

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE ENCHIDOS DA BEIRA BAIXA  
E DA BEIRA LITORAL

JOSILENA PATRÍCIA FORTES DUARTE

ORIENTADORA:

DOUTORA CRISTINA MARIA RISCADO PEREIRA MATEUS

2025

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE ENCHIDOS DA BEIRA BAIXA E  
DA BEIRA LITORAL

JOSILENA PATRÍCIA FORTES DUARTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres  
Ferreira

ORIENTADORA:

Doutora Cristina Maria Riscado Pereira  
Mateus

VOGAIS:

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo  
Lemsaddek

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Josilena Patricia Fortes Duarte

Título da Tese ou Dissertação: ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE ENCHIDOS DA BEIRA BAIXA E DA BEIRA LITORAL

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 14 de março de 2025

Designação do curso de  
Mestrado ou de  
Doutoramento: Mestrado em Segurança Alimentar

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função  Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 14 de Março de 2025

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Josilena Duarte*

**Dedicatória:**

**Aos meus pais, ao Sr. Elias.**

**A minha avó “Menhe” (in memoriam)**

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradecer a Deus, por sempre me dar a força de vontade para continuar. Aos meus pais, minha irmã e meus irmãos, que são a minha força, que sempre carregaram os meus fracassos e as minhas vitórias, obrigada por não desistirem de mim.

Ao senhor Elias, que desde pequena vem me acompanhando, apoiando e fazendo questão de me lembrar que solução para pobre são os estudos. À dona Kátia, ao senhor Rui, ao Jack, à Andreia e família, obrigada por me darem oportunidade de ter um trabalho, por me apoiarem sempre. Não há palavras que expressem a minha gratidão. Sem vocês isto não seria possível.

À minha orientadora, Doutora Cristina Mateus, pela disponibilidade, acompanhamento e prontidão para me ajudar. Gratidão.

O meu querido colega e grande amigo João Coelho, que me ajudou e muito nos laboratórios. Obrigada por estares ali comigo, mesmo quando podias estar na tua casa. Gratidão.

À ti Keila, a melhor pessoa que o MSA me deu, obrigada por não me deixares desistir, pelas chamadas de atenção, pelo incentivo de sempre, pelas risadas, pelas longas conversas, pelo companheirismo, obrigada por tudo.

Sem vocês isto não seria possível!

Gratidão!

# ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE ENCHIDOS DA BEIRA BAIXA E DA BEIRA LITORAL

## RESUMO

Os produtos de salsicharia tradicionais portugueses podem ser identificadores de determinadas regiões e a sua qualidade e características organolépticas são influenciadas pelas matérias-primas e ingredientes utilizados, pela região onde são produzidos e pela tecnologia de fabrico. O objetivo deste estudo foi analisar a qualidade microbiológica e físico-química de enchidos (chouriço, paio e morcela) de diferentes origens geográficas, nomeadamente da Beira Baixa (Fundão) e da Beira Litoral (Arganil). Os resultados mostram que a contagem de *Enterobacteriaceae* nos enchidos analisados foram inferiores ao limite de deteção (<10 ufc/g), exceto na morcela e no chouriço de Arganil. As contagens de bactérias do ácido láctico foram superiores no paio do Fundão, indicando uma predominância destas bactérias durante a fermentação/maturação. As contagens de *Staphylococcus coagulase* negativos foram mais elevadas na morcela de Arganil e no paio do Fundão. A morcela de Arganil e o paio do Fundão foram também os que apresentaram valores mais elevados de *Enterococcus* spp. As morcelas de ambas as regiões apresentaram valores de pH estatisticamente superiores ( $P < 0,0001$ ) comparativamente ao chouriço e paio sendo por isso menos ácidas. Contrariamente, as morcelas apresentaram valores de atividade da água ( $a_w$ ) significativamente menores ( $P < 0,0001$ ) que os chouriços e os paios, independentemente da região de produção ( $P > 0,05$ ). Os enchidos do Fundão, em comparação com os de Arganil, tendem a ser mais escuros (menores valores de  $L^*$ ). Por outro lado, os enchidos de Arganil tendem a ser mais vermelhos (maior valor de  $a^*$ ) comparativamente aos do Fundão, com exceção da morcela do Fundão. Os enchidos de ambas as regiões apresentam também diferenças significativas na coordenada  $b^*$  ( $P < 0,0001$ ). Em geral, os teores de aminas biogénicas foram significativamente mais elevados no paio de Arganil ( $P < 0,001$ ) com maior predominância da tiramina seguida da cadaverina. Apesar destas diferenças, provavelmente atribuídas a variações nos processos de produção, ingredientes e condições de armazenamento, não influenciaram negativamente a qualidade dos enchidos em estudo.

**Palavras-chave:** enchidos, região geográfica, análise microbiológica, análise físico-química

# MICROBIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS OF SAUSAGES FROM BEIRA BAIXA AND BEIRA LITORAL

## ABSTRACT

Traditional Portuguese sausage products can be identifiers of certain regions, and their quality and organoleptic characteristics are influenced by the raw materials and ingredients used, by the region where they are produced and by the processing. The objective of this study was to evaluate the microbiological and physico-chemical quality of sausages (“chouriço”, “paio” and “morcela”) from different geographical origins, namely from Beira Baixa (Fundão) and Beira Litoral (Arganil). The results show that the *Enterobacteriaceae* counts in the sausages analysed were below to the detection limit (<10 cfu/g), except for the “morcela” and the “chouriço” from Arganil. The counts of lactic acid bacteria were higher in the “paio” from Fundão, indicating a predominance of these bacteria during fermentation/maturation. The counts of coagulase negative *Staphylococcus* were higher in the “morcela” from Arganil and in the “paio” from Fundão. The “morcela” from Arganil and the “paio” from Fundão were also the ones that presented higher levels of *Enterococcus* spp. The “morcela” from both regions exhibited statistically higher pH values ( $P<0.0001$ ) compared to “chouriço” and “paio”, and therefore less acidic. In contrast, the “morcela” showed significantly lower ( $P<0.0001$ ) water activity ( $a_w$ ) values than the “chouriço” and “paio, regardless of the production region ( $P>0.05$ ). The sausages from Fundão, compared to those from Arganil, tend to be darker (lower  $L^*$  values). On the other hand, Arganil sausages tend to be redder (higher values of  $a^*$ ) compared to those from Fundão, with the exception of “morcela” from Fundão. The sausages from both regions also show significant differences in the  $b^*$  coordinate ( $P<0.0001$ ). In general, the contents of biogenic amines were significantly higher in “paio” of Arganil ( $P<0.001$ ) with tyramine followed by cadaverine as the most abundant. Despite these differences, likely attributed to variations in production processes, ingredients, and storage conditions, they did not negatively influence the quality of the sausages under study.

**Keywords:** sausages, geographic region, microbiological analysis, physico-chemical analysis

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>Índice figuras</b> .....	ix
<b>Índice Gráficos</b> .....	x
<b>Índice tabelas</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	xii
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	2
2.1. Enchidos e a sua origem .....	2
2.2. Os enchidos tradicionais.....	2
2.2.1. Diversidade de enchidos tradicionais.....	3
2.2.1.1. Chouriço de carne.....	4
2.2.1.2. Paio .....	4
2.2.1.3. Morcela.....	4
2.3. Tecnologia de fabrico dos enchidos .....	4
2.3.1. Principais etapas do processo de fabrico dos enchidos .....	5
2.4. Impacto da microbiota na qualidade dos produtos cárneos .....	9
2.4.1. Bactérias de interesