma escala quase insignificante, em termos económicos.

Para se poderem produzir e colocar géneros alimentícios nesse “Mercado” é necessário cumprir uma série de regras que têm vindo a ser estabelecidas, com maior rigor, pela União Europeia desde 2002. Essas regras estão estabelecidas em legislação nacional e comunitária e fundamentam-se em conhecimentos científicos e técnicos. Actualmente os diplomas europeus da “Segurança sanitária dos alimentos” são baseados na “melhor ciência”.

A legislação fundamental que enquadra as actividades de produção de géneros alimentícios corresponde genericamente aos Regulamentos (CE) n.º 178/2002 de 28/01; n.º 852 e 853/2004 de 29/04. O controlo oficial que é necessário exercer sobre os sistemas e modos de produção organiza-se nos moldes estabelecidos no Regulamento (CE) n.º 882/2004 de 29/04. Nestes regulamentos estabelecem-se princípios e regras que têm de ser respeitadas por todos os operadores económicos europeus do sector alimentar. A citada legislação estabelece que a responsabilidade pela garantia de que os alimentos produzidos não prejudicam a saúde dos consumidores, cabe inteiramente aos agentes económicos desses géneros alimentícios. Para isso têm de aplicar um sistema de controlo interno baseado nos princípios do HACCP. Esse sistema assenta numa metodologia de base científica que se reveste de alguma complexidade e exige um elevado nível de especialização por parte de quem a aplica.

Ora entre a ciência e a tecnologia em que assentam a legislação europeia e o empirismo das características artesanais da maior parte dos produtos alimentares tradicionais portugueses, existe um abismo colossal. Entre os graus centígrados que são monitorizados pelos sensores termo-pares electrónicos que registam automaticamente e corrigem as temperaturas de maturação das pastas de carne que são usadas no fabrico industrial de uma salsicha e as mãos de uma artesã transmontana que acariciam diariamente as carnes do alguidar, migadas e mantidas

durante cinco dias temperadas nas vinhas-de-alho, há um mundo de distância que não se pode mensurar. Se não é possível medir não existe “ciência”. E assim é de facto: os produtos tradicionais são sobretudo “arte”, saberes que transcendem a frias regras da Física ou da Química.

Para adequar as disposições legais europeias, fazê-las cumprir e até fiscalizar a sua aplicação, colocam-se, a este propósito, múltiplos desafios, quer às entidades reguladoras quer, sobretudo, aos próprios artesãos. Recentemente foram adoptadas medidas especiais para protecção dos produtos tradicionais produzidos a uma escala artesanal.

Também os técnicos que dão apoio a este tipo de produções têm de ser capazes de distinguir entre o que é artesanal e o que é industrial, entre o que é tradicional e o que é típico, entre o que é verdadeiramente empírico e o que é uma tentativa de imitação do empirismo.

Sempre que um enchido tradicional, como por exemplo a “Alheira de Mirandela” ou a “Morcela de Portalegre” deixa de ser produzido a uma escala doméstica ou artesanal e passa para uma escala de produção industrial, obviamente que, embora estejamos perante produtos tradicionais, não deixam de ter de obedecer às regras que se aplicam a todos os géneros alimentícios industrializados. Industrialização significa ciência e portanto capacidade para medir fenómenos físicos, químicos e biológicos.

Os regulamentos anteriormente citados prevêm expressamente no seu articulado que as legislações de cada Estado Membro possam flexibilizar as exigências em termos de cumprimento dos procedimentos de auto-controlo (ou do HACCP) por parte dos operadores. Essa flexibilização pode ocorrer sempre que o modo de produção tiver um baixo índice de desenvolvimento tecnológico e o volume de produção for reduzido e/ou temporário ou sazonal. As regras e os critérios que definem o modo como se podem flexibilizar estas exigências têm de ser devidamente fundamentadas e comunicadas oficialmente à Comissão Europeia.

Uma das formas de o procedimento de registo se tornar mais célere é o recurso à apresentação de Manuais de Boas Práticas, produzidos pelas associações respectivas. Nesses manuais estão contidos, de modo resumido, os requisitos a que se refere o parágrafo 3, do art. 2º do Despacho Regulamentar n.º 38/2008 de 4 de Julho.

Existe hoje a consciência generalizada de que os produtos alimentares tradicionais oriundos de diferentes zonas do território nacional, são motores da valorização económica dos recursos locais e do acesso ao emprego e ao rendimento, e contribuem para potenciar o índice demográfico local, a iniciativa empresarial, a relação com factores de inovação e com o mercado. Estas produções, para além de terem uma História, são um factor importante na ajuda ao rendimento dos pequenos produtores rurais e das respectivas famílias. Esta importância tem evoluído ao longo do tempo, e conhecido valorizações que concorrem para ajustamentos económicos e para gerar oportunidades.

A protecção e a manutenção de uma matriz produtiva com condições de valorização no mercado e de criação de emprego nas zonas rurais, interiores e já desertificadas, ajudam na convergência para a sustentabilidade.

É evidente que a ciência tem de dar alguns contributos para que estes produtos possam ir encontrando progressivamente as fundamentações técnicas que são necessárias à respectiva sustentabilidade. Uma das questões a que urge dar consistência científica adequada é a das evidências analíticas em que assenta a atribuição dos tempos de vida comercial atribuídos a estes produtos.

No caso dos enchidos tradicionais portugueses os fungos constituem um dos grupos microbianos que normalmente é responsabilizado pela respectiva decomposição. Para obstar a essa acção decompositora desencadeada pelos fungos utilizam-se, a nível industrial, acondicionamentos físicos que limitam a possibilidade de desenvolvimento desses agentes, tornando-se assim possível prolongar a vida comercial destas produtos. O objecto deste trabalho centra-se em torno do efeito das atmosferas sobre o microbiota que coloniza aqueles enchidos.

Os enchidos tradicionais portugueses, para além de constituírem uma marca da cultura e da etnografia nacional, são um património socioeconómico muito importante para a sustentabilidade do meio rural e das macroeconomias locais, gerando independência económica, emprego e modos de subsistência autónomos. O fabrico e comércio de enchidos tradicionais estão entre as manifestações da cultura popular mais perenes em Portugal.

As principais ameaças à preservação deste património, tão especial, pode decorrer quer da diminuição do número de pessoas que se dedicam à actividade, quer da intervenção das autoridades oficiais que, por força da aplicação da legislação europeia, possam vir a impor regras desproporcionais e desajustadas da realidade socioeconómica em que estas actividades se inscrevem. A maior parte das pequenas produções de enchidos tradicionais portugueses é efectuada no meio rural, com baixos índices de desenvolvimento tecnológico e técnico-científico o que constitui um sério obstáculo à adopção de práticas harmonizadas com a cada vez mais exigente legislação europeia.

A caracterização do microbiota dos enchidos tradicionais portugueses reveste-se de interesse na medida em que a composição bioquímica das diferentes matrizes e as características ecológicas intrínsecas destes produtos são propícios ao desenvolvimento de fungos osmofílicos e lipofílicos. Estes agentes podem ter dois tipos de papéis principais:

- Por um lado beneficiar as características organolépticas de alguns produtos, especialmente os que são sujeitos a processos de maturação, beneficiando o sabor, o aroma e a consistência;
- Por outro, podem ser responsáveis pela conservação dos enchidos na medida em que os fungos se conseguem multiplicar nestas matrizes mais ácidas, mais salgadas e mais secas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. DESCRIÇÃO DOS ENCHIDOS TRADICIONAIS PORTUGUESES

#### 2.1.1. Definição de enchidos

Os enchidos são produtos cárneos pertencentes ao grupo dos preparados à base de carne, os quais se definem como produtos transformados resultantes da transformação da carne ou da ulterior transformação desses produtos transformados, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca (Regulamento (CE) n.º 853/2004). A elaboração de enchidos constitui uma forma de conservação da carne.

O termo carne curada é aplicado numa vasta gama de produtos cárneos, apesar do seu significado depender com o tipo de produto e o seu país de origem. Tradicionalmente, um produto cárneo curado implica a utilização de um sal (cloreto de sódio, nitrato ou nitrito) que produz colorações e sabores característicos no produto.

Os enchidos tradicionais portugueses são produtos únicos que têm normalmente origem em zonas geográficas que são, em regra, associadas à respectiva designação comercial, e que têm uma forte ligação ao desenvolvimento dessa região, de tal forma que é possível demonstrar que a qualidade do produto é influenciada pelas raças animais, pela natureza dos solos, da vegetação, do clima e pela tecnologia de fabrico.

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

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

O processo de certificação é um recurso importante para a protecção destes produtos, uma vez que, para além de se procurar assegurar as condições de higiene com que estes são produzidos, também se busca o respeito pelos métodos de fabrico tradicionais, garantindo, assim, a autenticidade e a origem dos produtos.

Entre a enorme variedade de enchidos produzidos em Portugal, podem destacar-se:

- a) Alheira** – enchido curado pelo fumo, constituído por carne de diversas espécies (carne de vitela, de porco e de animais de capoeira, ou de espécies

cinégéticas) por pão e gordura de porco adicionadas de certos condimentos e aditivos legalmente autorizados (NP 598 (1969)).

**b) Chouriço de carne** – enchido fumando e/ou curado de calibre estreito e de formato variável constituído por carne de suíno e gordura rija de suíno, em fragmentos macroscopicamente visíveis, adicionados de condimentos e aditivos (NP 589 (2006)) O chouriço de carne pode ser classificado de: Chouriço de carne tradicional, Chouriço de carne extra (com teor de gordura livre inferior a três vezes do teor em proteína total) e Chouriço de carne corrente (com teor de gordura livre inferior ao dobro do teor em proteína total)

**c) Chouriço mouro** – enchido curado pelo fumo e constituído sobretudo por gorduras e vísceras de porco, frescas ou tratadas pelo frio, finamente fragmentadas, adicionadas de condimentos (sal, pimenta e cravinho) e aditivos. Exteriormente apresenta uma cor negra, brilhante, consistência semi-mole. Ao corte, a massa deve ser homogénea, perfeitamente ligada de aspecto marmoreado e brilhante (NP 595 (1990)).

**d) Chouriço de sangue** – enchido tratado por escaldão, constituído basicamente por sangue e gorduras de porco, adicionados de condimentos, nomeadamente, pimenta, vinagre e cravinho e aditivos (NP 594 (1990)).

**e) Morcela** – enchido tratado por escaldão e/ou fumo, constituído basicamente por gorduras de porco, finamente fragmentadas, e sangue, adicionados de condimentos e aditivos (NP 593 (1990)). Os ingredientes essenciais são as gorduras macias, picada e sangue fresco de porco.

**f) Linguiça** – enchido fumado constituído exclusivamente por carne e gordura de porco picadas, adicionadas de condimentos e, eventualmente, aditivos (NP 590 (1989)), cujo teor de gordura livre seja inferior a duas vezes e meia o teor em proteína total

**g) Cacholeira** – enchido tratado por escaldão e/ou pelo fumo, constituído por fígado, e outros órgão internos, e gorduras de porco frescas ou tratadas pelo frio, finamente fragmentados e adicionados de condimentos e aditivos. Exteriormente tem cor castanha escura, baça ou brilhante, consoante o tipo, consistência semi-mole (NP 596 (1990)).

**h) Salpicão** – enchido volumoso curado pelo fumo, constituído exclusivamente por carnes e gorduras de porco (gordura rija em quantidade não superior a 20% da massa), frescas ou tratadas pelo frio, pouco fragmentas, adicionadas de certos condimentos e aditivos legalmente autorizados (NP 591 (1989)).

**i) Farinheira** – enchido curado pelo fumo, de massa grumosa, em forma de ferradura ou direita, constituída por gorduras de porco (não inferior a 45% da massa total dos ingredientes utilizados), frescas ou tratadas pelo frio, farinha de trigo, adicionadas dos condimentos tradicionais e aditivos (NP 597 (1983))

## 2.1.2 Composição e Estrutura

Tendo em conta as descrições acima mencionadas, os enchidos tradicionais portugueses são, à semelhança dos outros enchidos, constituídos essencialmente por carne de porco (com excepção da farinheira e da alheira) e gordura de porco (Quadro 1). Desta forma, interessa caracterizar os enchidos tradicionais portugueses de acordo com as suas características físico-químicas (Quadro 2).

**Quadro 1.** Ingredientes essenciais e facultativos dos enchidos tradicionais portugueses.

	Ingredientes Essenciais	Ingredientes facultativos
Alheira NP 598 (1969)	Carne de vitela, de porco e de animais de capoeira, ou espécies cinegéticas, pão de trigo, gorduras macias de porco, presunto curado	Sal, pimenta, alho, azeite
Chouriço de Carne NP 589 (2006)	Carne de suíno Gordura rija de suíno	Couratos, água, pimentão, alho, vinho, sangue e/ou hemoglobina em quantidade estreitamente necessária para reforçar a cor, sal, açúcar e/ou dextrose, especiarias, aromas e fumo líquido (apenas para chouriço de carne corrente e para chouriço de carne extra), proteínas de origem animal e/ou vegetal (apenas para chouriço de carne corrente)
Chouriço mouro NP 595 (1990)	Gorduras macias fragmentadas, bucho e tripa grossa previamente cozidos e, eventualmente, vísceras torácicas, sangue	Tecido muscular, sal, pimenta, cominhos.
Morcela NP 593 (1990)	Gorduras macias, picadas e sangue fresco de porco	Produtos ricos em amido, sal, pimenta, cominhos
Linguiça NP 590 (1989)	Carne e gordura rija de proso isentam de courato	Massa de pimentão, colorau, alho, sal
Farinheira NP 597 (1983)	Gordura de porco, fresca ou tratado pelo frio, farinha de trigo, água potável	Sal refinado, vinho branco

**Quadro 2.** Características físico-químicas dos enchidos tradicionais portugueses.

	Características físico-químicas
Chouriço de Carne NP 589 (2006)	<p><b>Chouriço de carne tradicional</b></p> <p>Relação fosfatos/proteínas inferior ou igual a 0,03 %. Sempre que este valor for superior, deverá ser demonstrado que o fosfato já existia em excesso na matéria-prima ou que não foi adicionado no processo de fabrico, através de registos da rastreabilidade.</p> <p><b>Chouriço de carne extra:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gordura livre: inferior ao dobro do teor em proteínas totais</li> <li>- Proteínas totais: mín. 19 %</li> <li>- Humidade do produto desengordurado: inferior a 65 %</li> <li>- Colagénio: inferior a 13 % do teor de proteínas totais</li> </ul> <p><b>Chouriço de carne corrente:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gordura livre: inferior a três vezes ao teor em proteínas totais</li> <li>- Proteínas totais: mín. 16 %</li> <li>- Humidade do produto desengordurado: inferior a 65 %</li> <li>- Colagénio: inferior a 30 % do teor de proteínas totais</li> </ul>
Linguiça NP 590 (1989)	<p>Gordura total – inferior a duas vezes e meia ao teor de proteína total</p> <p>Proteína total – mínimo 17 %</p> <p>Humidade do produto desengordurado: inferior a 65%</p> <p>Colagénio – inferior a 13 % do teor de proteína bruta</p>
Farinheira NP 597 (1983)	<p>Gordura – mínimo 38 %</p> <p>Proteínas totais – mín. 6%</p> <p>Humidade – inferior a 5,5 vezes o teor de proteínas (tolerância 10 %)</p>

Quanto à estrutura, forma e dimensão este tipo de produto apresenta uma relativa homogeneidade, tendo, no entanto, que cumprir alguns parâmetros (Quadro 3).

**Quadro 3.** Formato e dimensões dos enchidos tradicionais portugueses.

	Formato e dimensões
Alheira NP 598 (1969)	Formato de ferradura, com comprimento entre 20 e 25 cm.
Farinheira NP 597 (1983)	Forma de ferradura (tradicional) e direita (industrial) com comprimento não superior a 35 cm.

**Quadro 3.** Formato e dimensões dos enchidos tradicionais portugueses (continuação)

	Formato e dimensões
Chouriço de Carne NP 589 (2006)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Chouriço de tradicional: forma de ferradura individualizada por atadura com calibre compreendido entre os 25 e 40 mm e até 50 cm em comprimento linear.</li><li>- Chouriço de carne extra: Forma de ferradura, curva, rectilínea, individualizada por torção, atadura ou dupla clipsagem com calibre compreendido entre os 25 e 40 mm e o comprimento até 50 cm.</li><li>- Chouriço de carne corrente: Forma de ferradura, curva, rectilínea, individualizada por torção, atadura ou dupla clipsagem com calibre compreendido entre os 25 e 40 mm e o comprimento até 50 cm.</li></ul>
Chouriço mouro NP 595 (1990)	Forma de ferradura, curva, rectilínea, individualizada por torção, atadura ou dupla clipsagem, de diâmetro variável, com diâmetro segundo o tipo de tripa utilizado e o comprimento entre 20 a 25 cm.
Chouriço de sangue NP 594 (1990)	Forma de fiada ou de cadeia, comprimento unitário médio, entre 10 a 15 cm.
Morcela NP 593 (1990)	Forma de ferradura, curva, rectilínea, individualizada por torção, atadura ou dupla clipsagem, de diâmetro variável, com diâmetro segundo o tipo de tripa utilizado e o comprimento até 50 cm.
Linguiça NP 590 (1989)	Formato linear, comprimento variável e de diâmetro não superior a 22 mm.
Salpicão NP 591 (1969)	Formato cilíndrico, com 14 a 18 cm de comprimento de 3,5 a 4,5 cm de espessura e para o salpicão bucho (de porco) formato globoso com espessura inferior a 6 cm.

### 2.1.3. Ingredientes essenciais dos enchidos

A carne de porco é a principal matéria-prima da maioria dos produtos cárneos transformados. É essencialmente de origem suína, salvo as alheiras onde são introduzidas as carnes brancas (aves e caça) É classificada de carne magra, uma vez que o teor em gordura se encontra inferior a 5%. A composição química do músculo varia segundo a espécie animal, idade e zona muscular em causa (Pearson e Young, 1992). Em termos gerais, a carne fresca contém cerca de 75% de água, 18% de proteínas, 3,5% de substâncias não proteicas solúveis e 3% de gordura (Quadro 4). O conteúdo energético é relativamente baixo, 112 Kcal/100g de carne crua. Na gordura pura os valores são maiores, em torno de 830 Kcal/100g. Comparando os valores pode-se concluir que a carne de porco é das mais magras e das que possui o valor proteico mais elevado (Tabela de Composição dos Alimentos, 2007).

**Quadro 4.** Composição química (g/100g) e conteúdo energético (Kcal/100g) médio da carne magra, crua e da gordura de alguns animais de abate. (Adaptado de Tabela de Composição dos Alimentos, 2007; SEUß, 1991; Price e Schweigert, 1994)

Carnes	Água	Proteína	Gordura	Minerais	Conteúdo energético
Porco	75,1	22,8	1,2	1,0	112
Vaca	75,0	22,3	1,8	1,2	116
Vitela	76,4	21,3	0,8	1,2	98
Carneiro	75,7	21,4	1,3	1,2	103
Frango – Peito	75,0	22,8	0,9	1,2	105
Frango – Coxa	74,7	20,6	3,1	-	116
Peru – Peito	73,7	24,1	1,0	-	112
Peru – Coxa	74,7	20,5	3,6	-	120
Pato	73,8	18,3	6,0	-	132
Ganso	68,3	22,8	7,1	-	161
Gordura de porco	7,7	2,9	88,7	0,7	812
Gordura de vaca	4,0	1,5	94,9	0,1	854

O operador deverá assegurar que a matéria-prima cumpre todos os requisitos de salubridade, e que são respeitadas as regras de transporte e armazenagem, durante os quais a temperatura não deverá exceder os 4 °C. O controlo das características da matéria-prima é um passo importante para garantir a segurança dos produtos (Incke, 1998).

O termo “carne muscular” (carne em sentido estrito), diz respeito exclusivamente ao tecido muscular esquelético com os vasos, os nervos e os tendões, que representa cerca de 40-50% do peso corporal total (Pearson e Young, 1992). O músculo-esquelético é composto por fibras musculares associadas a pequenas quantidades de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e nervos. As fibras musculares esqueléticas são células musculares que se dispõem longitudinalmente umas sobre as outras formando os músculos (Prandl et al., 1994).

Os múltiplos núcleos da cada fibra muscular encontram-se imediatamente sob a membrana citoplasmática, enquanto que a maior parte do interior da fibra está preenchida por miofibrilas. Entre as miofibrilas estão alojados outros organitos, como numerosas mitocôndrias e grânulos de glicogénio. Cada miofibrilas é uma estrutura filamentosa que se estende de uma extremidade do músculo à outra. As miofibrilas compõem-se de duas espécies de filamentos proteicos chamadas miofilamentos: os finos e os grossos. Estes miofilamentos organizam-se em unidades altamente especializadas chamadas sarcómeros, que se unem topo a topo para formar as miofibrilas (Prandl et al., 1994).

Cada sarcómero estende-se de um disco Z para o disco Z imediato. O arranjo dos miofilamentos finos e grossos dá à miofibrila uma aparência em bandas, estriada quando vista longitudinalmente. Cada banda I (banda clara) inclui um disco Z e estende-se de cada lado do disco Z para as extremidades dos miofilamentos grossos.

A banda I corresponde a miofilamentos finos. Cada banda A (banda escura) corresponde aos miofilamentos grossos. A zona onde os filamentos não se sobrepõem é a banda H (que fica dentro da banda A) (Prandl et al., 1994).

Ao contrário do tecido músculo-esquelético, o tecido muscular cardíaco e os músculos lisos são auto-rítmicos. Isto é, contraem-se em intervalos aproximadamente regulares, sem que seja sempre necessária a estimulação nervosa ou hormonal para essa contração. Além disso, e ao contrário do músculo-esquelético, o músculo liso e o músculo cardíaco não estão sob o controlo consciente directo. Pelo contrário são controlados involuntariamente, ou inconscientemente, pelo sistema nervoso autónomo e pelo sistema endócrino (Prandl et al., 1994).

#### 2.1.4. Composição química e estrutura da carne de porco e da gordura

A composição bioquímica da carne de porco oferece excelentes condições para a multiplicação da maioria dos microrganismos (Quadro 5).

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

Em relação ao pH, a carne fresca apresenta valores de pH compreendido entre 5,6 e 6,2 após conclusão do processo de maturação. A influência destes valores sobre o crescimento dos microrganismos responsáveis pela decomposição da carne é desprezível. Todavia, a taxa de crescimento das enterobactérias e microrganismos psicotróficos é atenuada quando o valor de pH é inferior a 5,8 (Prandl et al., 1994).

O potencial oxidação redução – valor Eh – da carne e órgãos frescos varia sobretudo de acordo com a quantidade dos grupos sulfidrilo presentes nos enchidos e dos grupos Heme da mioglobina. Este parâmetro determina se ocorre preferencialmente o desenvolvimento dos microrganismos aeróbios ou dos anaeróbios. Os processos enzimáticos consumidores de oxigénio, assim como o metabolismo microbiano, diminuem o valor Eh, favorecendo a flora anaeróbia (Prandl et al., 1994).

As substâncias que se originam nos processos metabólicos, tanto dos tecidos corporais, como dos microrganismos, podem influenciar o desenvolvimento do microbiota; é o caso do dióxido de carbono, cuja formação exerce acção inibidora sobre numerosos microrganismos, e os ácidos que se produzem no decorrer da maturação da carne, entre os quais o ácido acético, butírico e o ácido láctico que, em termos quantitativos, é o mais importante (Prandl et al., 1994). Por outro lado, a

ausência de oxigênio favorece os microrganismos anaeróbios estritos, entre os quais se inclui um dos mais perigosos perigos sanitários: *Clostridium botulinum*.

**Quadro 5.** Composição centesimal da carne de porco. (Adaptado de Tabela de Composição dos Alimentos, 2007)

Parâmetro	Unidade	Teor médio	Variação	Parâmetro	Unidade	Teor médio	Variação
Energia	kJ	1439		Equivalentes da niacina	NE	5,47	
Proteína, total	G	15,0	11,1 – 21,5	Niacina	mg	2,8	
Total-N	g	2,40	1,78 – 3,44	Triptofano	mg	2,67	
Gordura, total	g	32,0	19,2 – 45,9	Vitamina B6	mg	0,237	0,164 – 0,306
Ácidos gordos saturados	g	11,7		Ácido pantoténico	mg	0,60	
Ácidos gordos monoinsaturados	g	13,5		Biotina	µg	2.60	1,4 – 4,8
Ácidos gordos poliinsaturados	g	3,58		Folatos	µg	3	
Carboidratos, total	g	0		Vitamina B12	µg	0,7	
Álcool	g	0		Vitamina C	mg	0	
Cinzas	g	0,8		Sódio	mg	55	48,2 – 60,8
Humidade	g	52,8	49,7 - 55,5	Potássio	mg	204	89 - 339
Vitamina A	RE	0		Cálcio	mg	6	4 - 8
Retinol	µg	0	<6	Magnésio	mg	14	5,9 – 24,6
β-caroteno	µg	0		Cobre	mg	0,10	0 – 0,22
Vitamina D	µg	0,89		Zinco, Zn	mg	3.60	0 – 6,9
D3, colecalciferol	µg	0,24		Iodo, I	µg	1,50	1,05 - 1,80
D2, ergocalciferol	µg	0		Crómio, Cr	µg	5,3	0,4 - 7,3
α-tocoferol	mg	0,10		Selénio, Se	µg	6,9	0 - 300
Vitamina K	µg	0		Níquel, Ni	µg	6	0 - 9,1
Vitamina B1, tiamina	mg	0,570	0,400 – 0,800	Fósforo, P	mg	130	75 - 160
Vitamina B2, riboflavina	mg	0,180	0,135 – 0,220	Ferro, Fe	mg	0,630	0,49 - 0,90

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

#### 2.1.4.1. Proteínas

O teor em proteínas com alto valor biológico é uma característica positiva da carne.

Sob o ponto de vista da solubilidade, as proteínas podem ser classificadas em:

- Proteínas solúveis em água ou em soluções salinas diluídas. Compreende numerosas proteínas sarcoplasmáticas e constituem 30-35% do total de proteínas musculares. Muitas são enzimas metabólicas (mitocondriais, lisossomais, microsossomais, do núcleo e citoplasmáticas) e inclui a mioglobina. Pode ainda remanescer alguma hemoglobina apesar da maioria do sangue ser retirado durante o sangramento do animal. A mioglobina é a proteína responsável pela cor vermelha da carne e a sua quantidade depende do tipo de fibra muscular e da espécie animal. Geralmente a quantidade de mioglobina aumenta com a idade do animal (Flores et al., 1999).
- Proteínas solúveis em soluções salinas concentradas ou proteínas miofibrilares (actina, miosina, troponina e tropomiosina, entre outras). Estas proteínas são importantes na contração muscular e nas modificações *post-mortem* (Flores e Bermell, 1995);
- Proteínas insolúveis em soluções salinas concentradas. São proteínas do tecido conjuntivo (colagénio, elastina e reticulina) consideradas proteínas do estroma, e enzimas da respiração e fosforilação oxidativa. O colagénio é o principal componente do tecido conjuntivo, que é encontrado na pele, tendões e fazendo parte do tecido músculo-esquelético, fornece suporte à estrutura muscular. Torna-se menos macio com a idade pelo aumento do número e tipo de ligações entre as fibras. A elastina é encontrada em menores quantidades e nas paredes dos vasos arteriais (Flores e Toldrá, 1999). A solubilidade das proteínas da carne é o principal factor que determina as propriedades de suculência. A solubilidade é influenciada pelo pH, temperatura e início do *rigor-mortis* (Flores et al., 1997).

#### 2.1.4.2. Gorduras

A carne foi classificada como alimento rico em gordura e é apontada de forma crítica, quanto ao aspecto de “alimentação saudável”. As tabelas de composição química da carne divulgadas normalmente são antigas e ultrapassadas e apresentam um teor de matéria gorda elevado, o que não é observado actualmente.

Os lípidos presentes no músculo esquelético podem atingir valores entre 1 a 13% do total muscular, dependendo do grau de engorda e a quantidade de tecido adiposo (Flores e Toldrá, 1999).

A maioria dos lípidos encontram-se distribuídos intramuscularmente, intermuscularmente e no tecido adiposo (Flores e Toldrá, 1999).

Os lípidos intramusculares são constituídos sobretudo por triacilgliceróis, armazenados em células adiposas e fosfolípidos localizados nas membranas celulares. A quantidade de colesterol em carne magra é cerca de 50mg/100g (Flores e Toldrá, 1999).

Os lípidos intermusculares e do tecido adiposo são compostos maioritariamente por triacilgliceróis e pouca quantidade de colesterol (40-50mg/100g). Existem dois grandes grupos de lípidos no músculo: os lípidos apolares, a maioria triacilgliceróis e os fosfolípidos (Flores e Toldrá, 1999).

Os triacilgliceróis constituem a maior porção da gordura. A relação dos ácidos gordos que os formam depende da idade, da alimentação e do ambiente onde o animal se encontra. A composição da gordura reflecte a dieta do animal, especialmente em porco e aves. Nos ruminantes a disponibilidade dos nutrientes é condicionada pela flora ruminal (Flores e Toldrá, 1999).

A gordura animal é sobretudo constituída por ácidos gordos saturados e monoinsaturados, no caso dos ruminantes; tende a ser mais macia (com aparência oleosa) e mais propensa à oxidação quanto mais rica for em ácidos gordos polinsaturados for, como por exemplo, em ácidos linoléico e linolénico (Ruiz-Carrascal et al., 2000).

As gorduras de bovinos e ovinos possuem maior proporção de ácidos gordos saturados e gorduras *trans*, enquanto que nas de suínos e aves predominam os ácidos gordos insaturados (Quadro 6). A maioria dos ácidos gordos insaturados da carne de porco apresenta-se na forma – *cis* (Quadro 7), característica que lhe confere vantagens dietéticas (SEUß, 1993).

Os fosfolípidos estão presentes em menores quantidades mas têm uma grande importância para o desenvolvimento do flavor e da oxidação em carne *post mortem*. São compostos com uma proporção de ácidos gordos polinsaturados relativamente alta comparando com os lípidos neutros. Os fosfolípidos variam com a genética do animal e com a localização anatómica do músculo. Desta forma, a quantidade de fosfolípidos tem tendência a ser maior em músculos vermelhos oxidativos do que nos músculos brancos glicolíticos (Ruiz-Carrascal et al., 2000).

**Quadro 6.** Composição em ácidos gordos e triacilgliceróis em depósitos de gordura subcutânea. (em % do total de ácidos gordos ou % de triacilgliceróis). (Adaptado de Forrest et al., 1979)

Componente	Frango	Suíno	Bovino	Ovino
Ácidos Gordos				
Láurico – 12:0	-	vestígios	0,1	0,1
Mirístico – 14:0	0,1	1,3	4,5	3,2
Palmítico – 16:0	25,6	28,3	27,4	28,0
Esteárico – 18:0	0,7	11,9	21,1	24,8
Saturados Totais	42,7	41,5	53,7	57,7
Palmitoleico – 16:1 (C9)	7,0	2,7	2,0	1,3
Oleico – 18:1 (C9)	20,4	47,5	41,6	36,4
Linoleico – 18:2 (n-6)	-	0,2	0,5	0,5
Linolénico – 18:3 (n-3)	21,3	6,0	1,8	3,5
Insaturados Totais	67,3	58,5	46,3	42,3

**Quadro 6.** Composição em ácidos gordos e triacilgliceróis em depósitos de gordura subcutânea (em % do total de ácidos gordos ou % de triacilgliceróis). (Adaptado de Forrest et al., 1979) (continuação)

Componente	Frango	Suíno	Bovino	Ovino
Triacilgliceróis				
Totalmente saturados				
Tripalmitina		1	3	vestígios
Dipalmitoestearina		2	8	3
Palmitodiestearina		2	6	2
Mono-oleo-dissaturados				
Óleodipalmitina		5	15	13
Óleopalmitoestearina		27	32	28
Óleodiestearina		-	2	1
Di-óleo-monossaturados				
Palmitoldioleína		53	23	46
Estearodioleína		7	11	7
Trioleína		3	0	0

**Quadro 7.** Teor relativo de ácidos gordos saturados e insaturados da carne de porco (Adaptado de Tabela de Composição dos Alimentos, 2007)

Ácidos gordos total	g / 100 g	%
Soma saturados	11.7	39.8
Soma monoinsaturados	13.5	46.0
Soma polinsaturados	3.58	12.2
Soma n – 3	0.30	1.01
Soma n – 6	3.28	11.2
Trans	0.15	0.49

O colesterol é uma substância encontrada na membrana celular de toda célula animal, sendo necessária para sua existência. A carne magra possui, em média 70 mg de colesterol por 100 g de carne crua. Os valores dos enchidos variam de acordo com a quantidade de gordura (Quadro 8).

**Quadro 8.** Teores médios de colesterol (mg/100 g). (\*alimentos crus) (Adaptado de Tabela de Composição dos Alimentos, 2007; SEUß, 1991)

Alimento	Colesterol
Carne de Vaca*	70
Carne de Porco*	70
Carne de Aves*	75
Carne de Animais Silvestres*	110
Enchidos	85-100

#### 2.1.4.3. Hidratos de Carbono.

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

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

#### 2.1.4.4. Cinzas

O conteúdo de cinzas ou resíduo mineral fixo, obtido após incineração da carne a 500-600 °C, está compreendido entre 0,8 a 1,8%. Entre as funções importantes que exercem os iões orgânicos e inorgânicos destacam-se: o cálcio e o magnésio desempenham um papel importante na contracção muscular; os compostos orgânicos com fósforo, com diversos ésteres do ácido fosfórico intervêm nas modificações *post-mortem*, no processo de maturação da carne e hidratação da carne (Price et al., 1994). A carne possui quase todos os minerais de importância para a nutrição humana. Em termos quantitativos, o fósforo e o potássio são os mais importantes (Quadro 9). A relação entre potássio e sódio é favorável na carne, já o sódio encontra-se em quantidade escassa. Os produtos cárneos processados são ricos em sódio devido a adição de sal refinado, na proporção de 2 a 3% durante a elaboração (Prandl et al., 1994).

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

**Quadro 9.** Conteúdo de minerais em diferentes tecidos e alimentos. (Adaptado de Tabela de Composição dos Alimentos, 2007; SEUß, 1991; Price et al., 1994)

Tecidos/ Alimentos	Ca (g/100g)	Na (g/100g)	K (g/100g)	Fe (g/100g)
Total corporal	2,0	0,15	0,35	4,0
Carne de vaca	0,013	0,084	0,33	3,0
Carne de porco	-	0,07	0,4	1,3

A carne possui vitaminas hidrossolúveis do grupo B, como vitaminas B1, B2, B6 e B12. As vitaminas lipossolúveis, como vitamina A e D, encontram-se em quantidades importantes nas vísceras, principalmente no fígado (Tabela de Composição dos Alimentos, 2007). A carne de porco é uma importante fonte de vitamina B1, enquanto que a carne de outros animais de abate contém esta vitamina em menores quantidades (Price et al., 1994). A carne e seus produtos derivados também possuem ácido nicotínico, pantoténico e fólico.

#### 2.1.4.5. Factores que influenciam na composição da carne

Existem muitos factores que influenciam a composição da carne, repercutindo-se nas proporções acima apresentadas entre espécies, raças e mesmo animais da mesma raça (Flores e Toldrá, 1999). Para além destes dois destacam-se ainda: o sexo, geralmente os machos possuem menor quantidade de gordura subcutânea do que as fêmeas; a idade, uma vez que à medida que o animal cresce, aumenta quase todos parâmetros químicos, com o prejuízo do teor em água, os animais jovens possuem pouca quantidade de gorduras subcutâneas e intramuscular, e não apresentam marmoreado; nutrição pois o nível de alimentação sobre o crescimento de animais de carne reflecte-se na composição de diversos músculos e no teor de gorduras intramusculares (Schwab, 1998); localização anatómica, factor intrínseco mais complexa na medida em que existe variações na composição química dos músculos de diferentes localizações e o exercício, a modificação mais acentuada ocorre no teor de mioglobina, que é relativamente mais elevada nos músculos mais activos do que nos músculos menos activos (Flores e Toldrá, 1999).

## 2.2 PROCESSO DE FABRICO DE ENCHIDOS

Nas últimas décadas o processo de fabrico de enchidos passou a ser maioritariamente industrial, apesar de se basear nos processos de elaboração tradicionais. As variações introduzidas no processo de elaboração tradicional relacionam-se principalmente com a mecanização dos processos e a utilização de câmaras de secagem e/ou fumagem com controlo de temperatura e humidade relativa, conseguindo-se desta forma uma produção contínua ao longo do ano, sem influência das condições climatéricas, com o qual a maturação dos mesmos se pode realizar em qualquer zona geográfica.

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

Apesar da diversidade do tipo de enchidos tradicionais portugueses produzidos de diferentes matérias-primas e modos de elaboração, a produção de enchidos baseia-se em dois pilares fundamentais (Kramlich, 1976):

### i) Estabilização da Matéria-Prima

Nesta fase pretende-se que o produto precedente se transforme num produto estável à temperatura ambiente, evitando o desenvolvimento de alterações microbianas que conduzam à putrefacção do mesmo. Isto é conseguido nas chamadas etapas frias e que correspondem às primeiras etapas de elaboração dos enchidos: escolha, miga, preparação da massa e condimentação.

## ii) Desenvolvimento das características sensoriais

Através de alterações dos componentes dos enchidos, proteínas e lípidos, alcançam-se as características sensoriais que caracterizam estes produtos. Produzem-se reacções químicas e enzimáticas que conduzem á formação de compostos sápidos e aromáticos que conferem as qualidades organolépticas características dos enchidos. Estas reacções ocorrem na segunda fase de produção que corresponde à maturação ou cura.

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

### 2.2.1 Selecção da matéria-prima: escolha

A escolha consiste na selecção das carnes e das gorduras mais adequada a cada tipo de enchidos. O critério de escolha das carnes para o fabrico de enchidos deve permitir a obtenção de uma massa de composição equilibrada entre as fracções muscular e lipídica, como descrito anteriormente, e de forma a cumprir os mínimos e máximos estipulados pelas Normas Portuguesas. Um baixo teor em gordura reflecte-se, por exemplo, na qualidade da maior parte dos chouriços, que se tornam secos e quebradiços, prejudicando a sua aparência, textura e “flavor” (Sousa e Ribeiro, 1983).

### 2.2.2 Miga

A miga é uma operação que tem por objectivo reduzir os pedaços de carne, de gordura ou vísceras, a fragmentos mais pequenos, e cujas dimensões variam em função do tipo de enchido (Sousa e Ribeiro, 1983).

### 2.2.3 Preparação da massa e condimentação

Os pedaços de carne e de gorduras migados são colocados em recipientes nos quais são adicionados outros ingredientes essenciais ou facultativos em função da natureza do enchido: água, vinho ou vinagre, arroz, pão, farinha, sangue, salsa, pimentão, alho, cominhos, cravinho, canela, erva-doce. Tem como objectivo principal obter uma ligação homogénea de todos os ingredientes (Janeiro, 1948).

#### 2.2.3.1. Principais condimentos utilizados

Os condimentos tradicionalmente mais utilizados são o alho, a massa de pimentão e o colorau. Estas substâncias são de extrema importância, uma vez que conferem características organolépticas desejáveis e apreciáveis, contribuindo para a tipicidade

dos produtos. Tem sido demonstrado um papel importante destes condimentos na inibição da actividade dos microrganismos de degradação e patogénicos (Quadro 10). Por outro lado, parece que favorecem o crescimento de bactérias lácticas promovendo a fermentação láctica.

As especiarias são definidas como substâncias aromáticas de origem vegetal, utilizadas com a função de fornecer sabores e aromas, não contribuindo para o valor nutricional dos produtos. Muitas ervas e especiarias exercem um efeito antioxidante, sendo bastante úteis para prevenir a oxidação das gorduras. Adicionalmente apresentam propriedades anti-microbianas, prevenindo o crescimento de bactérias indesejáveis (patogénicas e de decomposição). As especiarias desempenham um papel importante na maturação (Incze, 1998).

Estudos científicos evidenciam as propriedades anti-microbianas de muitas especiarias e ervas aromáticas (Quadro 10).

Foi descrito que a adição de alho, cravinho e canela, na concentração de 1%, tem uma acção inibitória sobre a bactéria patogénica *E. coli O157:H7* em enchidos fermentados secos. Foi mostrado que um nível de 7,5% de alho e cravinho destruiu 99% da população daquela bactéria no mesmo produto, não impedindo, no entanto, o arranque da fermentação pela actividade de bactérias lácticas (Snyder, 1997).

Outros estudos revelaram que especiarias e ervas como menta, alho, orégãos, canela e tomilho têm um poder inibitório contra *Listeria monocytogenes*. A menta revelou um poder inibitório moderado enquanto que as outras mostraram uma maior eficácia. Bactérias do tipo *Clostridium botulinum*, *C. sporogenes* e *C. perfringens* foram inibidas na presença de alho, cebola, canela, tomilho, orégãos, alho, pimento e pimenta branca. O alho e a pimenta branca têm um maior efeito de inibição sobre as células vegetativas (Snyder, 1997). Nenhuma das especiarias mostrou um efeito significativo sobre a germinação dos esporos, com excepção de uma pequena redução na taxa da germinação da bactéria esporulada *Bacillus subtilis* (Snyder, 1997).

**Quadro 10.** Efeitos inibidores de algumas especiarias e ervas aromáticas. (Adaptado de Snyder, 1997)

Espécimen	Acção inibitória sobre:	Potência
Alho	<i>Salmonella, Escherichia, Staphylococcus, Bacillus, Candida e Aspergillus(micotoxinas)</i>	Fraco
Cebola	<i>Aspergillus flavus e A. parasiticus (micotoxinas)</i>	Fraco
Canela	<i>Aspergillus flavus e A. parasiticus (micotoxinas)</i>	Forte
Cravinho	<i>Aspergillus flavus e A. parasiticus (micotoxinas)</i>	Forte
Gengibre	<i>Aspergillus flavus e A. parasiticus (micotoxinas)</i>	Médio
Mostarda	<i>Aspergillus flavus e A. parasiticus (micotoxinas)</i>	Forte
Pimenta	<i>Aspergillus flavus e A. parasiticus (micotoxinas)</i>	Médio

**Quadro 9.** Efeitos inibidores de algumas especiarias e ervas aromáticas. (Adaptado de Snyder, 1997) (continuação)

Espécimen	Acção inibitória sobre:	Potência
Orégãos	<i>Aspergillus spp. Salmonella e Vibrio parahaemolyticus</i>	Médio
Menta	<i>Bacillus cereus, Staphylococcus e Vibrio parahaemolyticus</i>	Médio
Louro	<i>Clostridium botulinum</i>	Médio
Salva	<i>Bacillus cereus, Staphylococcus e Vibrio parahaemolyticus</i>	Médio
Tomilho	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Médio

De acordo com Sousa e Ribeiro (1983), o pimento maduro é o condimento mais comum no chouriço de carne. Utiliza-se o pericarpo do pimentão doce (*Capsicum annum* L.), reduzido a pasta, mais ou menos fermentada por *Lactobacillus* e salgada, ou desidratada e reduzida a pó fino comercialmente denominado “Colorau Doce”.

Janeiro (1948) indica outras especiarias, usadas noutros tipos de salsicharia regionais portuguesas, nomeadamente canela, amêndoa, salsa e pimenta.

Muitas das substâncias presentes nas especiarias funcionam como verdadeiros agentes bacteriostáticos (Quadro 11). Porém as concentrações em que são empregues nos produtos cárneos com o objectivo de melhorar o flavor, não são suficientes para que funcionem como conservantes. De facto, muitas das especiarias não “tratadas” podem contribuir significativamente para os níveis bacterianos da massa de enchido em fase de pré-processamento (Kramlich, 1976).

Segundo este autor o uso de especiarias também pode servir para disfarçar os aromas e sabores anormais, resultantes da decomposição microbiana ou de outro tipo de alterações.

**Quadro 11.** Natureza química e acção de alguns condimentos. (Adaptado de Janeiro, 1948)

	Origem	Substância activa	Actividade
<b>Cominho</b> <i>Carcum carvi</i>	Zonas temperadas	Carvão, terpenos	Micostático Sabor e Aroma
<b>Cebola</b> <i>Alhum cepa</i>	Europa central e sul	Ac. Isotiácianico	Bacteriostático Sabor e Aroma
<b>Cravo</b> <i>Szygium aromaticum</i>	Molucas, África Oriental	Eugenol, vanilina	Bacteriostático Sabor e Aroma
<b>Alho</b> <i>Allium sativum</i>	Europa central e sul	Alicina	Bacteriostático Sabor e Aroma
<b>Pimentão</b> <i>Capsicum annum</i>	Europa, E.U.A.	Capsicaína	Bacteriostático Cor e Aroma

## 2.2.4 Cura

Consiste na introdução e distribuição das substâncias com acção de cura. Existem três procedimentos diferentes para esta adição: cura seca, cura húmida ou salmoura e injeção de salmoura enchido (Sousa e Ribeiro, 1983).

### 2.2.4.1. Sais utilizados na cura

No grupo tradicional dos agentes químicos da afinação incluem-se o cloreto de sódio, nitritos e/ou nitratos e açucars. Misturas de especiarias são por vezes adicionadas aos produtos cárneos com o propósito de favorecer o “flavor”. Nas concentrações que são empregues, os sais de cura têm um efeito conservante. A maior parte dos produtos cárneos curados são decompostos pelo desenvolvimento de bactérias Gram positivas, leveduras e bolores. A adição de sais de cura cria um meio bacteriologicamente selectivo, no qual apenas um grupo restrito de microrganismos é capaz de se multiplicar. Quando aplicados em associação estes agentes têm maior eficácia conservante do que quando usados individualmente (Urbain, 1976).

#### 2.2.4.1.1. Cloreto de sódio

O cloreto de sódio (NaCl), sal comum, é um componente de grande importância nas misturas de cura empregues em carnes. A uma concentração suficiente de sal inibe o crescimento microbiano ao aumentar a pressão osmótica do meio do alimento, com a consequente redução da actividade da água (Wirth, 1993).

O crescimento de algumas bactérias é inibido em concentrações baixas como 2% de NaCl, mas outros microrganismos halotolerantes, são capazes de crescer em concentrações salinas elevadas, incluindo o ponto de saturação (Wirth, 1993).

O sal em baixas concentrações faz a carne reter água, mas, em altas concentrações, as proteínas são precipitadas e retêm menos água. Teores de 3 a 4% de sal no produto aproximam-se do limite para muitos consumidores (Wirth, 1993).

Todas as fórmulas de cura de carnes contêm sal. As concentrações empregues (2-3%) não exercem acção conservadora, e seu principal papel é actuar como agente saborizante (Wirth, 1993).

#### 2.2.4.1.2 Nitratos e Nitritos

As finalidades da utilização de nitrato de sódio ou potássio e nitrito de sódio ou potássio são o desenvolver da cor característica da carne curada e funcionar como

bacteriostático em meio ácido (Vösgen, 1993). O nitrato é bastante empregue nas misturas de carnes, entretanto, o seu papel, tanto na cura como na conservação, ainda não está totalmente esclarecido (Vösgen, 1993).

O nitrato actua como fonte de nitrito, o que permite que a carne mantenha um nível de nitrito eficaz para a sua conservação. O nitrato é reduzido a nitrito mediante um processo bacteriano mas, para que a quantidade reduzida seja significativa, é necessário um número de bactérias razoavelmente alto, o que pode ser prejudicial aos produtos cárneos (Vösgen, 1993).

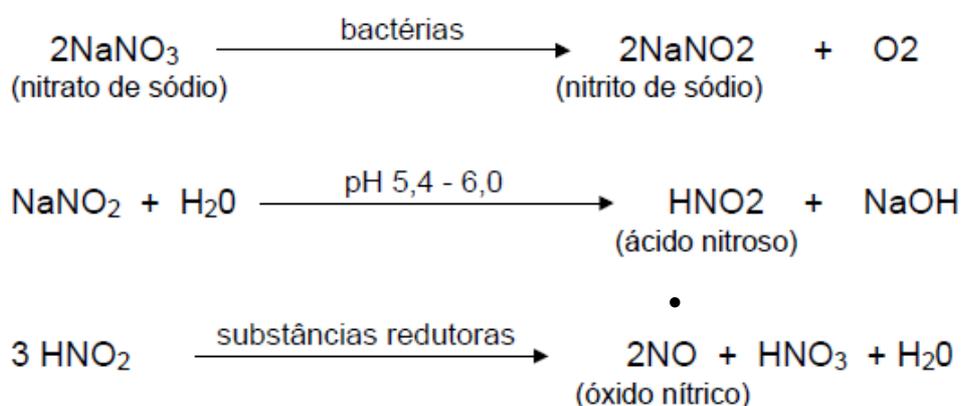
A tolerância ao nitrito varia amplamente entre diferentes grupos de bactérias. Nas fórmulas de cura, podem ser adicionados nitrito de sódio ou nitrito de potássio.

Nos sistemas biológicos, o ião nitrito ou o ácido nitroso pode intervir em muitas reacções químicas.

Como consequência desta reacção, o nitrito adicionado pode desaparecer durante a cura de carnes.

As reacções mais importantes são do óxido nítrico (NO), que é derivado do ácido nitroso, com os pigmentos heme da carne.

O sumário das reacções químicas mais importantes desde a conversão de nitrato de sódio a nitrito de sódio até a formação de óxido nítrico pode ser esquematizado da seguinte forma:



**Figura 1.** Formação de óxido nítrico a partir de nitrato de sódio.

A Figura 2 indica as várias formas químicas para a reacção de cura. Este esquema não mostra a complexidade existente.

O principal pigmento da carne no momento de submetê-la à cura é a mioglobina. Na presença de nitritos e outros subprodutos de reacção deste composto, os pigmentos da carne podem sofrer alterações que dependem de factores intrínsecos (pH, potencial de óxido-redução, actividade enzimática) e extrínsecos (aditivos, acidificação e aquecimento). Como o nitrito é um agente oxidante da mioglobina, a reacção inicial

consiste na conversão da mioglobina e oximioglobina em metamioglobina (Vösgen, 1993).

O óxido nítrico pode combinar-se com a metamioglobina originando a nitrosometamioglobina, que pode reduzir-se a nitrosomioglobina (pigmento da carne curada sem acção do calor). Esta redução pode ser realizada na carne naturalmente ou por redutores adicionados na mistura de cura (Pohlheim et al., 1981).

A nitrosometamioglobina é o pigmento final das carnes curadas submetidas ao aquecimento. Esta reacção implica a desnaturação da parte proteica da mioglobina, mas a estrutura heme fica intacta e associada ao óxido nítrico. A cor do nitrosohemocromogénio é rosa, em contraste com a nitrosomioglobina que possui uma cor mais avermelhada. A cor do pigmento desnaturado (nitrosohemocromogénio) é mais estável do que o pigmento nitrosomioglobina. O nitrosohemocromogénio é estável ao calor, porém instável à luz e oxidações (Pohlheim et al., 1981) (Figura 2).

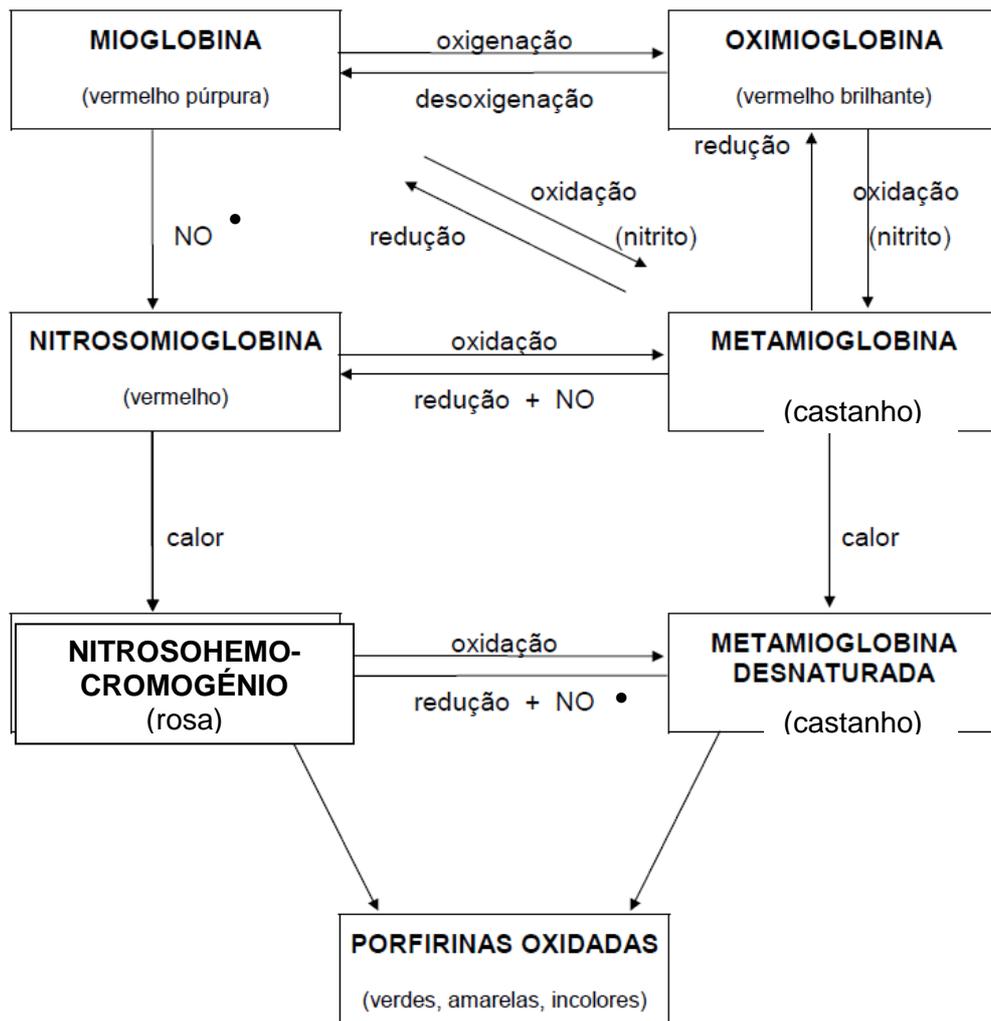
#### 2.2.4.2. Principais aditivos utilizados na cura de carnes

##### 2.2.4.2.1. Açúcar

O açúcar conserva os alimentos quando adicionado em concentrações muito elevadas. As concentrações utilizadas na cura de carnes (0,5 a 1,0%) não chegam a ter alguma acção conservadora.

Este aditivo é adicionado com dois objectivos básicos (Wirth, 1994):

- o primeiro é a função de dar sabor, proporcionando uma combinação de doce-salgado, suavizando o sabor derivado de especiarias e condimentos utilizados no produto e mascara o gosto amargo do nitrito.
- a segunda função, de igual importância, e que tem um significado especial na produção de enchidos secos, é a de servir como fonte de energia para as bactérias responsáveis pela redução de nitrato a nitrito, na primeira etapa do processo de formação de cor na cura de carnes e posterior desenvolvimento das bactérias acidoláticas responsáveis pela diminuição do pH no produto.



**Figura 2.** Mudanças químicas da mioglobina durante as reacções de cura (Price e Schwergert, 1994).

#### 2.2.4.2.2. Fosfatos e polifosfatos

Diversas classes de fosfatos têm sido utilizadas principalmente para diminuir as perdas durante o processamento e para melhorar a estabilidade das emulsões cárneas (Bard et.al, 1976).

Contribuem com a força iónica dos fluidos cárneos, mantendo as fibras mais separadas, aumentando por esse motivo, a capacidade de retenção de água das mesmas. Este efeito também é atribuído ao aumento do pH pela adição destes sais. Possuem um poder sequestrante dos iões metálicos bivalentes (cálcio e magnésio) cuja remoção favorece a hidratação das cadeias peptídicas das proteínas. A sua utilização está restrita num valor máximo de 0,5% no produto final (Marcy et al., 1988; Flores et al., 1996).

#### 2.2.4.2.3. Ácido ascórbico e sais

O ácido ascórbico (vitamina C), ácido isoascórbico (eritorbato) e os seus sais são úteis para melhorar e reter a cor em produtos curados. Quando são adicionados em emulsões, o tratamento térmico pode ser realizado imediatamente e o produto adquire cor de cura uniforme em toda a massa (Prandl et al., 1994).

O ácido ascórbico acelera a reacção de cura ao reduzir a quantidade metamioglobina. Visto que, em determinadas condições, o nitrito e o ácido ascórbico reagem quimicamente entre si, é possível que sua acção principal se deva ao aumento de produção de óxido nítrico, dando uma quantidade superior a obtida normalmente do ácido nitroso (Prandl et al., 1994).



**Figura 3.** Formação de óxido nítrico a partir da reacção entre ácido ascórbico e nitrito.

Não é recomendável, no entanto, o uso directo do ácido, mas sim o seu sal, o ascorbato ou isoascorbato, porque pode ocorrer reacções prematuras  $\text{HNO}_2$  causando libertação de NO e conseqüente perda desse óxido e a diminuição brusca do pH, provocado pela presença do ácido podendo promover a “quebra da emulsão” do produto a ser enchido (Prandl et al., 1994). Por medidas económicas, é preferível o uso de um isómero do ascorbato de sódio, ou seja, o isoascorbato de sódio.

#### 2.2.5. Maturação

À operação de cura propriamente dita segue uma fase que se designa maturação (Prandl et al., 1994). Nesta fase pretende-se intensificar o aroma da cura e outras características organolépticas e estabilizar a cor do curado destes produtos. Desta forma pasta dos enchidos, depois de amassada, é submetida a um repouso, durante o qual ocorre o fenómeno de maturação espontânea, na qual o sal, a água, e por vezes, quando adicionados, o vinho e o vinagre, e os microrganismos desempenham importantes funções (Sousa e Ribeiro, 1983).

Durante esta fase do processo o produto sofre uma maturação láctica. Esta introduz alterações nas características da massa conferindo-lhe um sabor mais ácido. A fermentação pode ocorrer naturalmente ou, nalguns casos ser dirigida através da adição de uma cultura de arranque de bactérias lácticas, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, e *Lactobacillus* e espécies como *P. cerevisiae*, *P. acidilactici*, *M. aurantiacus* e *L. plantarum* são as mais utilizadas (Vasilopoulos et al., 2008). A diminuição de pH torna a matriz hostil ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Poderá ainda afectar a actividade da água ao originar uma maior ‘retenção’ de água pelas proteínas, resultando numa menor quantidade de água disponível e livre para os processos metabólicos.

No entanto, existem alguns fungos que podem crescer nestas condições. O sal adicionado à carne nesta fase aumenta a pressão osmótica e pode interferir com o processo de fermentação. A adição de quantidades muito elevadas ou muito baixas poderá provocar o crescimento de bactérias lácticas indesejáveis, tendo como consequência a obtenção de um produto sem as características pretendidas (Prandl et al., 1994).

#### 2.2.6 Enchimento

Esta operação consiste em introduzir a pasta no invólucro que lhe é destinado. A tripa natural utilizada deve estar em boas condições higiénicas e íntegra, de modo a suportar as pressões necessárias à obtenção de um enchimento compacto. O enchimento realiza-se de forma que a pasta entre sob pressão de modo a preencher a tripa e, ao mesmo tempo conseguir a dilatação máxima compatível com a sua elasticidade. Caso contrário ficam espaços cheios de ar que prejudicam a qualidade dos produtos favorecendo a ramificação e a decomposição (Janeiro, 1948).

#### 2.2.7 Atadura e picado

Terminado o enchimento a peça é comprimida e ajustada à mão pelo lado externo obtendo-se uma distribuição uniforme. A forma de atar varia conforme as tradições locais e o produto fabricado. Após a atadura os enchidos tradicionais são picados em toda a extensão com agulha para facilitar a saída de ar e água indesejáveis (Janeiro, 1948).

#### 2.2.8 Tratamentos para produtos curados crus e cozidos

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

##### 2.2.8.1. Escaldão / Cozedura

O emprego de um tratamento térmico garante, em alguns processos, a eliminação de microrganismos patogénicos (Prandl et al., 1994). Este processo terá que combinar adequadamente os parâmetros tempo e temperatura para que seja eficiente. Segundo

a FSIS (1999) deve cumprir-se a temperatura mínima de 54,5 °C durante 121 minutos ou 60,5 °C durante 10 minutos, para este tipo de produtos.

O escaldão produz nos enchidos transformações físicas dos ingredientes, que se evidenciam pela mudança de cor, que de vermelho mais ou menos intenso passa a rosado, mais ou menos pálido ou a acinzentado, e modificações químicas. O escaldão deve ser efectuado lentamente para que o calor penetre uniformemente no interior da massa. Este processo de cura é em geral complementado com fumagem (Prandl et al., 1994). Este processo aplica-se a alheiras e morcelas de arroz.

#### 2.2.8.2. Secagem

A secagem atmosférica consiste na colocação dos enchidos em câmaras com controlo e temperatura e humidade (Prandl et al., 1994). A duração é variável (10-120 dias), dependendo do tipo de produto, diâmetro e tamanho. Este deverá conter no final 30-40% de humidade.

Segundo a FSIS (1999), para produtos de salsicharia secos e curados, a relação entre humidade e proteína deverá ser menor ou igual a 1,9. Esta razão poderá subir para 3,1 se o pH se mantiver em valores iguais ou inferiores a 5,0. O aumento desta razão, com conseqüente aumento da humidade do produto final para 50% ou mais, faz com que estes produtos necessitem de ser refrigerados.

A secagem deverá ser controlada de modo a evitar que o produto fique demasiado seco ou com demasiada humidade. Neste caso poderá ocorrer o crescimento excessivo de bolores e leveduras e, ainda, o aparecimento de limo à superfície. O processo deve ser executado para que a água seja eliminada do centro para a periferia do produto.

#### 2.2.8.3. Fumagem

A fumagem tem efeitos preservativos, melhora a aparência e flavor. Os processos tecnológicos de refrigeração e embalagem a vácuo têm feito com que a defumação tenha menor importância com a finalidade de preservação (Prandl et al., 1994).

A mudança na textura superficial é resultado do efeito de secagem da fumagem, os pigmentos dos componentes da fumagem e a formação das resinas contribuem para a formação da coloração. A formação da coloração escura não é desejável, é produzida pela reacção dos compostos da fumagem com as proteínas da carne e a acumulação excessiva de substâncias de alcatrão produz coloração mais escura (Hortein, 1976).

A fumagem consiste na colocação dos produtos em câmaras, estufas ou fumeiros, ou suspensos numa lareira, de modo a ficarem regularmente expostos ao fumo resultante da combustão lenta de madeiras duras como o Azinho, Faia, Sobro, Amieiro, sob a forma de toros, aparas, conforme se pretende fumo quente ou frio (Sousa e Ribeiro, 1983).

O fumo usado na fumagem dos produtos cárneos produz-se em duas etapas: pirólise, que consiste na decomposição térmica dos componentes da madeira e na formação de determinados produtos de reacção, e oxidação de uma parte destes produtos de decomposição, com presença de oxigénio (Hortein, 1976). Os compostos fenólicos e formaldeído depositados como material resinoso na carne tem propriedades bacteriostáticas e os fenóis providenciam também alguma protecção contra oxidação de gordura (Quadro 12).

**Quadro 12.** Principais produtos originados durante o processo de fumagem. (Sousa e Ribeiro, 1983).

Produto	Acção
Álcool metílico	Antisséptica
Ácido pirolenhoso	Diminui o pH e o metanol produz ésteres
Ácido carbónico	Não actua
Anidrido carbónico	Não actua
Aldeídos	Antisséptica
Cetonas	Antisséptica
Ésteres	Aromatizante
Fenóis e Cresóis	Antisséptica e aromatizante; desenvolvem cor caramelo
3,4 benzopireno e 1,2,5,6 fenantreceno	Carcinogénicos e formam-se a altas temperaturas de combustão

A temperatura a que os enchidos são submetidos varia muito em função da actividade do fogo e da distância a que dele se situam, mas pode afirmar-se que o processo artesanal caracteriza-se por longos períodos de fumagem pouco intensa, a temperaturas que raramente ultrapassam os 70 °C (Sousa e Ribeiro, 1983) (Quadro 13).

**Quadro 13.** Controlo das condições do fumeiro usado na secagem, fumagem e cozedura (Sousa e Ribeiro, 1983)

Função	Tempo	T °C do fumeiro	% Humidade	Válvula
Secagem	30 min	51,6	25	Aberta
Fumagem (*)	1 hora	60,0	35	Fechada
Cozedura	1 hora	73,9	35	Fechada
Cozed. c/ vapor	10 min	82,2	100	Fechada

(\*) Fumagem considerada a quente. Existe outro tipo de fumagem na qual são usadas temperaturas abaixo dos 30 °C - fumagem a frio. É este tipo que é praticado na maioria dos enchidos e dos produtos cárneos curados

A fumagem é usada com a finalidade de secar e curar a carne, adicionando sabores e aromas ao produto final. Em termos de segurança alimentar este processo é importante porque contribui para a inibição do crescimento/actividade bacteriana no produto final (Bard e Townsend, 1976).

O fumo desempenha, então, um papel importante do ponto de vista tecnológico, por conferir, características de sabor e aroma. É também relevante o seu papel como conservante, visto que os seus componentes têm alguns efeitos microbiostáticos. A desidratação que ocorre, também contribui para a inibição do crescimento bacteriano na carne fumada. Os componentes fenólicos conferem um certo grau de protecção anti-oxidante das gorduras (Bard e Townsend, 1976).

A desidratação da superfície, a coagulação proteica e a deposição de material resinoso, resultante da condensação de formaldeído e de fenol, produzem uma eficaz barreira físico-química, contra o desenvolvimento e penetração bacteriana no produto final (Bard e Townsend, 1976).

#### 2.2.9. Evolução dos parâmetros físico-químicos

As características sensoriais dos enchidos dependem principalmente da matéria-prima utilizada e do processo tecnológico aplicado. Durante o processamento dos enchidos ocorrem uma série de alterações que afectam a sua composição e estrutura e que influenciam decisivamente para as características sensoriais do produto acabado.

##### 2.2.9.1. Actividade da água

A carne crua contém cerca de 75% de água (Prandl et al., 1994). A redução da actividade da água ( $a_w$ ) nos alimentos torna menos favoráveis as condições de multiplicação e actividade dos microrganismos, entre os quais, os envolvidos nas alterações dos produtos e os patogénicos. A acção inibitória da  $a_w$  é potenciada por determinados factores como o pH, o potencial oxidação-redução, a temperatura e a presença de certas substâncias (Prandl et al., 1994).

Os produtos de salsicharia tradicional portuguesa apresentam uma humidade intermédia ( $0,60 < a_w < 0,90$ ) e podem ser armazenados sem recurso ao frio. A  $a_w$  é um parâmetro importante para a estabilidade destes alimentos. No entanto, é necessário ter em atenção que a heterogeneidade das matérias-primas utilizadas conjuntamente com diferentes processos de fabrico, faz com que sejam obtidos produtos com características diferentes e, conseqüentemente, com valores de  $a_w$  diferentes. No intervalo de  $a_w$  entre 0,60 e 0,90, existem determinados microrganismos (bactérias, bolores e leveduras) que se podem manter activos (Peres, 2000).

### 2.2.9.2. pH

Os valores de pH da carne crua de porco variam entre 5,6-6,0. Durante o processo de fabrico dos enchidos este valor pode baixar para 4,5 (Prandl et al., 1994).

Este parâmetro exerce, tal como a  $a_w$ , uma importante função na estabilidade dos produtos alimentares. A inibição dos microrganismos pode ser conseguida aumentando a acidez (reduzindo o pH) pela adição de ácidos fracos ou através da fermentação láctica (por acção das bactérias lácticas).

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

Na Quadro 14 apresenta-se os valores de pH e  $a_w$  encontrados em produtos cárneos portugueses.

**Quadro 14.** Valores médios ou intervalos de valores de pH e  $a_w$  da carne e de produtos cárneos portugueses. (Adaptado de Peres, 2000)

Produto	pH	$a_w$
Carne fresca de vaca	5,4-5,8	0,98
Carne fresca de porco	5,6-6,0	0,98
Enchidos Fumados	>4,5	<0,90
Chouriço cru seco	4,9-5,2	0,85-0,93
Chouriço cru	5,3-5,8	0,90-0,93
Morcela	6,2-7,0	0,96-0,98

### 2.2.10. Evolução do microbiota saprófita dos enchidos

Liepe (1983) afirma que é impossível obter um enchido a partir de uma mistura de carne, sal e outros aditivos, sem a presença de um microbiota activo.

Os enchidos contêm misturas de carne, sal, especiarias, vinho, água, e um microbiota específico, que neles se desenvolve, e que é diferente daquele que coloniza a carne fresca (Lechowich, 1976).

Como comenta Samelis et al. (1994), a natureza e composição do microbiota que coloniza os enchidos, depende das técnicas e condições de fabrico, uma vez que o tempo, o tipo e a temperatura dos diferentes processos a que o enchidos são sujeitos, influenciam significativamente a população microbiana do produto final. Os microrganismos presentes na carne crua de porco utilizada para a produção de enchidos provêm fundamentalmente das operações posteriores ao abate dos animais (evisceração e escaldão) e a sua origem é tanto ambiental como intestinal. (Cornejo et

al., 1990). O número destes microrganismos inicialmente presentes na matéria-prima pode estar afectado pelas condições de transporte, armazenamento, refrigeração (Carrascosa et al., 1989) assim como pelo tempo de armazenamento (Langlois e Kemp, 1989). O tempo decorrido entre a obtenção da carne e a sua transformação pode também produzir uma diminuição no valor de  $a_w$  na superfície da mesma e dificultar o crescimento de microrganismos na superfície (Carrascosa et al., 1989).

Os enchidos, como muitos outros produtos alimentares, são originariamente contaminados por uma vasta gama de géneros microbianos. Todavia combinações específicas de parâmetros ambientais, quer intrínsecos, quer extrínsecos, seleccionam os que são capazes de sobreviver e competir sob as condições ecológicas criadas ao longo do processo (Buchanan, 1986, *cit in* van Holy, 1992).

Os principais grupos de microrganismos saprófitas existentes nos enchidos são os microrganismos mesófilos, os microrganismos halotolerantes, os cocos Gram positivos, catalase positivos, as bactérias ácido-lácticas, os bolores e as leveduras (Vasilopoulos et al., 2008).

Determinados enchidos como o chouriço, o salsichão e o paio têm que experimentar uma fermentação láctica para adquirir o seu aroma característico. A obtenção destes produtos depende do desenvolvimento de bactérias lácticas que contaminam as massas de carne empregues na produção dos enchidos (Kramlich, 1976).

Como exemplifica van Holy (1992), um processo térmico moderado, pode eliminar formas vegetativas de psicotróficos e mesófilos, e limitar assim, a quantidade e variedade de potenciais competidores com bactérias mais resistentes ao calor (termodúricas).

Um estudo levado a cabo por van Holy (1992), em salsichas de Viena, revelou a presença de um largo espectro de géneros bacterianos Gram + e Gram -. Tendo sido obtidos isolados de *Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteus*, *Bacillus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*.

Além das bactérias lácticas, são também frequentemente isoladas *Enterobacteriaceae*, leveduras e bolores (Dykes et al., 1991; Andersen, 1995; Zurera-Cesano et al., 1998). As espécies de bolores mais frequentes pertencem aos géneros *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Scopulariopsis* (Andersen, 1995).

#### 2.2.10.1. Bactérias ácido-lácticas

As bactérias ácido-lácticas são as que produzem ácido láctico como o principal produto final de fermentação. As mais típicas classificam-se nas famílias *Streptococcaceae* (principalmente, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*) e *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus*) (Lücke, 1986). Os outros géneros incluídos são *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Oenococcus* e *Tetragenococcus*. São bactérias Gram-positivas, não esporuladas, em forma de cocos, cocabacilos ou bacilos, e geralmente não móveis. São anaeróbias tolerantes catalase

negativas que fermentam hidratos de carbono para formar ácido láctico. Existem subgrupos com estirpes heterofermentativas que produzem para além de ácido láctico grandes quantidades de dióxido de carbono e ácido acético ou etanol (Reuter, 1981). Os valores das contagens de bactérias ácido-lácticas são bastante variáveis. A predominância das bactérias lácticas em enchidos maturados é comprovada em vários estudos (Dykes et al., 1991; Samelis et al., 1994; Sanz et al., 1998).

#### 2.2.10.2. Leveduras e bolores

As leveduras juntamente com os bolores são menos sensíveis a abaixamentos de actividade da água, pelo que não é surpreendente que sejam a flora dominante em determinados alimentos que apresentem esta característica – xerofilia (Loureiro, 1992).

Loureiro (1992) afirma que as leveduras resistentes à baixa actividade da água tanto na presença de sais como de açúcares; As leveduras contaminantes de alimentos pertencem predominantemente ao género *Zygosaccharomyces*, *D. hansenii*, *Candida parapsilosis* e *Pichia membranaefaciens*; são espécies também resistentes a elevados teores de sacarose e de NaCl.

O autor adianta que relativamente ao pH, as leveduras e bolores são, de um modo geral, mais resistentes que a maioria das bactérias a baixos valores de pH, predominando na microbiota típica de alimentos com pH ácido (Praphaillong e Fleet, 1997)

A presença de oxigénio aumenta a actividade das leveduras, uma vez que permite o metabolismo oxidativo, que é energeticamente mais eficiente, ao mesmo tempo que facilita a utilização de uma larga gama de substratos energéticos ricos, como álcoois e ácidos orgânicos (Loureiro, 1992).

Praticamente todas as leveduras presentes nos alimentos utilizam glucose e frutose como fontes de carbono e energia. Menos frequente é a utilização de ácidos orgânicos (como o ácido acético e láctico), e álcoois (etanol e glicerol). A utilização de amido e lípidos é bastante rara. O azoto orgânico não é indispensável para o metabolismo das leveduras. Todas elas são capazes de utilizar amónia como fonte de azoto, assim como alguns aminoácidos, graças à sua faculdade de desaminação e transaminação. Poucas têm actividade proteolítica (Loureiro, 1992).

As leveduras variam amplamente nas suas necessidades minerais e factores de crescimento. Muitas sintetizam todas as vitaminas que necessitam, outras requerem determinadas vitaminas (Déak, 1996).

Loureiro (1992) explica que as leveduras dos alimentos são capazes de se multiplicar a temperaturas compreendidas entre 0 e 40 °C, com uma temperatura óptima de 25 – 27 °C, e que a resistência a elevadas temperaturas é considerada fraca, pois quase todas as leveduras são destruídas a temperaturas de pasteurização. A maior

resistência térmica demonstrada por determinadas espécies prende-se com a formação de ascosporos, ligeiramente mais resistentes ao calor que as células vegetativas.

As leveduras juntamente com os bolores contribuem favoravelmente para a evolução do processo, na medida em que possuem um efeito antioxidante por redução da tensão de oxigénio à superfície, através da degradação de peróxido e protecção contra a luz (inibe a rancificação e melhora a retenção de cor); criam um “micro-ecossistema” na superfície que evita a excessiva dissecação e o aspecto gorduroso, e degradam lípidos, proteínas e ácido láctico, contribuindo para o desenvolvimento do sabor e do aroma característicos (Gama et al., 1997).

Grazia et al. (1989) constataram que as leveduras do paio (82% da quais é representada por *Debarymyces hansenii*) influenciavam a formação da cor vermelha e melhorava a qualidade do produto.

Dalton et al. (1984), num estudo detalhado, demonstraram que *D. hansenii*, *Candida zeylanoides*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida vini* encontram-se na atmosfera e nos equipamentos dos matadouros, assim como, nas câmaras de refrigeração. Os autores verificaram ainda que, *Trichosporon cutaneum*, *Rhodotorula glunis*, *R. mucilaginosa* e *Cryptococcus laurentii* ocorrem no equipamento do matadouro, enquanto as espécies *Pichia carsonii* e *Yarrowia lipolytica* contaminam os enchidos através dos ingredientes e condimentos adicionados.

As operações de embalagem podem aumentar a contaminação por leveduras. Viljoen et al. (1993) obtiveram maiores incidências de *Y. lipolytica*, *C. zeylanoides* e *D. hansenii* em salsichas de Viena embaladas em vácuo. Por outro lado verificou-se que a embalagem em atmosfera modificada, utilizando azoto é bastante efectiva no controlo de leveduras em salsichas “Frankfurter”, armazenadas a temperaturas de 3 a 7 °C (Simard et al., 1983).

As leveduras desenvolvem-se em geral, nos enchidos, ao longo das três primeiras semanas do processo de cura e o respectivo teor ronda os  $10^3$ - $10^4$  UFC/g de produto (Boissonet et al., 1994).

## 2.3. QUALIDADE SENSORIAL DOS ENCHIDOS

### 2.3.1 Análise sensorial dos enchidos

A análise sensorial é a disciplina científica utilizada para medir, analisar e interpretar as reacções humanas às características dos alimentos e materiais, assim como a forma como estes são perceptíveis pelos sentidos da visão, olfacto, gosto, tacto e audição (Harper, 1983). A percepção sensorial que um consumidor tem frente a um enchido curado é, segundo Flores e Toldrá (1999) a seguinte: primeiro recebe sensações externas tanto pela visão (cor, forma, tamanho, brilho, em resumo, o aspecto geral) como pelo olfacto (aroma). Uma vez ingerido o enchido enquanto se

mistura com a saliva, apercebe-se do sabor e do aroma retronasal bem como de um conjunto de sensações complementares somatosensoriais como o esforço mastigatório consoante a tenrura do enchido, a impressão (refrescante, ardente) e a temperatura do enchido. O conjunto do sabor com o aroma (quer directo quer retronasal) constitui o “flavor”, termo anglo-saxónico amplamente difundido (Hortein, 1976).

As provas sensoriais são de grande importância, já que os nossos sentidos são a forma mais simples e natural de avaliar a nossa aceitação ou preferência por um produto (Vários Autores, 1990). Na indústria pretende-se elaborar produtos valorizáveis pelas suas características sensoriais típicas de aspecto, textura e olfato-gustativas. Por outro lado, a análise sensorial do produto acabado é útil para determinar se na elaboração do enchido foi utilizada uma matéria-prima ou etapa inadequada ou diferente da habitual.

Segundo o projecto de Norma Portuguesa 4263 (1994) podemos definir Análise Sensorial ou Exame Organoléptico como o “exame das características organolépticas de um produto pelos órgãos dos sentidos”, sendo, aí, organoléptica definida como “qualifica uma propriedade de um produto perceptível pelos órgãos dos sentidos”. Outras definições, retiradas de fontes diversas, definem a análise sensorial como “a análise de alimentos e outros materiais utilizando os sentidos” ou como a “definição e medida de um modo científico dos atributos do produto apercebidos pelos sentidos: vista, ouvido, cheiro, sabor e tacto”, ou ainda como, “uma técnica cujo objectivo é a determinação das propriedades sensoriais ou organolépticas dos alimentos, isto é, a sua influência sobre os receptores sensoriais cefálicos antes e após a sua ingestão e a investigação das preferências e aversões pelos alimentos determinadas pelas suas propriedades sensoriais”.

A análise sensorial responde a três tipos de questões (Piggot, 1999; Montet, 2001):

- Descrição: A que é que sabe o produto? Quais são as suas características sensoriais apercebidas? De que modo a qualidade do produto difere de outro produto? Quais são as consequências de uma modificação no processo, formulação, embalagem ou condições de armazenamento nos atributos do produto?

- Discriminação: Será que o consumidor nota a diferença? Será que o consumidor detecta isto? Quantos consumidores detectariam esta diferença? Estes produtos são diferentes? Qual a magnitude da diferença?

- Preferência ou Idoneidade: Quantas pessoas gostam deste produto? O produto é aceitável? Este produto é tão bom como o concorrente? Será que este produto é melhor que o anterior? Quais são as características mais apetecidas? Será o preferido pelo consumidor?

### 2.3.1.1. Propriedades sensoriais dos enchidos

O aspecto é a primeira informação que o consumidor recebe sobre um alimento e na maioria dos casos o único que pode utilizar para decidir a compra do mesmo. A propriedade sensorial mais associada à visão é a cor, se bem que existem outros atributos detectados por este sentido (Bratzler, 1976) (Quadro 15).

A textura, segundo o projecto Norma Portuguesa 4263 (1994), é um conjunto de propriedades mecânicas, geométricas e de composição de um produto perceptível pelos os sentidos do tacto, da visão e audição.

Na boca a percepção de textura é perceptível pelos receptores tácteis situados na língua, gengivas e garganta e pelo paladar. Também se apercebem sensações térmicas e de dor. A Análise sensorial da textura da carne e dos produtos à base de carne compreende várias etapas, segundo Hortein (1976) (Quadro 16).

**Quadro 15.** Características organolépticas exteriores e interiores dos enchidos tradicionais portugueses.

	Caracteres Organolépticos	
	Exteriores	Interior (ao corte oblíquo)
Alheira NP 598 (1969)	Aspecto amarelado não homogéneo, brilhante, consistência pastosa, invólucro sem rupturas aderente à massa.	Massa perfeitamente ligada, de aspecto granuloso, de cor de diversas tonalidades consoante a matéria-prima utilizado, com cheiro e sabor “sui generis”
Chouriço de Carne NP 589 (2006)	- Chouriço de carne tradicional: aspecto vermelho e brilhante, denotando uma coloração e cheiro resultantes do processo de fumagem por queima de madeiras apropriadas. Deverá ter ainda consistência firme, invólucro sem roturas e bem aderente à massa. - Chouriço de carne extra e Chouriço de carne corrente: aspecto vermelho e brilhante denotando uma coloração e cheiro resultantes do processo de fumagem. Deverá ter ainda consistência firme, invólucro sem roturas e bem aderente à massa.	Massa perfeitamente ligada, de aspecto marmoreado, com distribuição regular dos pedaços de carne e gordura, de cor avermelhada e branca, com cheiro e sabores característicos.
Chouriço mouro NP 595 (1990)	Cor negra, brilhante, consistência semi-mole, invólucro sem roturas e aderentes à massa.	Massa homogénea, perfeitamente ligada, de aspecto marmoreado e brilhante de diversas tonalidades consoante a matéria-prima utilizada, com cheiro e sabor “sui generis”

**Quadro 15.** Características organolépticas exteriores e interiores dos enchidos tradicionais portugueses (continuação)

	Caracteres Organolépticos	
	Exteriores	Interior (ao corte oblíquo)
Chouriço de sangue NP 594 (1990)	Aspecto acinzentado, baço, consistência mole e invólucro sem roturas.	Massa homogénea, perfeitamente ligada, de aspecto grumoso, de cor castanha muito escura, com cheiro e sabor “sui generis”.
Morcela NP 593 (1990)	Cor negra ou acinzentada, aspecto brilhante ou baço consoante o tipo, consistência rija, invólucro sem roturas e aderentes à massa.	Massa homogénea, perfeitamente ligada, de aspecto brilhante, grumoso ou pastoso, de cor castanha ou acinzentada ou de borra de vinho, com cheiro e sabor “sui generis”
Linguiça NP 590 (1989)	Cor avermelhada, brilhante, consistência firme, invólucro sem roturas e aderente à massa	Massa homogénea, perfeitamente ligada, de aspecto marmoreado, com distribuição regular da carne e da gordura, de cor avermelhada e branca, com cheiro e sabor “sui generis”
Salpicão NP 591 (1969)	Cor vermelha, brilhante, consistência dura, invólucro sem roturas e aderente à massa.	Massa homogénea, perfeitamente ligada, de aspecto marmoreado, com distribuição regular de gordura, de cor vermelhada, com cheiro e sabor “sui generis”

**Quadro 16.** Etapas da análise sensorial da textura da carne e dos produtos à base de carne.

Etapa	Sensação produzida
Compressão parcial	Elasticidade
Mastigação	Dureza, produção de saliva, libertação e absorção de saliva, quantidade e tipo de gordura, número de movimentos mastigatórios necessários para a deglutição, fibrosidade, tipo e quantidade de tecido conjuntivo, tamanho do bolo, uniformidade e adstringência.
Deglutição	Facilidade de deglutição, quantidade, tipo e uniformidade de partículas, fibras, aderência aos dentes.

O aroma típico dos enchidos está relacionado principalmente com a formação de substâncias voláteis durante o processamento dos enchidos, especialmente nas últimas etapas (Ockerman et al., 1964). A maior parte destes compostos voláteis são o resultado da oxidação de ácidos gordos insaturados, produtos de degradação de aminoácidos, produtos da reacção de Maillard e interacções entres eles ou proteínas, péptidos e aminoácidos livres (Zhang et al., 1994).

Os compostos voláteis, presentes neste tipo de produtos, podem ser classificados em:

- a) Aldeídos não-ramificados: provêm da oxidação dos ácidos gordos. Têm um grande impacto no flavor em comparação com os hidrocarbonetos, cetonas e álcoois (Forss, 1972). São diferentes dependendo do ácido gordo precursor. Os odores foram descritos como acre, amêndoa amarga, erva, maçã, pintura, oleoso, sabão, afrutado, gordo, frutos secos, pepino, casca de laranja, frito (Forss, 1972; Shahidi et al., 1986).
- b) Aldeídos aromáticos e ramificados: formados por desaminação e descarboxilação oxidativa (reação de Strecker) de aminoácidos (Berdagué et al., 1991).
- c) Cetonas: provenientes fundamentalmente da oxidação lipídica. Os seus aromas descrevem-se como manteiga, queijo, erva. As metilcetonas podem provir da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos livres seguida de descarboxilação do  $\beta$ -ceto ácido (Belitz e Grosch, 1988).
- d) Hidrocarbonetos: têm origem na oxidação lipídica. Possuem um alto limiar de percepção e a sua contribuição no flavor não parece ser importante (Min et al., 1979; Frankel, 1985).
- e)  $\gamma$ -lactonas: procedentes da desidratação e ciclação de  $\gamma$ -hidroxiácidos gordos que são normais em triacilglicéridos (Forss, 1972). São compostos são muito aromáticos e estão associados a notas de gordura, creme, afrutado, coco, almíscar (Berdagué et al., 1991; Dirinck et al., 1997).
- f) Álcoois: provêm da decomposição de hidroperóxidos e por redução dos aldeídos. Os álcoois ramificados podem ter odores degradáveis (Sábio et al., 1995).
- g) Ésteres: são o resultado da esterificação de álcoois e ácidos carboxílicos provavelmente por acção da população microbiana presente nos enchidos (Berdagué et al., 1991).
- h) Hidrocarbonetos aromáticos (Berdagué et al., 1991).
- i) Ácidos gordos: os ácidos gordos de cadeia curta são voláteis e o seu aroma análogo ao de alguns queijos (Berdagué et al., 1991).

### 2.3.2. Defeitos nos enchidos. Alterações na qualidade

#### 2.3.2.1 Defeitos na textura e aspecto

Por vezes surgem alterações da cor superficial dos enchidos tanto na superfície de corte como na exterior dos presuntos que adquirem uma cor acastanhada como resultado da desidratação. Esta cor é devida à presença do pigmento metamioglobina que surge frequentemente em consequência das condições de armazenamento do produto. O aparecimento desta alteração pode ser retardada, utilizando invólucros pouco permeáveis à água e ao oxigénio (Dubé e Robles, 2000).

As alterações à cor destes produtos podem ainda ser consequência da quantidade de nitrito empregue na cura, nomeadamente, sempre que estes agentes de cura não são

adicionados em quantidades suficientes a cor interior é rosa pálida e também tende a perder a cor sempre exposta ao oxigénio. Contrariamente, quantidades excessivas de nitrito originam um esverdeamento do pigmento da carne curada por oxidação, conhecido como “queimadura do nitrito”. A “queimadura do nitrito” constitui um problema especialmente nos enchidos fermentados ou nos produtos com vinagre devido sua elevada acidez (Dubé e Robles, 2000).

O nitrosomioglobina e nitroso hemocromo são susceptíveis à descoloração pela luz. Esta alteração é importante quando a carne fica exposta ao ar com iluminação fluorescente. A descoloração pela luz é feita em duas fases: a dissociação do óxido nítrico do grupo heme que é catalisada pela luz torna-se castanho-acinzentado devido ao pigmento denominado hemicromo, que tem no grupo heme o ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ). O método mais eficaz para prevenir esta alteração é a embalagem à vácuo ou a utilização de películas impermeáveis ao oxigénio (Dubé e Robles, 2000).

A rancificação da gordura afecta também as características sensoriais do produto.

As bactérias acidoláticas halotolerantes capazes de crescer a baixa temperatura são capazes de esverdear o pigmento da carne curada. O género bacteriano mais comum neste tipo de alteração é *Leuconostoc*, de natureza heterofermentativa. As bactérias alcançam a superfície do produto durante os procedimentos de fabrico e após o processamento térmico. O esverdeamento bacteriano superficial das carnes curadas é consequente de más condições higiénicas e/ou más condições higiénicas de armazenamento do produto elaborado. Esta alteração é retardada quando são empregues temperaturas de armazenamento de 4 °C ou inferiores (Dubé e Robles, 2000).

*Lactobacillus viridescens* é um microrganismo comumente associado aos núcleos verdes dos enchidos, outro tipo de alteração que pode ocorrer nestes produtos. Para que estas alterações surjam é necessário que exista contaminação da emulsão de com este tipo de bactérias, que o tratamento térmico seja insuficiente para as destruir e, finalmente, que a temperatura de armazenamento seja favorável para o seu crescimento (Dubé e Robles, 2000).

Outra alteração comum é a formação de gás, especialmente em enchidos maturados, devido ao crescimento bacteriano e de leveduras, principalmente das bactérias acidoláticas heterofermentativas (*Lactobacillus* e *Leuconostoc*) que fermentam os açúcares adicionados com produção de dióxido de carbono e vapor de água. Os produtos com esta alteração aparecem com numerosas “bolhas” ou “olhos” em toda massa do produto podendo existir ruptura do invólucro da massa (Cantoni et al., 1985).

A formação de limo microbiano e mofo na superfície do produto é devida a bactérias acidoláticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, e estreptococos), micrococos e leveduras. Estes microrganismos podem crescer à temperatura de refrigeração sobre a superfície húmida dos produtos cárneos curados (Cantoni et al., 1985).

O mofo superficial é devido a microrganismos estritamente aeróbios e não crescem na superfície dos produtos mantidos em condições anaeróbicas. Os esporos contaminantes dos produtos cárneos provêm do contacto directo com uma superfície mal higienizada ou por contaminação aerógena (Monte et al., 1986).

#### 2.3.2.2. Defeitos no sabor e odor

O aparecimento desta alteração após vários dias de processamento deve-se ao tratamento térmico deficiente e com crescimento posterior de microrganismos sobreviventes. Os microrganismos responsáveis por essa alteração são bactérias acidoláticas, relativamente tolerantes ao calor, que fermentam os açúcares da carne curada, reduzindo o pH do produto, produzindo sabor e odor ácido (Cantoni et al., 1985).

#### 2.3.4. Influência dos microrganismos na qualidade sensorial dos enchidos

Deve ficar assegurado que o nível inicial de microrganismos prejudiciais não sofra um aumento excessivo na primeira fase de fabrico do enchido (ICMSF, 2000). Uma medida essencial é efectuar uma adequada refrigeração. A temperatura dos locais onde se desenrola a preparação e a elaboração dos enchidos não deve ultrapassar os 12 °C, sobretudo nas etapas de miga, mistura e enchimento, pois nestas fases os microrganismos encontram condições ideais para a multiplicação: aumento da superfície da carne, desaparecimento das barreiras naturais devido à destruição da pele e tendões e libertação de nutrientes sob a forma solúvel (Fehlhaber e Janetschke, 1995).

##### 2.3.4.1 Efeitos do microbiota saprófita

O efeito do microbiota dos produtos à base de carne é influenciado pela identidade e número de microrganismos, as suas actividades metabólicas intrínsecas e a expressão destas actividades nos produtos (Frazier e Westhoff, 1988). Estas actividades dependem da composição da carne, ingredientes adicionados (açúcar, sal, nitratos e nitritos), das variáveis como o pH, a temperatura, o potencial oxidação-redução e a magnitude da secagem (Hammes e Knauf, 1993; Montel et al., 1998).

Muitos microrganismos utilizam preferencialmente hidratos de carbono como fonte de energia para o seu crescimento. Os que se multiplicam aerobicamente sobre a superfície da carne (nomeadamente *Pseudomonas*, *Micrococcus*, bolores e leveduras) oxidam geralmente glúcidos de uma forma bastante completa a dióxido de carbono e água. Se a quantidade de oxigénio é limitada, ou se por outras razões a oxidação é incompleta, ocorre uma certa acumulação de ácidos orgânicos (Lechowich, 1976).

Os produtos da oxidação dos glúcidos afectam relativamente pouco o sabor e o aroma dos produtos cárneos. Não obstante, estes microrganismos obtêm grandes quantidades de energia para o seu crescimento através das citadas reacções, podendo formar colónias sobre a superfície do produto, originando manchas (Lechowich, 1976).

O metabolismo anaeróbio dos glúcidos da carne dá origem a um grupo muito diverso de produtos de fermentação, dependendo principalmente da natureza do microrganismos. Deste modo, as bactérias lácticas homofermentativas produzem ácido láctico (como por exemplo, *Streptococcus* spp. e alguns *Lactobacillus* spp.). Neste caso as principais modificações que os produtos cárneos apresentam são a descida do pH e a intensificação do sabor ácido (Lechowich, 1976).

Com a acidificação desencadeada pelos microrganismos, que hidrolisam os hidratos de carbono até ácido láctico, ocorre a gelatinização da massa, que se consolida e adquire consistência ao corte. A acidificação e modificação do potencial oxidação-redução e do valor de actividade da água conduz a uma alteração do espectro microbiano no enchido (Fehlhaber e Janetschke, 1995).

À medida que a cura do produto vai progredindo, regista-se uma redução dos compostos ácidos disponíveis, conduzindo à morte progressiva dos microrganismos favorecido pela acidez, nomeadamente "*Pseudomonas*", bolores e algumas leveduras (Fehlhaber e Janetschke, 1995).

As espécies microbianas indesejáveis, em particular os microrganismos Gram +, são afectadas por esta alteração das condições ambientais sobretudo pela diminuição de actividade de água. Deste modo é essencial realizar uma dissecação adequada, que é sem dúvida o processo mais importante na obtenção de enchidos, afectando a acidificação, consolidação da textura, coloração e desenvolvimento do aroma. Tal é possível alcançar controlando a temperatura e humidade relativa ambiental (Fehlhaber e Janetschke, 1995).

Se o processo evoluir correctamente, decorridas 24 horas, pode evidenciar-se um aumento substancial do número de *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Micrococcus* benéficos. Posteriormente, à medida que a dissecação progride, o teor destes microrganismos vai-se reduzindo, voltando a diminuir ao fim de cerca de 40 dias de cura (Fehlhaber e Janetschke, 1995).

O número de bactérias Gram negativas diminui continuamente, pelo que no enchido já maturado, normalmente não se detectam pelos processos convencionais de análise (Fehlhaber e Janetschke, 1995).

Ao diminuir o pH, as bactérias lácticas criam condições desfavoráveis ao desenvolvimento de outros microrganismos, como as *Enterobacteriaceas* e a flora patogénica Gram negativa (Allen e Foster, 1960; Zurera-Cosano et al., 1988; Samelis et al., 1994).

Com técnicas de maturação rápida, correm-se alguns riscos sanitários nomeadamente, os que decorrem do desenvolvimento de aeróbios esporulados, provenientes do microbiota original da carne.

Quando os enchidos são embalados em vácuo, as condições ambientais são favoráveis aos microaerófilos, nomeadamente as bactérias lácticas (Router, 1981 *cit in* Samelis et al., 1994).

No decurso do armazenamento prolongado a baixas temperaturas, o desenvolvimento desta flora bacteriana microaerófila, reduz a qualidade de alguns produtos cárneos produzindo aromas e sabores atípicos, descoloração, gás, “slime” (viscosidade) e exsudados leitosos, isto porque a refrigeração inibe o crescimento dos patogénicos, mas não deste tipo de microbiota (Samelis et al., 1994).

São muito diversos os defeitos que o desenvolvimento destas microfloras promove nos enchidos (Quadro 17).

A atmosfera sob vácuo e a embalagem em atmosferas protectoras eliminam o crescimento de bolores (Adams et al., 1987; Zurera-Cosano et al., 1988).

**Quadro 17.** Principais defeitos de enchidos e sua relação com a microbiota. Adaptado de Fehlhaber e Janetschke, 1995.

	Defeito	Microbiota	Condições adjuvantes
<b>Cor</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Superfície de corte baça</li> <li>- descoloração interna</li> <li>- esverdeamento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bactérias, leveduras, bolores da tripa</li> <li>- elevadas cargas microbianas nos condimentos <i>Lactobacillus viridescens</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Temperatura muito elevada ou flutuante, ventilação intensa, carência de nitrito, excesso ou carência de hidratos de carbono</li> </ul>
<b>Aspecto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- revestimento viscoso ou mucoso</li> <li>- revestimento seco e aspecto farinhento</li> <li>- revestimento com áreas secas e diversamente coloridas, circunscritas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- micrococcos, bactérias lácticas, leveduras</li> <li>- leveduras, bolores, micrococcos</li> <li>- material impróprio, lactobacilos, leuconostoc, clostrídios</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Humidade elevada, Ventilação escassa, flutuação térmica</li> </ul>
<b>Cheiro e Sabor</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- penetrante e picante</li> <li>- rancificação</li> <li>- cheiro a “mofo” sabor repugnante, picante, degradação incipiente (putrefacção)</li> <li>- fermentação ácida cheiro e sabor acre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Esporulados aeróbios, fungos</li> <li>- Microrganismos lipolíticos e proteolíticos</li> <li>- putrefacção geral – microrganismos proteolíticos</li> <li>- putrefacção interna – devido à formação de crosta exterior ressequida que impede a exsudação de dentro para fora</li> <li>- actividade tumultuosa de lactobacilos, acidificação rápida ou intensiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Luz</li> <li>Temperaturas elevadas</li> <li>Materiais inadequados para produzir fumo</li> <li>Temperaturas altas</li> <li>Excesso de açúcares</li> </ul>

## 2.4. ACTIVIDADE LIPOLÍTICA DAS LEVEDURAS

### 2.4.1. Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são um conjunto de hidrolases que são responsáveis pela hidrólise dos acilglicéridos. São ubiqüitárias e indispensáveis para a bioconversão dos lípidos na natureza (Gandemer, 1998).

As lipases e as esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lípidos. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também em células de microrganismos (Reed, 1975; Oliveira, 2000).

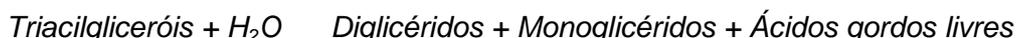
As enzimas lipolíticas, juntamente com as celulases constituem, actualmente, importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas (Jaeger e Eggert, 2002).

As lipases são enzimas que catalizam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos gordos livres, apresentando a capacidade única de actuar apenas na interface óleo/ água (Reed, 1975; Carvalho et al., 2003).

As esterases são as enzimas que actuam em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lípidos (Reed, 1975; Carvalho et al., 2003).

Estas enzimas têm grande importância fisiológica, uma vez que hidrolisam óleos e gorduras em ácidos gordos livres, monoglicéridos e diglicéridos, essenciais aos processos metabólicos, como o transporte de ácidos gordos e a sua oxidação e síntese de glicerídeos e fosfolípidos (Reed, 1975).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), a lipase catalisa a seguinte reacção hidrolítica:



### 2.4.2. Leveduras lipolíticas

Muitos microrganismos são conhecidos por produzir diferentes tipos de lipases de acordo com as condições de cultura tais como o pH, composição do meio de cultura, temperatura e tempo de incubação, além da acção da enzima em relação à especificidade do substrato (Hadeball, 1991).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo os melhores produtores de lipases (Cardenas et al. 2001). As espécies de fungos filamentosos produtoras de lipases são pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* (Gandemer, 1998).

De entre as leveduras a *Candida rugosa* é a que mais tem sido empregue em processos industriais (Hadeball, 1991).

Apenas alguns gêneros de leveduras são capazes de sintetizar lipases. São eles: *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomucopsis* e *Yarrowia* (Quadro 18).

**Quadro 18.** Espécies de leveduras lipolíticas e localização celular das enzimas lipolíticas

Levedura	Localização Celular	Referência
<i>Arxulaadeninivorans</i>	Extra-celular	Boer et al., 2005
<i>Candida albicans</i>	Extra-celular	Hube et al., 2000
<i>Candida antarctica</i>	Extra-celular	Høegh et al., 1995 Rotticci et al., 2001
<i>Candida ernobii</i>	Extra-celular	Pignede et al., 2000a Pignede et al., 2000b
<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604	Ligação celular	Neugnot et al., 2002
<i>Candida rugosa</i> /Cylindracea ATCC 14380 DMS 2031 L 1754	Extra-celular	Brocca et al., 1995 Benjamin et al., 2001 Veeraragavan et al., 1989
<i>Candida curvata</i>	-	Lazar et al., 1992
<i>Candida tropicalis</i>	-	Lazar et al., 1992
<i>Candida deformans</i> CBS 2071	Extra-celular	Bigey et al., 2003
<i>Geotrichum asteroides</i> FKMF 144	Extra-celular	Kazanina et al., 1981
<i>Geotrichum candidum</i> ATCC 34614 NRCC205002 NRRL Y-552 NRRL Y-533 CMICC 335426 ATCC 66592	Extra-celular	Shimada et al., 1990 Bertolini et al., 1994 Bertolini et al., 1994 Bertolini et al., 1994 Charton et al., 1992 Jacobsen et al., 1992
<i>Geotrichum</i> sp. FO401B	Extra-celular	Ota et al., 2000
<i>Kurtzmanomyces</i> sp. I-11	Extra-celular	Kakugawa et al., 2002
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Extra-celular	Oishi et al., 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	Oishi et al., 1999

**Quadro 18.** Espécies de leveduras lipolíticas e localização celular das enzimas lipolíticas (continuação)

Levedura	Localização Celular	Referência
<i>Saccharomysifibuligera</i>	-	Pandey et al., 1999
<i>Trichosporonasteroides</i>	Extra-celular	Dharmsthiti et al., 1997
<i>Trichosporoncutaneum</i>	Extra-celular	Chen et al. 1993
<i>Trichosporonfermentans</i> WU-C12	Extra-celular	Chen et al., 1993 Chen et al., 1994 Arai et al., 1997
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Extra-celular e ligação celular	Ota et al., 1982 Pignede et al., 2000a Pignede et al., 2000b

#### 2.4.2.1. Lipólise peroxissomal

A via metabólica da levedura envolvida na biotransformação foi proposta por Okui et al. (1963). Estes autores identificaram em *Candida* a presença de intermediários que comportavam 18 a 8 carbonos, derivados do catabolismo do ácido ricinoleico. Admitiram a hipótese da degradação do ácido ricinoleico em ácido 4-hidroxidecanoico (precursor directo da  $\gamma$ -decalactona) ser realizada pelas enzimas da beta-oxidação, via exclusivamente peroxissomal nas leveduras. Os mesmos intermediários foram evidenciados em *Yarrowia lipolytica* (Gatfield et al., 1993) e em *Sporidiobolus ruinenii* (Spinnler et al., 1996).

A beta-oxidação é um sistema de oxidação cíclica de ácidos gordos que consiste numa sequência de quatro etapas, repetida várias vezes, com degradação do substrato em unidades de acetil-CoA (Figura 4.)

Os ácidos gordos, antes de entrarem nos peroxissomas, são activados no citoplasma em ésteres de CoA, por acção de uma acetil-CoA sintetase. A beta-oxidação é catalisada, nos peroxissomas das leveduras, pela acetil-CoA oxidase e depois, por duas actividades de uma enzima multifuncional, 2-enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase, e pela 3 - cetoacetil-CoA tiolase.

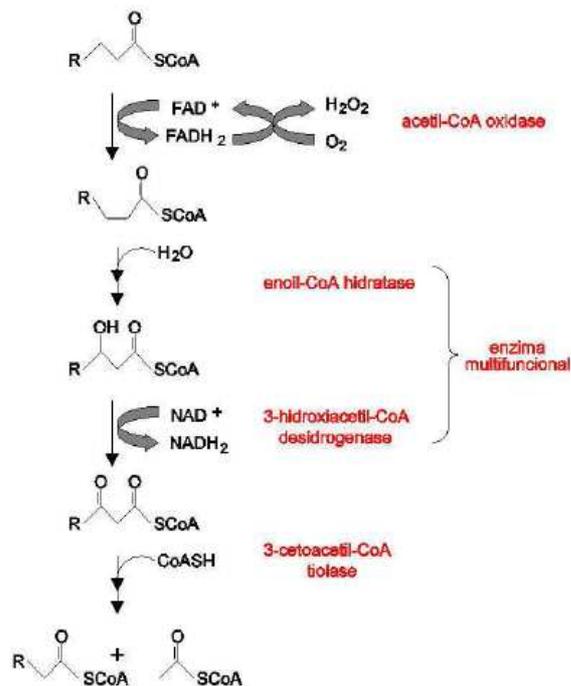
Os peroxissomas são pequenos organitos onde decorre a  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos de cadeia longa, de forma a facilitar a sua degradação subsequente pela mitocôndria. As principais diferenças entre a oxidação peroxissomal e mitocondrial são:

- os ácidos gordos difundem-se livremente para dentro do peroxissoma, não precisando de ser transportados pela carnitina. Os produtos de oxidação seguem para a mitocôndria, depois de esterificarem a carnitina.

- a oxidação do acil-CoA não é feita pelo FAD, mas pelo oxigénio, produzindo peróxido de hidrogénio.
- A tiolase peroxissomal é praticamente inactiva com acil-CoA com menos de 8 carbonos. Por isso, a degradação de ácidos gordos no peroxissoma é incompleta.

As leveduras lipolíticas como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* são capazes de crescer em diferentes tipos de ácidos gordos incluindo os saturados, monoinsaturados e os polinsaturados (Roermund et.al, 2003).

Downes (1959) na África do Sul estudou, em amostras de manteiga, a ocorrência de rancificação e sua relação com a velocidade na produção de lipase pela *Pseudomonas fluorescens*, pela *Candida lipolytica* e por um bolor não identificado e ainda os ácidos gordos produzidos pela acção dessa enzima sobre a gordura do alimento em estudo. Este autor, nas suas pesquisas, verificou que a *Candida lipolytica* era o microrganismo deteriorante mais activo entre os estudados. Observou ainda que, a  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a rancificação era constatada após 3 meses e que a  $13,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  essa alteração era detectada após o período de 72 h, havendo em todos os casos a produção de ácidos de cadeia curta ácido butírico (4:0) e ácido capríco (6:0) e de cadeia média ácido caprílico (8:0) e ácido cáprico (10:0).



**Figura 4.** Enzimas da  $\beta$ -oxidação peroxissomal na levedura.

Adaptado de Pagot et al., 1998

#### 2.4.2.2. Produtos da $\beta$ -oxidação peroxissomal

Os ácidos gordos livres de cadeia curta voláteis resultantes da  $\beta$ -oxidação peroxissomal são responsáveis pela rancificação dos géneros alimentícios. À parte dos efeitos sobre a vida útil e aroma, a formação de compostos de oxidação em carnes e produtos à base de carne está a merecer uma atenção crescente pela sua implicação na saúde. Os hidroperóxidos alteram as vitaminas e a hemoglobina, inibem algumas enzimas, oxidam os grupos sulfidrilo, podem produzir lesões patológicas no aparelho digestivo e parece que sensibilizam a acção de certos agentes carcinogénicos. Também induzem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, fenómeno reconhecido como um passo importante no início da formação das placas aterogénicas (Landbo e Meyer, 2001).

Os produtos de oxidação do colesterol (COPS) também têm actividades biológicas adversas. Os COPS constituem um grupo com mais de 60 compostos, alguns dos quais exibem efeitos severos em vivo com angiotoxicidade, aterogénese, mutagénese e carcinogénese. Os efeitos biológicos foram revistos por Finocchiaro e Richardson (1983), Peng e Taylor (1984), Bösiinger et al. (1993) e Paniangvait et al. (1995). O composto  $\beta$ -epoxi-colesterol (colesterol 5 $\alpha$ -6 $\alpha$ -epóxido), relacionado com lesões de aterosclerose e carcinogénese (Finocchiaro e Richardson, 1984; Tsai e Hudson, 1984), o composto 25-hidroxicolesterol (5-colesten-3  $\beta$ -25-diol) e colestetriol (colesten-3  $\beta$ -6  $\beta$ -triol) ambos citotóxicos e angiotoxicos (Park e Addis, 1986; Nourroz-Zadeh e Applequist, 1987; Zhang et al. 1991; Paniangvait et al., 1995).

Maraschiello (1998) fez uma revisão das formas moleculares dos principais COPS e as vias de formação.

### 3. OBJECTIVOS

Os fungos que colonizam os produtos cárneos, conservados por processos de cura, de maturação ou pela adição de aditivos ácidos, sal, pela desidratação e/ou fumagem, são os agentes que desencadeiam a respectiva decomposição. Sempre que esses produtos são acondicionados em atmosferas protectoras procura-se interferir e condicionar a evolução do micobiota.

O micobiota dos enchidos tradicionais desempenha dois tipos de funções: algumas espécies fúngicas favorecem a afinação das características sensoriais, outras têm manifesta influência na decomposição e por isso afectam negativamente a qualidade deste tipo de produtos.

O facto de alguns fungos contaminantes dos enchidos conseguirem multiplicar-se em condições ecológicas que são desfavoráveis para a maior parte das bactérias (baixa actividade da água, elevada pressão osmótica,  $pH < 5$ ), confere-lhes vantagens na colonização e multiplicação. Em condições de anaerobiose, estão favorecidas ainda as leveduras e outros fungos com metabolismo microaerófilo (Matos et al., 2007)

A determinação do teor micológico e a caracterização do micobiota de enchidos tradicionais portugueses acondicionados em atmosferas protectoras teve, por isso, um duplo objectivo: avaliar a diversidade fúngica dos enchidos e conhecer a respectiva influência na conservação destes produtos.

A selecção de alguns enchidos tradicionais para se averiguar em que medida o respectivo micobiota é influenciado pela tecnologia de conservação baseou-se nos seguintes pressupostos:

- a) Os produtos à base de carne são contaminados por diversos agentes fúngicos ao longo do processo de transformação (Dillon e Board, 1991);
- b) Alguns desses agentes fúngicos possuem competências fisiológicas que lhes permite multiplicarem-se em condições geralmente adversas para bactérias contaminantes e evoluir concomitantemente com o micobiota de cura ou de maturação;
- c) Alguns enchidos tradicionais portugueses são adicionados de ingredientes que são mais vulneráveis ao ataque fúngico (farinha, pão, arroz) do que ao ataque bacteriano;
- d) As condições de conservação pós-fabrico, em embalagens hermeticamente fechadas, sujeitas de oscilações temperatura, propiciam a ocorrência de fenómenos físicos que conduzem ao aumento localizado da  $a_w$  ("suor dos contentores")
- e) A utilização de atmosferas protectoras, sem oxigénio, como condicionador do tempo de conservação dos enchidos carece de avaliação científica, na medida em que se desconhece de que forma alguns constituintes, dadores de oxigénio (sangue, nitritos, nitratos), poderão desempenhar algum papel na sobrevivência dos fungos presentes nos enchidos.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram efectuadas contagens do micobiota de contaminação de morcelas, chouriços, farinheiras e linguiças, em duas fases distintas de forma a avaliar a evolução do micobiota: na fase inicial e na fase final da vida comercial do produto (3 meses).

##### 4.1 AMOSTRAGEM

As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas em diferentes superfícies comerciais em Lisboa, Portugal.

Em relação a cada um dos tipos de enchidos foram analisados: morcelas, chouriços, farinheiras e linguiças (Quadro 19), todos embalados em atmosferas protectoras (n=12).

**Quadro 19.** Identificação das amostras analisadas.

Nº	Natureza	Código do Lote	Tempo de vida útil	Embalagem
1	Morcele Biológica de Porco Preto	391908	90 dias	Atmosfera protectora
2	Chouriço de Cebola	1001208	90 dias	Atmosfera protectora
3	Chouriço de Cebola Seia	2018175	90 dias	Atmosfera protectora
4	Morcele Alentejana	68	90 dias	Atmosfera protectora
5	Morcele de Assar de Portalegre	912008	90 dias	Atmosfera protectora
6	Morcele de Assar	40	90 dias	Atmosfera protectora
7	Farinheira de Barrancos	11140123	90 dias	Atmosfera protectora
8	Farinheira de Ponte de Lima	452408	90 dias	Atmosfera protectora
9	Farinheira de Arganil	59	90 dias	Atmosfera protectora
10	Chouriço de Vinho de Barrancos	10240128	90 dias	Atmosfera protectora
11	Chouriço Mouro	157	90 dias	Atmosfera protectora
12	Linguiça	22580422	90 dias	Atmosfera protectora

## 4.2 ISOLAMENTO E CONTAGENS DE LEVEDURAS E BOLORES

### 4.2.1. Preparação da amostra

Foram retiradas 10 g de 3 enchidos por cada tipo de enchido e por cada tipo de produto, desprezando o invólucro. Suspenderam-se em 90 ml de água peptonada (Oxoid, CM 9) e homogeneizaram-se em Colworth 400 Stomacher (Seward Medical, London, UK). Preparou-se uma bateria de tubos de ensaio contendo cada um 9 ml de água peptonada (Oxoid, CM 9, Basingstoke, England). Partindo da suspensão  $10^{-1}$  adicionou-se 1 ml ao 1º tubo da bateria e homogeneizou-se em “Vortex” durante 30 segundos. Repetiu-se o procedimento até obter o número de diluições pretendido.

### 4.2.2. Exame micológico

Semearam-se alíquotas de 0,25 ml, por espalhamento à superfície em quatro placas de Petri contendo meio de Agar Dichloran Rose Bengal Chlortetracycline (DRBC) (Oxoid, CM 727; SR 78) perfazendo 1 ml de cada uma das supracitadas suspensões diluídas (King et al., 1984; Samson et al., 1992). Todos os testes foram realizados em duplicado e em condições de assepsia.

As caixas semeadas foram colocadas a incubar a 25 °C durante 5 dias, após o que se procedeu à contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) (Figura 5). Cada colónia isolada foi observada ao microscópio para caracterização morfológica e identificação até ao género (Raper e Fennel, 1965; Domsch et al., 1980).



**Figura 5.** Leveduras e bolores em meio de Agar Dichloran Rose Bengal Chlortetracycline de uma amostra de Farinheira (original).

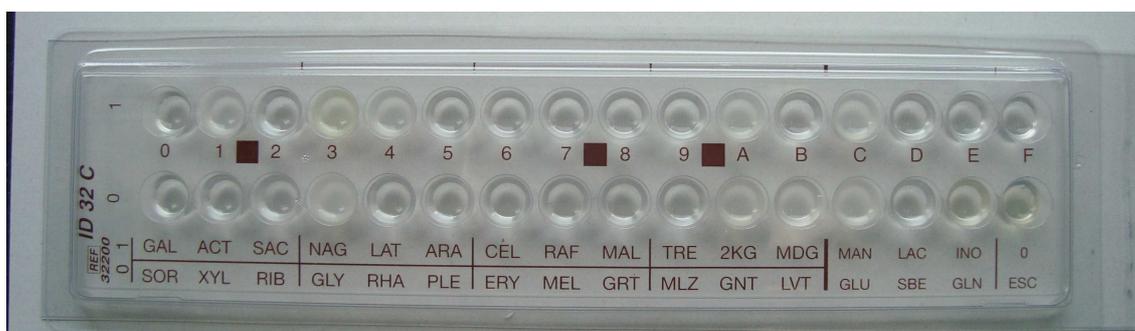
O resultado da contagem total é expresso através do valor da média aritmética das duas determinações (duplicado). Cada colónia isolada foi observada ao microscópio para caracterização morfológica e identificação até ao género (Domsch, et al.1980; Raper e Fennell,1965).

#### 4.2.3. Pesquisa da actividade lipolítica

Foram realizados ainda testes de presença de enzimas lipolíticas. As estirpes foram inoculadas em meio Tributirina Agar (Oxoid, CM 004C), submetendo-se a incubação durante 4 dias a 25 °C. Consideraram-se os resultados positivos quando em torno da colónia, das respectivas estirpes de leveduras, se observaram halos transparentes.

#### 4.2.4. Identificação do micobiota

Para identificar as leveduras efectuaram-se sementeiras de cada tipo de colónia por estria em geloses específicas: ID2 albicans (Bio-Merieux 43572), Sabouraud (Oxoid CM 41). A incubação foi efectuada a 25 e a 37 °C durante três a cinco dias de acordo com van Rij (1984). A identificação das leveduras foi realizada em galerias bioquímicas convencionais (Sistema API, ID32C – Bio-Merieux, 32200) (Figura 6), e a leitura das reacções das provas bioquímicas foi efectuada automaticamente através do sistema ATB (BioMerieux- 14200).



**Figura 6.** Sistema API, ID32C – Bio-Merieux, 32200 (original)

Os resultados obtidos foram considerados individualmente face ao reduzido número de amostras analisadas não se justificando a aplicação de tratamentos estatísticos de significância.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS EM FUNÇÃO DO PRODUTO

Os resultados dos exames micológicos a doze tipos diferentes de enchidos tradicionais portugueses, colhidos aleatoriamente, revelaram que a maioria das amostras tinham contaminação fúngica. Apenas três das amostras não exibiram qualquer contaminação fúngica na fase inicial do estudo (início do prazo de validade). Os exemplares de “Chouriço de cebola” e uma “Morcela de Assar” foram os produtos que não revelaram contaminação fúngica. (Quadro 20).

Os teores fúngicos mais elevados foram encontrados em dois lotes de Farinheiras e numa morcela de Portalegre. Contudo, enquanto na Farinheira não se registou uma redução do teor micológico entre o início e o fim do prazo de validade, no caso da morcela de assar registou-se uma evolução drástica, que conduziu à total supressão do micobiota no final do prazo de validade (Quadro 20).

**Quadro 20.** Teores micológicos encontrados no início e no fim da vida comercial útil de produtos de salsicharia tradicional portuguesa embaladas em atmosferas protectoras.

Nº	Natureza	Teor Micológico Log UFC/g	
		Início da validade	Fim da validade
1	Morcela Biológica de Porco Preto	1,78	0
2	Chouriço de Cebola	0	0
3	Chouriço de Cebola Seia	0	0
4	Morcela Alentejana	4,28	3,43
5	Morcela de Assar de Portalegre	5,90	0
6	Morcela de Assar	0	0
7	Farinheira de Barrancos	5,83	5,67
8	Farinheira de Ponte de Lima	5,09	4,50
9	Farinheira de Arganil	1,78	0
10	Chouriço de Vinho de Barrancos	4,15	0
11	Chouriço Mouro	4,01	0
12	Linguiça	4,47	4,86

Os teores de bolores e leveduras, na primeira fase do estudo, os valores obtidos variaram de inferior a 10 UFC/g a  $8 \times 10^5$  UFC/g, sendo que 7 (58,33%) amostras se revelaram com número igual ou superior a  $10^2$  UFC/g. Na segunda fase do estudo, os valores obtidos variaram de 10 UFC/g a  $6,7 \times 10^5$  UFC/g, sendo que quatro amostras (33,3%) revelaram teores iguais ou superior a  $10^2$  UFC/g.

Tendo em conta os diferentes tipos de enchidos e na primeira fase do estudo: 50% dos chouriços revelaram contagens de leveduras superiores a  $10^2$  UFC/g (Figura 9), 50% das morcelas revelaram contagens de leveduras superiores a  $10^2$  UFC/g (Figura 10) e 66,7% das farinheiras revelaram contagens de leveduras superiores a  $10^2$  UFC/g.

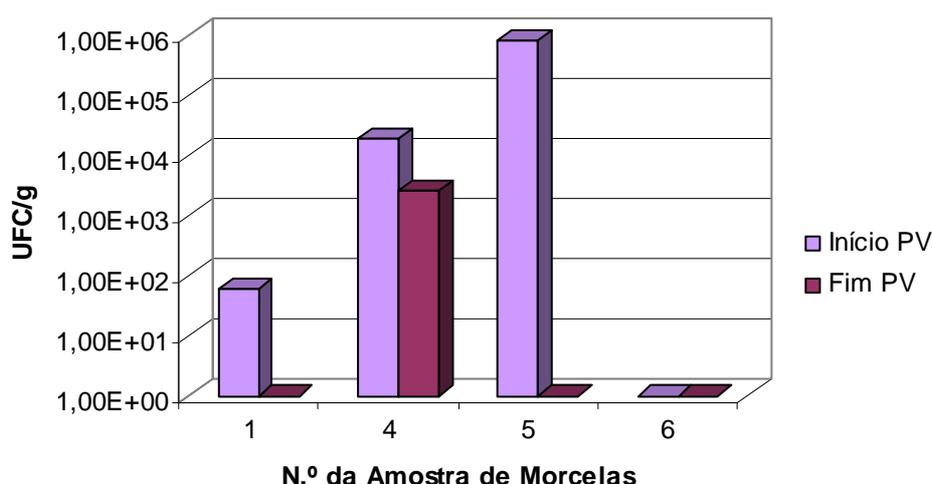
### 5.1.1. Morcelas

A amostra 1 (Morcela biológica de porco preto) apresentou uma contaminação inicial de  $6,0 \times 10^1$  UFC/g e teores micológicos inferiores a 10 UFC/g no fim do prazo de validade do produto (Figura 7).

A amostra 4 (Morcela alentejana) apresentou uma contaminação inicial de  $1,9 \times 10^4$  UFC/g e no final do prazo de validade do produto esta contaminação baixou para  $2,68 \times 10^3$  UFC/g (Figura 7).

A amostra 5 (Morcela de assar de Portalegre) apresentou o teor mais elevado de contaminação micológica dentro das morcelas com  $8 \times 10^5$  UFC/g no início do prazo de validade do produto sendo que na segunda fase do estudo estes teores baixaram para  $<10$  UFC/g (Figura 7).

A amostra 6 (Morcela de assar) não apresentou contaminação micológica em ambas fases do estudo ( $<10$  UFC/g) (Figura 7).



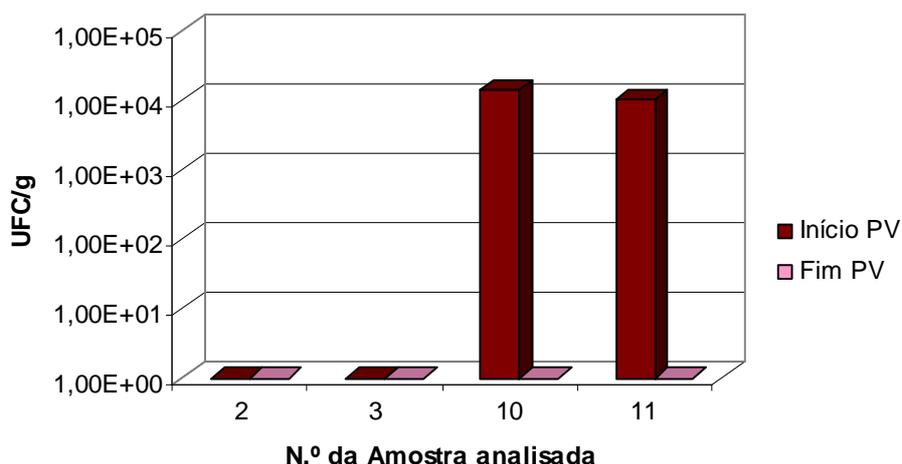
**Figura 7.** Contagem micológica por amostra de morcelas no início e no fim do prazo de validade (PV) dos produtos.

### 5.1.2. Chouriços

Relativamente às amostras de chouriços, duas amostras revelaram contaminações inferiores a 10 UFC/g para as duas fases do estudo (fase inicial e final do prazo de validade do produto). Estas amostras correspondem à amostra 2 e 3 (Chouriço de cebola e Chouriço de cebola de Ceia) (Figura 8).

A amostra 10 (Chouriço de vinho de Barrancos) apresentou teores de contaminação micológica de  $1,42 \times 10^4$  UFC/g na fase inicial de vida comercial do produto e  $<10$  UFC/g na fase final de vida comercial do mesmo (Figura 8).

A amostra 11 (Chouriço mouro) apresentou teores de contaminação micológica de  $1,03 \times 10^4$  UFC/g na fase inicial de vida comercial do produto e  $<10$  UFC/g na fase final de vida comercial do mesmo (Figura 8).



**Figura 8.** Contagem micológica por amostra de chouriço no início e no fim do prazo de validade (PV) dos produtos.

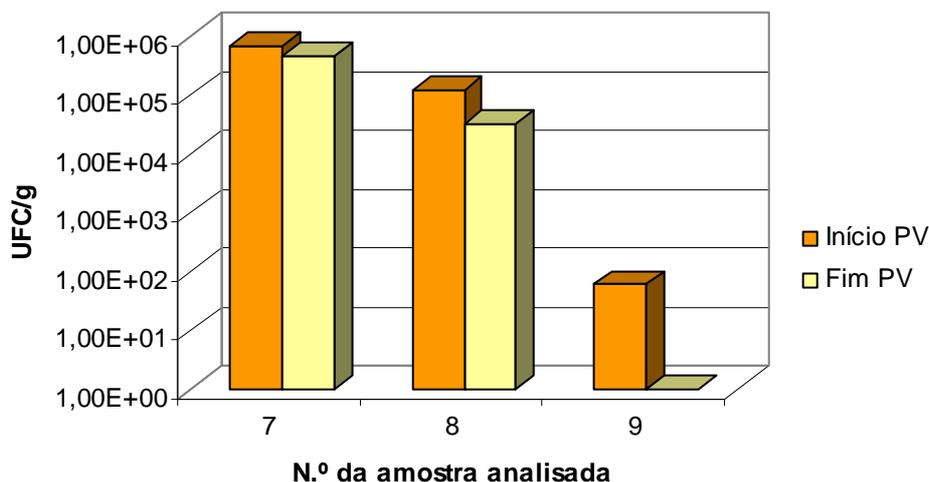
### 5.1.3. Farinheiras

Todas as amostras de farinheiras apresentaram contaminação micológica na primeira fase do estudo (fase inicial do prazo de validade), e duas amostras apresentaram valores superiores a 10 UFC/g (Figura 9).

A amostra 7 (Farinheira de Barrancos) apresentou teores micológicos elevados em ambas as fases de estudo,  $6,8 \times 10^5$  UFC/g na fase inicial e  $4,68 \times 10^5$  UFC/g na fase final do período de vida comercial do produto (Figura 9).

A amostra 8 (Farinheira de Ponte de Lima) com contagens de  $1,224 \times 10^5$  UFC/g no início do prazo de validade do produto e de  $3,18 \times 10^4$  UFC/g no final do prazo de validade do produto (Figura 9).

A amostra 9 apenas apresentou teores de contaminação superiores a 10 UFC/g na primeira fase do estudo, com uma contagem inicial de  $6,0 \times 10$  UFC/g (Figura 9).



**Figura 9.** Contagem micrológica por amostra de farinhas no início e no fim do prazo de validade (PV) dos produtos.

#### 5.1.4. Linguiça

A amostra 12 (Linguíça) apresentou teores micrológicos superiores a 10 UFC/g tanto no início como no final do prazo de validade do produto, nomeadamente  $2,96 \times 10^4$  UFC/g e  $7,23 \times 10^4$  UFC/g. Foi a única amostra onde os teores micrológicos subiram.

## 5.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS EM FUNÇÃO DO PRODUTO

Identificou-se *Saccharomyces cerevisiae* em quatro das amostras, em ambas as fases em análise. *Candida pelliculosa* foi detectada em cinco produtos e em ambas as fases em análise (Quadro 21 e 22), *Zygosaccharomyces* spp. em duas amostras e também na primeira fase do ciclo de analítico. *Candida holmii* foi encontrada apenas na amostra de linguíça analisada no início da vida útil do produto. *Kloeckera japonica* e *Penicillium* spp. apenas foram isolados uma vez e sempre na fase inicial do ciclo de análises.

**Quadro 21.** Distribuição do micobiota total identificado na 1ª Fase do estudo por amostra.

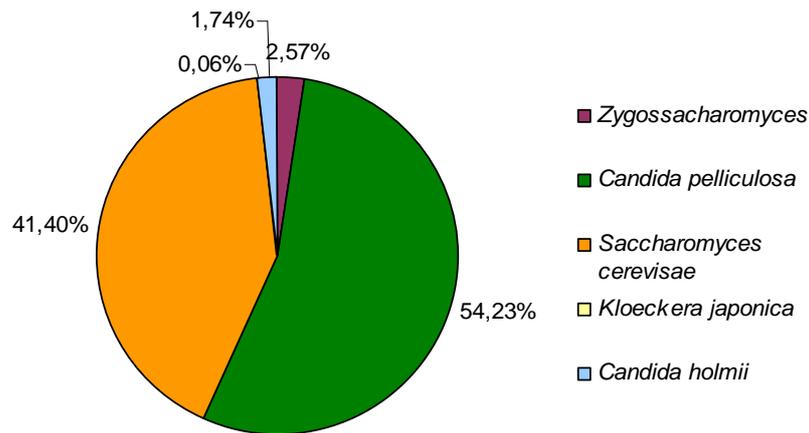
Nº	Natureza	Teor micológico UFC /g					
		<i>C. holmii</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>Kloeckera japonica</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Zygosaccharomyces spp</i>	Outros
1	Morcele Biológica de Porco Preto	<10	<10	<10	<10	6,00x10 <sup>1</sup>	<10
2	Chouriço de Cebola	<10	<10	<10	<10	<10	<10
3	Chouriço de Cebola Seia	<10	<10	<10	<10	<10	<10
4	Morcele Alentejana	<10	<10	<10	<10	1,92x10 <sup>4</sup>	<10
5	Morcele de Assar de Portalegre	<10	7,99x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>3</sup>	<10	<10	<10
6	Morcele de Assar	<10	<10	<10	<10	<10	<10
7	Farinheira de Barrancos	<10	5,7x10 <sup>2</sup>	<10	6,79x10 <sup>5</sup>	<10	<10
8	Farinheira de Ponte de Lima	<10	1,22x10 <sup>5</sup>	<10	<10	<10	<10
9	Farinheira de Arganil	<10	<10	<10	<10	<10	6x10 <sup>1</sup>
10	Chouriço de Vinho de Barrancos	<10	1,42x10 <sup>4</sup>	<10	<10	<10	<10
11	Chouriço Mouro	<10	<10	<10	1,03x10 <sup>4</sup>	<10	<10
12	Linguiça	2,96x10 <sup>4</sup>	<10	<10	<10	<10	<10

Setenta e cinco por cento das colónias foram contadas na primeira fase do estudo das quais 54,23% correspondiam a *Candida pelliculosa*, 41,40% a *Saccharomyces cerevisiae*, 2,57% a *Zygosaccharomyces spp.*, 1,74% a *Candida holmii* e 0,06% a *Kloeckera japonica* (Figura 10).

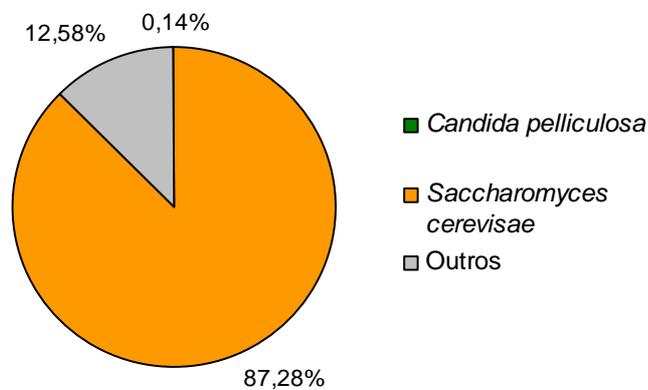
**Quadro 22** – Distribuição do micobiota identificado na 2ª Fase do estudo por amostra.

Nº	Natureza	Teor micológico UFC /g					
		<i>C. holmii</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>Kloeckera japonica</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Zygosaccharomyces spp</i>	Outros
1	Morcelela Biológica de Porco Preto	<10	<10	<10	<10	<10	<10
2	Chouriço de Cebola	<10	<10	<10	<10	<10	<10
3	Chouriço de Cebola Seia	<10	<10	<10	<10	<10	<10
4	Morcelela Alentejana	<10	1,8x10 <sup>2</sup>	<10	2,5x10 <sup>3</sup>	<10	<10
5	Morcelela de Assar de Portalegre	<10	<10	<10	<10	<10	<10
6	Morcelela de Assar	<10	<10	<10	<10	<10	<10
7	Farinheira de Barrancos	<10	<10	<10	4,68x10 <sup>5</sup>	<10	<10
8	Farinheira de Ponte de Lima	<10	6,00x10 <sup>2</sup>	<10	3,12x10 <sup>4</sup>	<10	<10
9	Farinheira de Arganil	<10	<10	<10	<10	<10	<10
10	Chouriço de Vinho de Barrancos	<10	<10	<10	<10	<10	<10
11	Chouriço Mouro	<10	<10	<10	<10	<10	<10
12	Linguiça	<10	<10	<10	<10	<10	7,23x10 <sup>4</sup>

Na segunda fase do estudo (Figura 11) foram identificadas 25% das leveduras das quais 87,28% correspondiam a *S. cerevisiae* e 12,58% a *C. pelliculosa*.



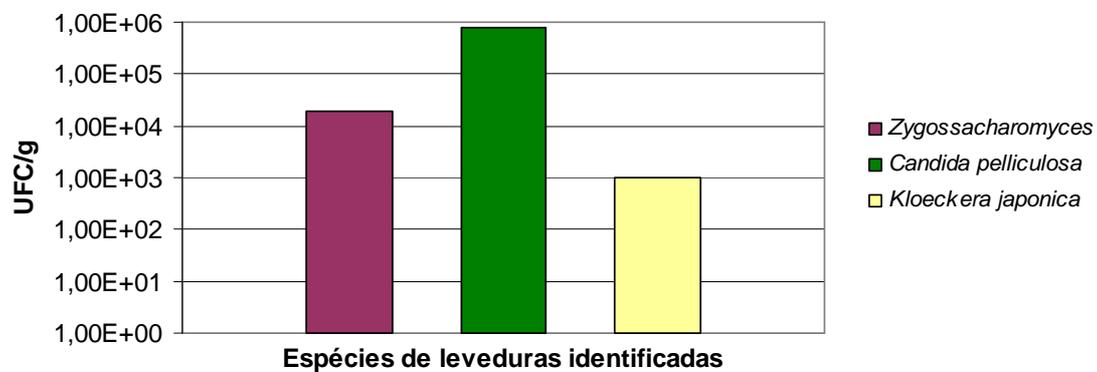
**Figura 10.** Percentagens da contagem de UFC de leveduras no início do prazo de validade.



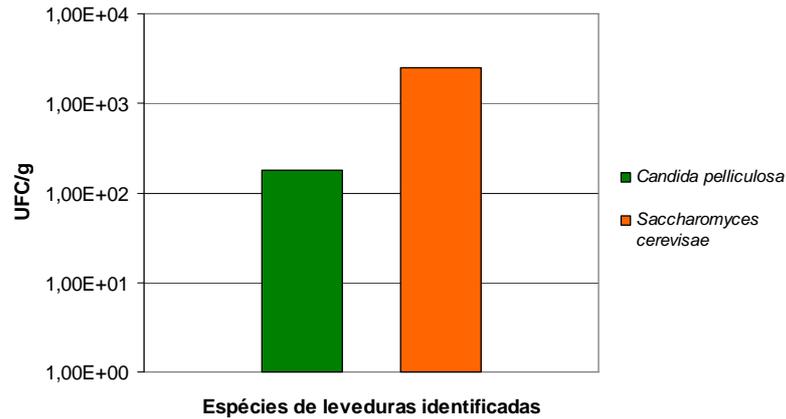
**Figura 11.** Percentagens da contagem de UFC de leveduras no fim do prazo de validade.

### 5.2.1. Morcelas

Em morcelas a levedura mais frequentemente identificada na primeira fase foi a *C. pelliculosa* (97,5%) (Figura 12) e na segunda fase *S. cerevisiae* (93,2%) (Figura 13).



**Figura 12.** Teores micológicos em Morcelas na 1ª Fase do Estudo Analítico (início do prazo de validade)



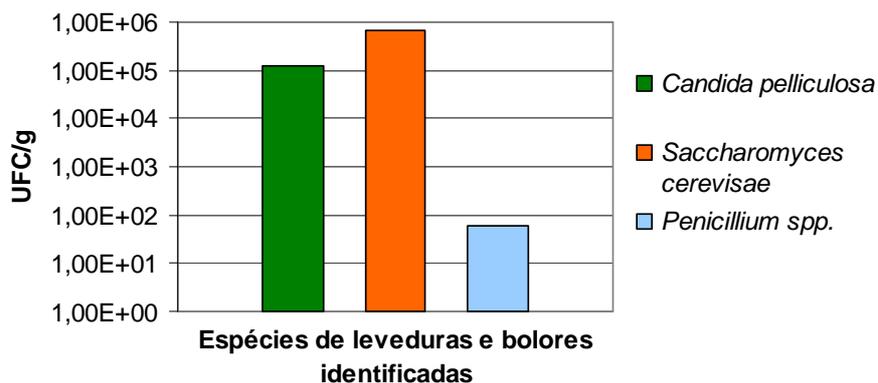
**Figura 13.** Teores micológicos em Morcelas na 2ª Fase do Estudo Analítico (final do prazo de validade)

### 5.2.2. Chouriços

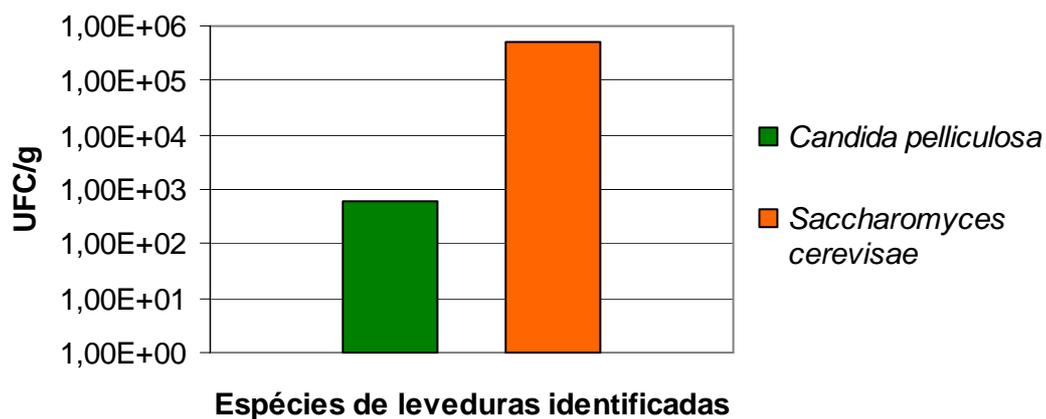
Em chouriços a levedura mais frequentemente identificada na primeira fase foi a *S. cerevisiae* (100%) e na segunda fase não houve crescimento de microbiota.

### 5.2.3. Farinheiras

Em farinheiras a levedura mais frequentemente identificada na primeira fase e na segunda fase *S. cerevisiae* (84,67 e 99,9% respectivamente) (Figura 14 e 15).



**Figura 14.** Teores micológicos em Farinheiras na 1ª Fase do Estudo Analítico (início do prazo de validade)



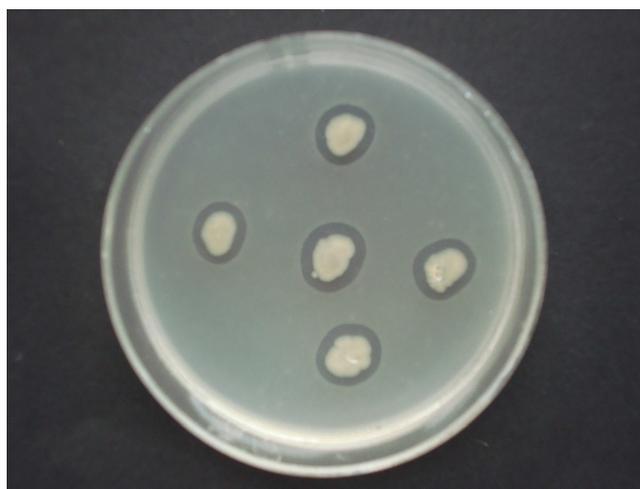
**Figura 15.** Teores micológicos em Farinheiras na 2ª Fase do Estudo Analítico (fim do prazo de validade)

#### 5.2.4. Linguiça

Na amostra de linguiça na primeira fase 100% das leveduras identificadas pertenciam à espécie *C. holmii*.

#### 5.2.5. Actividade lipolítica

A actividade lipolítica foi detectada em 98,6% dos isolados de leveduras estudados (Figura 16). A única levedura que não exibiu competência lipolítica foi *Kloeckera japonica*. Esta levedura foi identificada numa das amostras de morcela (Figura 17).



**Figura 16.** Aparência macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* em Tributirina Agar, com actividade lipolítica (original).



**Figura 17.** Aparência macroscópica de *Kloeckera japonica* em Tributirina Agar, sem actividade lipolítica (original).

## 5. DISCUSSÃO

As atmosferas protectoras usadas na conservação de enchidos tradicionais portugueses têm uma dupla função: por um lado conferir protecção directa aos produtos, que sendo, em regra, muito gordos, oxidariam facilmente as suas gorduras insaturadas conduzindo assim ao aparecimento de ranço oxidativo, sabores e cores anormais e degradação de características nutricionais essenciais; por outro lado, pelo facto de inibirem o desenvolvimento do microbiota aeróbio estrito, evitam a decomposição e aumentam o tempo de vida comercial dos produtos.

No caso das amostras testadas constatou-se que três produtos nunca exibiram qualquer contaminação fúngica. Esta característica pode decorrer do facto de esses produtos serem submetidos a determinado tratamento térmico após o enchimento e, por essa via, provocar-se a inactivação do microbiota nas respectivas pastas.

O facto de os teores fúngicos mais elevados terem sido encontrados em duas amostras de farinheira e numa morcela de Portalegre, pode decorrer da respectiva produção. Contudo, enquanto na farinheira não se registou uma redução do teor micológico entre o início e o fim do prazo e validade, no caso das morcelas de assar registou-se uma evolução drástica, que conduziu ao desaparecimento à total supressão do microbiota no final do período de validade para consumo.

O único produto em que o teor de leveduras se manteve ao longo do período de vida comercial foi na amostra de linguiça. Pode colocar-se como hipótese que a eventual utilização de nitritos e/ou nitratos na pasta deste produto (cedência de oxigénio) possa permitir a sobrevivência das leveduras em causa (*Candida holmii*).

Os teores de leveduras e bolores detectados parecem ter relevância qualitativa, na medida em que se apresentaram sistematicamente superiores a  $10^2$  UFC/g. Estes valores não são suficientes para interferirem com qualquer aspecto organoléptico que seja sensorialmente perceptível. Para isso os teores micológicos teriam de se situar acima de  $10^7$  UFC/g (Mossel e Garcia, 1975).

Estão publicados trabalhos nos quais se quantificam e caracterizam as leveduras que são encontradas em produtos à base de carne (Dillon e Board, 1991; Grazia et al., 1989). Em presunto e bacon estão descritos teores entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/g (Cantoni et al., 1985; Monte et al., 1986; Giménez, 1992, Trigueros, 1995).

Nenhum dos valores encontrados são relevantes para a questão da determinação do prazo de validade para consumo deste tipo específico de produtos, na medida em que nunca foram encontrados valores que se aproximassem dos limites críticos ( $10^{7.5}$  UFC/g).

Gama et al. (1997), obteve níveis de contaminação mais elevados que oscilaram entre  $10^3$  e  $10^9$  UFC/g, pela análise da fracção lipídica de produtos à base de carne. Estes valores podem indiciar que a fracção gorda constitui uma matriz mais propícia ao desenvolvimento das leveduras.

Quando comparado com os enchidos produzidos na Umbria (Itália) verificou-se que o teor de leveduras também oscilou entre  $10^2$  e  $10^4$  UFC/g (Buzzini e Haznedari, 1995). Neste mesmo estudo as espécies predominantes foram *Debaryomyces hansenii* (teleomorfo de *Candida famata*), *Candida zeylanoides* e leveduras do género *Rhodotorula* spp.

A redução que se registou nos teores micológicos ao longo do período de vida comercial da maioria dos enchidos testados pode ser consequência da diminuição do potencial de oxi-redução, inerente à utilização das atmosferas protectoras.

As maiores reduções do teor fúngico registaram-se nas amostras de chouriço de vinho e chouriço mouro, com uma diminuição na ordem dos 99,99%. A eventual depleção do oxigénio que se encontrava inicialmente conjugado com o sangue ou com a hemoglobina pode ser o motivo que justifica o elevado teor inicial de leveduras e a sua subsequente redução nos dois meses de período de conservação atribuído pelo fabricante.

Os enchidos nos quais se detectaram sistematicamente contaminações mais relevantes foram os dois tipos de farinheiras. Também foram estes os produtos que revelaram teores mais elevados no fim da vida comercial. Esta constatação deve ser tida em consideração na medida em que estes produtos têm normalmente maior teor de gordura na sua composição, sendo portanto mais vulneráveis ao ataque dos agentes microbianos lipolíticos. Para além disso usam como ingrediente grandes quantidades de farinha de trigo, que é uma matriz especialmente propícia ao ataque por leveduras, especialmente pelas fermentadoras. Foram precisamente essas espécies de leveduras que predominaram nas farinheiras – *Saccharomyces cerevisiae*.

A evolução destas contaminações fúngicas está dependente de múltiplos factores, entre os quais se podem referir a própria natureza da contaminação fúngica, as espécies em causa, e a respectiva eco-adaptabilidade, isto é, os tratamentos físicos a que os produtos foram submetidos (escaldados, embalados em atmosferas protectoras) e aos compostos químicos utilizados como ingredientes ou aditivos (Sal, polifosfatos, nitritos, nitratos, sais de ácidos orgânicos: acetato, sorbato, lactato, propionato). Determinados aditivos, como os sulfitos, citratos e acetatos favorecem claramente o desenvolvimento fúngico nos enchidos, sendo que a metabolização daqueles aditivos, pode, numa segunda fase, favorecer o desenvolvimento bacteriano (Dillon e Board, 1989).

Alguns autores referem que o microbiota bacteriano co-colonizador dos enchidos tem um papel limitante do desenvolvimento e evolução das contaminações fúngicas (Banks et al., 1985).

Apenas uma das leveduras isoladas dos enchidos (*Kloeckera japonica* em morcela) não exibiu competência para decompor as gorduras (lipólise), todas as restantes (98,6%) eram lipolíticas. Esta capacidade expressa de forma clara uma adaptação das leveduras em causa à matriz (pasta de enchido); confirmada aliás pela predominância clara de duas espécies nas culturas obtidas, o que corresponde claramente a uma

situação evolutiva do micobiota original, que seria necessariamente mais heterogéneo (Dillon e Board, 1991). Aliás a baixa diversidade de espécies que se registou traduz exactamente a evolução e a supremacia dos agentes que se adaptaram à matriz numa determinada fase da maturação.

Entre as leveduras encontradas, destacou-se pela sua maior prevalência *Saccharomyces cerevisiae* (53,6 %). Esta levedura tanto foi encontrada na fase inicial da vida comercial dos enchidos como na fase final dos mesmos, o que pode indicar uma adaptação bastante eficaz à matriz. Sendo bem conhecida a actividade fermentadora desta espécie fúngica e utilizando-se diversos ingredientes vegetais nos enchidos (farinha, pão, arroz, calda de pimentão, salsa, alho) é natural que estes agentes encontrem nestas matrizes nutrientes adequados à sua actividade e desenvolvimento.

Esta levedura é normalmente referida como um dos agentes de fermentação mais poderosos que se conhece, sendo considerada pela Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos (EFSA) um agente presuntivamente qualificado seguro\* (QPS - qualified presumption of safety). A sua introdução no microbiota dos chouriços deve ocorrer essencialmente através dos ingredientes de origem vegetal (ervas aromáticas, alho, pimentão ou outros condimentos). Os enchidos que utilizam grandes quantidades de amido (farinheiras, alheiras e morcelas de arroz) devem ser, por definição, os que são mais vulneráveis à acção das leveduras desta espécie. No estudo que aqui se apresenta constatou-se exactamente isso: os teores mais elevados de *Saccharomyces cerevisiae* foram precisamente detectados em farinheiras e permaneceram quase constantes até ao fim da vida comercial nesses enchidos.

A acumulação de grandes quantidades de gás dentro de uma das embalagens de farinha pode ter eventualmente como explicação a multiplicação deste agente; ou ser o resultado de uma descalibração da máquina que substitui a atmosfera dos enchidos ou material de embalagem inadequado.

Seria bastante importante avaliar como se comportaria esta espécie de levedura fermentadora em farinheiras mantidas em atmosferas naturais, e se a eventual evolução destes agentes durante a vida comercial da farinha provocaria alterações de sabor e aroma (acidificação).

As leveduras que foram encontradas como as segundas mais frequentes pertenciam ao género *Candida* (*C. pelliculosa* e *C. holmii*), embora elas tenham tido uma prevalência mais elevada na primeira fase do estudo. No fim do prazo de validade apenas se encontrou *C. pelliculosa* numa amostra de Morcela Alentejana e numa de Farinha de Ponte de Lima, mas em teores muito baixos ( $1,80 \times 10^2$  e  $6,00 \times 10^2$  UFC/g, respectivamente). A detecção de *C. pelliculosa* em enchidos foi referida pela primeira vez por Leistner e Bem (1970), citados por Dillon e Board (1991).

O género *Candida* engloba 163 espécies, sendo que 60 delas são encontradas com frequência nos alimentos. Apenas um número muito restrito de espécies de *Candida* é usado no fabrico de alimentos maturados ou fermentados, ou como agentes de biocontrolo (*C. glabrata*). A lista das espécies que são usualmente utilizadas na

\* Tradução livre do inglês.

indústria alimentar, integra: *C. kephyr*, *C. zellanooides*, *C. sake*, *C. milleri*, *C. rugosa*, *C. versatilis*, *C. vini*, *C. etchellsii*, *C. oleophila* e *C. utilis* (van Rij, 1984).

Contudo, o estatuto QPS não é aplicável às espécies de *Candida*, mesmo as que são utilizadas para fins industriais (EFSA, 2007). A utilização de leveduras do género *Candida* como probióticos, organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro; deve ser alvo de criteriosos ensaios de biossegurança, tendo em especial consideração o grupo populacional a que o produto se destina.

*C. holmii* é o anamorfo de *Saccharomyces exiguus* e que também já foi designada por *Torula holmii* e *Torulopsis holmii*. Trata-se de uma levedura conhecida pela sua tendência psicrotrófica, o que ajuda a justificar o crescimento, embora ligeiro, da respectiva população e que se registou apenas no único produto em que foi encontrada – Linguíça.

Ao contrário de todas as amostras de enchidos tradicionais portugueses, na linguíça constatou-se um ligeiro aumento da população fúngica ao longo da vida comercial do produto. Estando, tal como todos os outros, embalada numa atmosfera sem oxigénio a linguíça tem de dispor na sua composição de uma fonte de oxigénio residual capaz de permitir a sobrevivência e até a eventual multiplicação desta levedura. Uma hipótese possível pode residir nalguns dos aditivos, nomeadamente nitritos e nitratos.

Este agente é referido habitualmente como um agente telúrico associado ao complexo género *Candida* que integra os micorrizas das plantas. À semelhança das outras leveduras também esta revelou uma evidente competência lipolítica.

*Zygosaccharomyces* sp. foi encontrado em duas amostras de morcela oriundas do Alentejo, em teores de  $6,00 \times 10^1$  e  $1,92 \times 10^4$  UFC/g respectivamente, mas apenas no início da vida comercial destes produtos. Atendendo a que este género de leveduras é extremamente resistente a condições de elevadas concentrações de açúcar (50-60%), sal e aditivos conservantes (ácido acético (2,0-2,5%); sorbatos e benzoatos (800-1000 mg/kg), dióxido de enxofre (> 3 mg/l)), a sua não sobrevivência nos enchidos em causa só pode ser justificada pela redução do potencial de oxi-redução resultante do acondicionamento em atmosfera modificada (Fugelsang, 1998).

Esta levedura também exibiu elevado potencial lipolítico.

*Kloeckera japonica* foi encontrada numa amostra de Morcela de Portalegre, na primeira fase de testagem, não se detectou no final do prazo de validade do produto. Esta levedura é a forma assexuada de *Hanseniaspora valbyensis* (telomorfo).

*Kloeckera japonica* é uma levedura frequentemente referida como contaminante de produtos hortícolas frescos e nas fases iniciais das fermentações alcoólicas, nomeadamente do melaço da cana sacarina (Fugelsang, 1998). A presença desta levedura na fase inicial da vida comercial do produto pode ser uma resultante de contaminações exógenas introduzidas pelos dos ingredientes vegetais.

Esta levedura foi, entre as isoladas, a única que não expressou competência lipolítica.

O único bolor detectado foi *Penicillium* spp. na “Farinheira de Arganil”, num teor muito reduzido (1,8 log UFC/g) e apenas na primeira etapa do ciclo analítico. Tratando-se naturalmente de um fungo aeróbio estrito, a atmosfera condicionada pode ter contribuído para a sua inactivação ao longo da vida útil do produto.

*Penicillium* é um dos géneros fúngicos que se encontram com maior frequência à superfície dos produtos de salchicharia quando não embalados em atmosferas condicionadas ou em vácuo. Nos presuntos, chouriços e queijos são responsáveis pelo aparecimento de múltiplos defeitos de cor (verdes, azuis e cinzentos) cheiro e sabor (mofo, bafio). Algumas estirpes de determinadas espécies de *Penicillia* produzem micotoxinas (Patulina, Citrinina, Ácido ciclopiazónico, Penitrem A, Rubratoxinas, Ocratoxina A, Roquefortina). Contudo, para que a biossíntese destas micotoxinas ocorra nas matrizes alimentares é necessário que a  $a_w$  seja superior a 0,94, o que não é o caso dos enchidos analisados.

No contexto deste trabalho seria interessante averiguar em que medida a actividade lipolítica ocorre de facto sob condições de conservação em atmosferas modificada e em que medida essa actividade interfere com os valores da  $a_w$  e do pH.

Mesmo nos produtos que são ricos em substâncias amiláceas (farinheira e alheira) estes agentes que são equipados com poderosas enzimas capazes de degradar rapidamente hidratos de carbono, não parecem exercer essa actividade sob condições de atmosfera modificada ou com  $a_w$  reduzida (van Rij, 1984).

Este estudo preliminar permite de alguma forma equacionar a possibilidade de que as atmosferas protectoras são eficazes contra a degradação micológica dos enchidos tradicionais. Contudo, esta demonstração deve ser confirmada através de estudos experimentais dirigidos partindo de matrizes inoculadas intencionalmente com teores de leveduras lipolíticas conhecidos e a avaliação da respectiva comportamento, nas condições ideais de armazenamento.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados do estudo preliminar que aqui se apresentam parecem mostrar que, em condições de acondicionamento desses enchidos em atmosferas protectoras, a micobiota dos enchidos em estudo apresentou uma evolução negativa que ajuda à conservação dos produtos, sem se saber contudo de que modo esta redução pode ou não influenciar as características organolépticas dos enchidos. Contudo, tal constatação deverá ser fundamentada e corroborada mediante estudos mais aprofundados e sujeitos a análise estatística.

Os eventuais teores residuais de oxigénio, resultantes da utilização de aditivos alimentares como os nitritos ou os nitratos e o oxigénio eventualmente conjugado com o sangue (morcelas) não parecem influenciar a evolução da micoflora dos enchidos acondicionados em atmosferas protectoras, sem oxigénio.

Os dados obtidos neste estudo apontam para uma redução do teor de leveduras ao longo do período de vida útil destes produtos numa proporção que varia entre 99,00% e 99,99% da micoflora. Apenas na amostra de linguiça não se registou esta tendência.

É provável que os teores de oxigénio residuais iniciais suportem a sobrevivência, e até algum crescimento, de alguns agentes da micoflora nas fases iniciais da conservação dos enchidos, mas à medida que o oxigénio residual vai sendo utilizado, essa depleção parece determinar o declínio dessas populações fúngicas.

Os resultados obtidos também permitiram constatar que a evolução das leveduras encontradas nos enchidos não ocorre de forma uniforme para todas as espécies. Ou seja, parecem existir espécies de leveduras que são muito sensíveis às alterações das condições respiratórias e outras que vão persistindo mesmo quando se aproxima o termo do prazo de validade para consumo.

Neste estudo não se avaliou, e seria interessante determinar, a relação que as leveduras lipolíticas estabelecem com os outros microrganismos presentes nas pastas dos enchidos, nomeadamente com as bactérias lácticas e com algumas bactérias potencialmente patogénicas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium* spp.

Seria também interessante averiguar em que medida a depleção do oxigénio livre que as leveduras eventualmente desencadearão nas fases iniciais da vida comercial dos enchidos embalados em atmosferas protectoras, poderá influenciar o poder conservante dos nitritos e dos nitratos e respectivas consequências sobre a sobrevivência de *Clostridium botulinum*.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, M.R., BAKER, T., FORREST, C.L. - A note on shelf-life extension of British fresh sausage by vacuum packing. *J. Appl. Bacteriol.* 63: (1987). 227-232.

ALLEN, J. R., FOSTER, E. M. - Spoilage of vacuum-packed sliced processed during refrigerated storage. *Food Res.* 25: (1960) 19-25.

ANDERSEN, J. S. - Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *J. of Food Protect.* 58: (1995) 426-429.

ARAI, T., YUSA, S., KIRIMURA, K., USAMI, S. - Cloning and sequencing of the cDNA encoding lipase I from *Trichosporon fermentans* WU-C12. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: (1997) 183-188.

BANKS, J.G., DALTON, H.K., NYCHAS, G.J., BOARD, R.G. - Review – Sulfite, an elective agent in the microbiological and Chemicals changes occurring in uncooked comminuted meat products. *J. Appl. Biochem.* 7(1985): 161-179.

BARD, J., TOWSEND, W.E. Curado de la carne. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Ed. J.F. Price Y.B.S. Schweigert, Acribia, Zaragoza, Espanha, 463-429, 1976

BELITZ, H.D., GROSCH, W. - Quimica de los Alimentos, Ed. Springer, Berlim, pp 272, 1988

BEJAMIN, S., PANDEY, A. - Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biol. and Technol.* 44:2 (2001) 213-221.

BERDAGUÉ, J.L., DENOYER, C., LE QUÉRÉ, J.L., SEMON, E. - Volatile components of dry cured meat. *J. Agric. Food Chem.* 39(1991) 1257-1261.

BERTOLINI, M.C., LARAMÉE, L., THOMAS, D.Y., CYGLER, M., SCHRAG, J.D., VERNET, T. - Polymorphism in the lipase gene of *Geotrichum candidum* strains. *European J. of Biochem./FEBS* 219 (1994) 119-125.

BIGEY, F., TUERY, K., BOUGARD, D., NICAUD, J., MOULIN, G. - Identification of triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: Molecular cloning and functional expression. *Yeast* 20:3 (2003) 233-248.

BOER, E., MOCK, H.P., BODE, R., GELLISSEN, G., KUNZE, G. - An extracellular lipase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*: molecular cloning of the ALIP1 gene and characterization of the purified recombinant enzyme. *Yeast* 22:7 (2005) 523

BOISSONET, B., CALLON, C., LARPENT-GOURGAND, M., MICHAUX, O., SIRAMI, J., BONUIN, P. - Isolation and selection of lipolytic yeast from fermented fry sausages. *Viandes et Produit Carnés* 15: (1994) 64-67

BÖSINGER, S., LUF, W., BRANDL, E. - Oxysterols : their occurrences and biological effects. *Int. Dairy J.* 3: (1993) 1-33.

- BRATZLER, L.J. - Características organolépticas de la carne. Factores que afectan a la calidad e evaluación. *Ciencia de la carne y de los productos cárneos*. Ed. J.F. Price Y.B.S. Schweigert, Acribia, Zaragoza, España, pp. 359, 1976.
- BROCCA, S., GRANDORI, R., BREVIARIO, D., LOTTI, M. - Localization of lipase genes on *Candida rugosa* chromosomes. *Curr. Gen.* 28:5 (1995) 454-457.
- BUZZINI, P., HAZNEDARI, S. -. Characterization of yeasts isolated from fermented sausages produced in Umbria (Italy) and preliminary evaluation of their proteolytic and lipolytic activity. *Industrie Alimentaire* 34 (1995) 620.
- CANTONI, C., COMI, G., D'AUBERT, S., BAVASTRO, G. - Dry salami alterations: acid fermentation, softening and swelling (in Italian). *Industrie Alimentaire*. 10: (1985) 791-798.
- CARDENAS, F., ALVAREZ, E., CASTRO-ALVAREZ, M.S., SANCHEZ-MONTERO, J.M., VALMASEDA, M., ELSON, S.W., SINISTERRA, J.V. - Screening and catalytical activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *J. of Mol. Catalysis B: Enzymatic*. 14: (2001) 111-123
- CARRASCOSA, A.V., MARIN, M.E., CORNEJO, I. - Cambios microbiológicos e físico químicos durante el curado lento. *Alimentaria* 206: (1989)15-22
- CARVALHO, P.O., CAMPOS, P.R.B., NOFFS, M.A., OLIVEIRA, J.G., SHIMUZO, M.T.; SILVA, D.M. – Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova* 26 (2003)
- CATÁLOGO Analítico ID 32 C, 1993. Ref 32290. 1ª ed BioMerieux S.A. Nancy, France, pp250.
- CHARTON, E., DAVIES, C., MACRAE, A.R. - Use of specific polyclonal antibodies to detect heterogeneous lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 29: (1992) 191-198.
- CHEN, J., SHIMURA, S., KIRIMURA, K., USAMI, S. - Lipase production by hydrocarbons by *Trichosporon fermentans* WU-C12 in presence of surfactants. *Biosci. Biotechnol. and Biochem.* 58: (1994) 773-775.
- CHEN, J., SHIMURA, S., KIRIMURA, K., USAMI, S. - Enhancement of lipase production from hydrocarbons by mutation of *Trichosporon fermentans*. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 38:6 (1993) 714-718.
- CORNEJO, I., CARRASCOSA, A.V., MARIN, M.E., AVENDAÑO, M.C - Influencia del salado, el lavado e el reposo sobre la flora superficial, 1990.
- DALTON, H.K., BOARD, R.G., DAVENPORT, R.R. - The yeasts of British fresh sausage and minced beef. *Antonie van Leeuwenhoek* 50:3 (1984) 227-248
- DEÁK, T., BEUCHAT, I.R. - Identification. Handbook of Food Spoilage yeasts. F.M. Clydesdale Ed. CRC press, Inc. U.S.A. 126-154, 1996.

DESPACHO NORMATIVO n.º 38/2008 de 4 de Julho, do Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, que define o modelo de tramitação dos pedidos de adaptação dos requisitos regulamentares previstos no anexo II do Regulamento (CE) n.º 852/2004 e no anexo III do Regulamento (CE) n.º 853/2004.

DHARMSTHITI, S., AMMARANOND, P. - Purification and Characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporonasteroides*). *Biotechnol. and Appl. Biochem.* 26:2 (1997) 111-116.

DILLON, V.M., BOARD, R.G. - The significance of the yeast:bacteria ratio in contamination of lam products. *Letts. Appl. Microbiol.* 8 (1989) 191-193.

DILLON, V.M., BOARD, R.G. - Yeast associated with red meats. *J. Appl. Bacteriol.* 71 (1991) 93-108.

DIRINCK, P., VAN OPSTAELE, F., VANDENDRIESSCHE, F. - Flavour differences between northern and southern European cured hams. *Food Chem.* 59:4 (1997) 511-521

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. - Compendium of Soil Fungi. New York: Academic Press. 1980.

DOWNES, T.E.H. The lipolytic of butter by micro-organisms. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 2 (1959) 527-541.

DUBÉ, D. P., ROBLES, G. A. - Cambios de coloración de los productos cárnicos. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición* 14:2 (2000)114-23.

DYKES, G.A., CLOETE, T.E., VON HOLY, A. - Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked Vienna Sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 13 (1991) 239-248.

EFSA - Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA J.*587 (2007) 1-16.

FEHLHABER, K., JANETSCHKE, P. - Higiene Veterinaria de los alimentos. Acribia, Zaragoza, Espana, pp 429, 1995

FENNEMA, L. - Quimica de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza. 1993

FINOCCHIARO, E.T., RICHARDSON, T. - Sterol oxides in food stuffs: a review. *J. of Food Protect.* 46 (1983) 917-925.

FLORES, J., BERMELL, S. - Estructura, composición y propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares. *Revista Agroquímica Tecnología Alimentaria*, Valencia, 24:1 (1995)15

FLORES, M. L., SUNNER, S., PETERS, L.D., MANGIGO, R. - Evaluation of a phosphate to control pathogen growth in fresh and processed meat products. *J. of Food Protec.* 59 (1996) 356-359.

- FLORES, M., TOLDRÁ, F. - The effect of pork meat quality on its sensory perception. 1999.
- FORREST, J.C., ABERLE, E.D., HEDRICK, H.B., JUDGE, M.D., MERKEL, R.A. - Fundamentos de ciencia de la carne. Zaragoza: Acribia, pp363, 1979.
- FORSS, D.A. - Odor and flavor compounds from lipids. *Prog. Chem. Fast Other Lipids* 13 (1972) 181-158.
- FRANKEL, E.N. - Chemistry of autoxidation, mechanism, products and flavour significance. In MIN, D.B., SMOUSE, T.H. - Flavor Chemistry of fats and oils. Ed.: American Oil Chemist Society, Champaign, Illinois. 1-37, 1985.
- FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C. - Food Microbiology, 4ª Edição. McGraw-Hill, 1988.
- FUGELSANG, F.C. - *Zygosaccharomyces*, A Spoilage Yeast Isolated from Grape Juice, *Viticulture and Enol. Reas. Center*, 1998
- FSIS - Food Safety Inspection Service - Safe Practices for Sausage Production (Course Manual). U. S. Department of Agriculture (USDA), 1999.
- GAMA, S.A., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. - Characterization of yeasts associated with Portuguese pork-based products. *Int. J. of Food Microbiol.* 37(1997) 201-207.
- GANDEMER, G. - Lipids and meat quality, lipolysis, oxidation and flavour. 44<sup>th</sup> ICoMST, Barcelona (1998) 106-116.
- GATFIELD, I. L., GÜNTERT, M., SOMMER, H., WERKHOFF, P. - Some aspects of the microbiological production of flavour-active lactones with particular reference to  $\gamma$ -decalactone. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15 (1993) 165-170.
- GIMÉNEZ, E.H. - Evolution of microbiological parameters in the production of dry-cured hams in Spanish. In PROCEEDINGS OF THE 8<sup>TH</sup> SCIENTIFIC MEETING OF FOOD MICROBIOLOGY GROUP, Cáceres, Spain, 1992
- GRAZIA, L., SUZZI, G., ROMANO, P. e GIUDICI, P. - The yeasts of meat products. *Yeasts* 5 (1989) S 495-S499.
- HADEBALL, W. - Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. *Acta Biotchnol.* 11 (1991) 159-167.
- HAMMES, W.P., KNAUF, H.J. - Starters in the processing meat products. *Meat Sci.* 36 (1993) 155-168.
- HARPER, R. - Sensory Quality Control. In Control of food quality and food analysis. Ed. G.G. Birch and K.J. Parker. *Elsivier Appl. Sci.*, XI (1983) 182-183.
- HORTEIN, I. - Características Organolépticas de la carne. Química del aroma de la carne. *Ciencia de la Carne y de los productos cárnicos*. Ed j. F. Price e Schweigert, Acribia, Zaragoza, España, 359-367, 1976.

HUBE, B., STEHR, F., BOSSENZ, M., MAZUR, A., KRETSCHMAR, M., SCHAFER, W. - Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of Microbiol.*, 174:5 (2000) 362-374.

HØEGH, I., PATKAR, S., HALKIER, T., HANSEN, M.T. - Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Can. J. of Botany*, 73 (1995) S869-S875.

ICMSF - Microorganisms in Foods. Capítulo 1. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 2000

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

JACOBSEN, T., POULSEN, O.M. - Separation and characterization of 61- and 57-kDa lipases from *Geotrichum candidum* ATCC 66592. *Can. J. of Microbiol.*, 38:1 (1992) 75-80.

JANEIRO, P. - Noções de Salsicharia, técnica geral de salsicharia, salsicharia especial. Livraria Luso Espanhola Lda. Lisboa, Portugal. pp104, 1948.

JAEGER, K.E., EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnol.* 13 (2002) 390-397.

KAKUGAWA, K., SHOBAYASHI, M., SUZUKI, O., MIYAKAWA, T. - Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces sp.* I-11. *Biosci., Biotechnol. and Biochem.*, 66: 5 (2002) 978-985.

KAZANINA, G.A., PETROVA, L.A., SELEZNEVA, A.A., RUBAN, E.L., VOLKOVA, I.M. - Isolation and characterization of lipase from *Geotrichum asteroides* FKM F-144. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia* 17:4 (1981) 516-522.

KING, A.D., PITT, J. I., BEUCHAT, L.R., CORRY, J.E.L. - Methods for the mycological examination of food. Cap. 3. Ed. by King, Jr. A.D., Pitt, J. I., Beuchat, L.R. and Corry, J. E. L., NATO ASI Series A: Life Science, New York, vol 122, 127-157, 1984.

KRAMLICH, W. E. - Embutidos. *Ciência de la Carne y de los productos cárnicos*. Ed. J.F. Price e Schweigert, Acribia, Zaragoza, Espana. 493-523, 1976.

LANDBO, A.K., MEYER, A.S. - Ascorbic acid improves the antioxidant activity of European grape juices' ability to inhibit lipid peroxidation of human LDL in vitro. *Int. J. of Food Sci. & Technol.* 36:7 (2001) 727-735.

LANGLOIS, B.E., KEMP, J.D. - Microflora of fresh and dry-cured hams as affected by fresh ham storage. *J. Animal Sci.* 38:3 (1989) 525-531

LAZAR, G., SCHRODER, F.R. In: WINKELMANN, G. ed. *Microbialdegradation of natural products*. VCH, Weinheim, p. 267-291, 1992.

LECHOWICH, R. H. - Microbiologia de la carne. *Ciência de la carne y de los productos carnicos*. Ed. J. F. Price e Schweigert, Acribia, Zaraoza, Espana, 235-295, 1976

- LIEPE, H.U. - Starter cultures in meat production. *Biotechnol* 5 (1983) 399-424.
- LOUREIRO, V. - Yeasts in Food Spoilage. *Eyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Academic Press Limited, London, U.K. 4344-4348, 1992
- LÜCKE, F.K. - Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw hams. *Fleischwirstsh*. 66:10 (1986) 1505-1509.
- MARCY, J.A. KRAFT, A. A., HOTCHKISS, D., MOLLINS R., A., OLSON, D., G., WALKREH., W., WHITE, P. J. - Effect of acid and alkaline pyrophosphate blends on the nature flora of cooked meat system. *J of Food Sci.*, 53 (1988)25-30.
- MARRASCHIELLO, C. - Cholesterol oxidation and parameters related to lipid oxidation in raw and cooked meat from broilers fed dietary oils and fat, natural antioxidants and prooxidants. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, 1998.
- MATOS, T. J. S., JENSEN, B. B., BERNARDO, F. M. A., BARRETO, A. S. F. H., HOJBERG, O. - Mycoflora of two types of Portuguese dry smoked sausages and inhibitory effect of sodium benzoate, potassium sorbate and methyl p-hydroxybenzoate on mould growth rate. *Journal of Food Protection*, 70:6 (2007) 1468-1474.)
- MIN, D.B.S., INA, K., PETERSON, R.J., CHANG, S.S. - Preliminary identification of volatile flavor compounds in the neutral fraction on roast beef. *J. Food Sci.* 44 (1979) 639-644
- MONTE, E., VILLANUEVA, J.R., DOMINGUEZ, A. - Fungal profiles of Spanish country cured hams. *Int J. of Food Microbiol.* 3 (1986) 355-359.
- MONTEL, M.C., MASSON, F., TALON, R. - Bacterial role in flavour development. *Meat Sci.* 49:1 (1998) S111-S123
- MONTET, A., - Les principales méthodes descriptives et leurs variantes. In URDIPILLETA, I., TON NU, C, SAINT DENIS, C e HUON DE KERMADEC, F. - 'Traité d'évaluation sensorielle' – Aspects cognitifs et métrologiques des perceptions'. Dunod, Paris, França, 2001
- MOSSEL, D., GARCIA, B. – Microbiología dos alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad e inocuidad microbiologia dos alimentos. Acribia, Zaragoza, Espanha. pp. 375, 1975.
- NEUGNOT, V., MOULIN, G., DUBRENG, E., BIGEY, F. - The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *European J. of Biochem.* 269 :6 (2002) 1734-1745.
- NOUROOZ-ZADEH, J., APPLEQUIST, L.A. - Cholesterol oxides in swedish food and food ingredients. *J. of Food Sci.* 52 (1987) 57-62
- NP 591. 1969 – Documentação - Enchidos Portugueses. Salpicão. Definição e características. Edição Março de 1970, IGPAI

NP 598. 1969 – Documentação - Enchidos Portugueses. Alheira. Definição e características. Edição Abril de 1970, IGPAI

NP 590. 1989 – Documentação - Carnes, derivados e produtos cárneos. Linguiça. Definição, características e acondicionamento. Elaborado por CT45(IQA). Edição Outubro de 1989, Instituto Português da Qualidade

NP. 597. 1983 – Documentação - Carnes, derivados e produtos cárneos. Farinheira. Definição e características. Edição Março de 1985, Direcção-Geral da Qualidade

NP 593. 1990 – Documentação - Carnes, derivados e produtos cárneos. Morcela. Definição, características e acondicionamento. Elaborado por CT35(IQA). Edição Dezembro de 1990, Instituto Português da Qualidade

NP 595. 1990 – Documentação - Carnes, derivados e produtos cárneos. Chouriço de sangue. Definição e características. Elaborado por CT35(IQA). Edição Dezembro de 1990, Instituto Português da Qualidade

NP 595. 1990 – Documentação - Carnes, derivados e produtos cárneos. Chouriço mouro. Definição e características. Elaborado por CT35(IQA). Edição Dezembro de 1990, Instituto Português da Qualidade

NP 596. 1990 – Documentação - Carnes, derivados e produtos cárneos. Cacholeira. Definição, classificação e características. Elaborado por CT35(IQA). Edição Dezembro de 1990, Instituto Português da Qualidade

NP 589. 2006 – Documentação - Chouriço de carne. Definição, características e acondicionamento. Elaborado por CT35(AFABRICAR). Edição Maio de 2006, Instituto Português da Qualidade

OCKERMAN, H. W., BLUMER, T.N., CRAIG, H.B. - Volatile chemical compounds in dry cured hams. *J. of Food Sci.* 29 (1964) 123-129.

OISHI, H., MORIMOTO, T., WATANABE, Y., TAMAI, Y., - Purification and characterization of phospholipase B from *Kluyveromyces lactis* and cloning of phospholipase B gene. *Biosci., Biotechnol. and Biochem.*, 63:1 (1999) 83-90.

OLIVEIRA, D.T.M. - Lipase extracelular de fungo filamentoso: Isolamento e caracterização parciais. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, pp.152, 2000.

OTA, Y., SAWAMOTO, T., e HASUO, M. - Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B. *Biosci., Biotechnol. and Biochem.*, 64:11(2000) p. 2497-2499.

OKUI, S., UCHIYAMA, M., MIZUGAKI, M. - Metabolism of hydroxy fatty acids: II. Intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by genus *Candida*. *J. Biochem.* 54 (1963) 536-540.

- PAGOT, Y., LE CLAINCHE, A., NICAUD, J.M., WACHE, Y., BELIN, J.M. - Peroxisomal beta-oxidation activities and gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied microbiology and biotechnology*. 49:3 (1998) 295-300.
- PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., KRIEGER, N. e SOCCOL, V.T. - The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. and Appl. Biochem.*, 29:2 (1999) 119-131.
- PANIANGVAIT, P., KING, A.J., JONES, A.D., GERMAN, B.G. - Cholesterol oxides in food and animal origin. *J. of Food Sci.*, 52 (1995) 29-40
- PARK, S.W., ADDIS, P.B. - Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J. of Agriculture and Food Chem.*, 34 (1986) 653-659.
- PEARSON, A.M., YOUNG, R.B. - Muscle and meat biochemistry. Academic Press, pp. 457, 1992.
- PENG, S.K., TAYLOR, C.B. - Cholesterol autoxidation, health and arterosclerosis. *World Reviews in Nutrition and Diet*, 44 (1984) 117-154.
- PERES, F. - Tecnologia dos produtos cárneos – Aulas práticas. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, 2000.
- PIGGOT, J.R. - Dynamism in flavour science and sensory methodology. Proceedings of the International Congress. Improved Traditional Foods for the next Century, Ed. TOLDRÁ, F., RAMÓN D., NAVARRO, J. 28-29. October, Valencia, Spain, 38- 42, 1999
- PIGNEDE, G., WANG, H., FUDALEJ, F., GAILLARDIN, C., SEMAN, M., NICAUD, J.M. - Characterization of an extracellular lipase encoded by Lip2 in *Yarrowia lipolytica*. *J. of Bacteriol*, 182:10 (2000a) 2802-2810.
- PIGNEDE, G., WANG, H., FUDALEJ, F., GAILLARDIN, C., SEMAN, M., NICAUD, J.M. - Autocloning and amplification of lip2 in *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiol.*, 66:8 (2000b) 3283-3289.
- POHLHEIM, L.H.U., MARBURG, E.P. - Nitratos, nitritos y nitrosaminas. *Fleischwirtsch, Español*, 2 (1981) 34-38
- Pr Norma Portuguesa 4263 (1994) Análise Sensorial - Vocabulário. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- PRANDL, O., FISCHER, A., SHMIDHFER, T., SINELL, H. - Tecnologia e Higiene de la carne. Acribia, Zaragoza, Espana, pp 854, 1981.
- PRAPHAILLONG, W., FLEET, G.H. - The effect of pH, sodium choride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.*, 14 (1997) 459-468.
- PRICE, J.F., SCHWEIGERT, B.S. - Ciência de la carne y de los productos cárnicos. Zaragoza: Acribia, pp.581, 1994.

RAPER, K.B., FENNELL D. I. - The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkens Company, (Baltimore), 1965.

REED, G. - Enzymes in food processing. 2. ed. Wisconsin: Academic Press, 573p. 1975.

REGULAMENTO (CE) n.º 178/2002 de 28 de Janeiro, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.

REGULAMENTO (CE) n.º 852/2004 de 29 de Abril, relativo à higiene dos géneros alimentícios.

REGULAMENTO (CE) n.º 853/2004 de 29 de Abril, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.

REGULAMENTO (CE) n.º 854/2004 de 29 de Abril, que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano.

REGULAMENTO (CE) n.º 882/2004 de 29 de Abril, relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais.

REUTER, G. - Psychrotropic lactobacilli in meat products. Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. Ed. Robert, T.A., Hobbs, G., Christian, J. H. B., Skovgaard, N. Ed. Academic Press, London, U.K. 253-258, 1981.

ROERMUND C.W., WATERHAM, H.R., LJST, L., WANDER, R.J. - Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 1838-51

ROTTICCI-MULDER, J. C., GUSTAVSSON, M., HOLMQUIST, M., HULT, K., MARTINELLE, M. - Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose - binding domain. *Protein Expression and Purification*, 21: 3 (2001) 386-392.

RUIZ-CARRASCAL, J., VENTANAS, J., CAVA, R., ANDRÉS, A.I., GARCIA, L. - Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Res. Int.*, 33 (2000) 91-95.

SÁBIO, E., VIDAL-ARAGÓN, M.C., FALLOLA, A., SANABRIA, C., CARRASCOSA, A. - Caracterización de los volátiles presentes en el jamón ibérico. *Alimentaria*, Maio 95: 43-46

SAMELIS, J., STAVROPOULOS, S., KAKOURI, A. E METAXOPOULOS, J. - Quantification and characterisation of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiol.*, 11 (1994), 447-460.

SAMSON, R. A., HOCKING, A.D., PITT, J. I., KING, A. D. - Modern Methods in Food Mycology, ed. R. Samson, A. D. Hocking, J. I. Pitt and A. D. King (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier), 1992.

SANZ, Y., VILA, R., TOLDRA, F. E FLORES, J. - Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. *Int. J. of food Microbiol.* 42 (1998) 213-217.

SCHWAB, U.S. et al. - Varying dietary fat type of reduced-fat diets has little effect on the susceptibility of LDL to oxidative modification in Moderately hypercholesterolemic subjects. *Human Nutrition and Metabolism.* 128 (1998) 1703-1709.

SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y., IIZUMI, T. - cDNA cloning and characterization of *Geotrichum candidum* lipase II. *J. of Biochem.*, 107:5 (1990) 703-707.

SEUß, I. - The nutritional importance of animal fatty tissue. *Fleischwirtsch., Frankfurter*, 73:7 (1993) 751-754,

SEUß, I. - Valor nutricional de la carne y de los productos cárnicos. Consideraciones críticas sobre sus componentes en comparación con otros alimentos. *Fleischwirtsch, Español*, 1 (1991) 47-50.

SHAHIDI, F., RUBIN, L.J., D'SOUZA, L.A. - Meat flavour volatiles: a review of the composition, techniques of analysis and sensory evaluations *CRC Crit. Ver. Food Sci. Nutr.* 24 (1986) 141-243.

SIMARD, R.E., LEE, B. H., LALEYE, C.L., HOLLEY, R.A. - Effects of temperature, hight and storage time on the microflora of vacuum or nitrogen packed frankfurters. *J. of Food Protect.* 46 (1983) 199-203.

SNYDER, P.O. - Antimicrobial effects of spices and herbs. Institute of Technology and Management, Minnesota, 1997

SOUSA, M.C., RIBEIRO, A. - Chouriço de Carne Português: tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica. *Revista Alimentar*, 1 (1997) 17

SPINNLER, H. E., GINIÈS, C., KHAN, J. A., VULFSON, E. N. - Analysis of metabolic pathways by the growth of cells in the presence of organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 3373-3376

Tabela de Composição dos Alimentos, Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge (INSA), 2007

TRIGUEROS, G., GARCÍA, M.L., CASAS, C., ORDOÑEZ, J.A., SELGAS M.D. - Protolytic and lipolytic activities of mould strains isolated from Spanish dry fermented sausages. *Zeitschrift fur Lebensmited*, 1995.

TSAI, L., HUDSON, C.A. - Cholesterol oxidation in comercial dry egg products: isolation and identification. *J. of Food Sci.*, 46 (1984) 1245-1248

- URBAIN, W.M. - Conservación de la carne. *Ciência de la carne y de los productos cárnicos*. Ed. J.F. Price e Schweigert, Acirbia, Zaragoza, España, pp. 359, 1976
- VAN HOLY, A. HOLZAPFEL, W.H., DRKES, G. A. - Bacterial populations associated with Vienna sausages packaging. *Int. J. of Food Microbiol.* 9 (1992) 45.
- VAN RIJ, N.J.W.K. - The yeasts a taxonomic study. 3ª Ed. Elsevier. Amsterdam, NL, p.1-1082, 1984
- VÁRIOS Autores - Evaluation Sensorielle, Manuel Methodologique. Coordenação SSHA e ISHA. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, França, 1990.
- VASILOPOULOS, C., RAVYTS, F., DE MAERE, H., DE MEY, E., PAELINCK, H., DE VUYST, L., LEROY, F - Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *J. of Appl. Microbiol.*, 104: 5 (2008) 1341-1353
- VEERATAGAVAN, K., GIBBS, B.F. - Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnology Letters*, 11 (1989) 345-348.
- VILJOEN, B.C., DYKES, G. A., CALLIS, M., VON HOLY, A.- Yeasts associated with Vienna sausages packaging. *Int. J. of Food Microbiol.* 18: 53 (1993)
- VÖSGEN, W. - Curado. Son necesarios o superfluos el nitrito o el nitrato como agentes curantes? *Fleischwirtsch, español*, 2 (1993) 25-31.
- WIRTH, F. - La reducción y el no empleo de las sustancias de curado en los productos cárnicos. *Fleischwirtsch, español*, 1(1993) 3-9.
- ZHANG, Y.Z., RITTER, W.J., BARKER, C.C., TRACI, P.A., HO, C.T. - Volatile formation by lipid-mediated Maillard reaction on model systems - "Lipids in Food Flavors" American Chemical Society, Washington D.C., USA 49-60, 1994.
- ZURERA-COSANO, G., RINCÓN-LEÓN, F., MORENO-ROJAS, R., POZO-LORA. - Microbial growth in vacuum packaged frankfurters produced in Spain. *Food Microbiol.* 5 (1988) 213- 218.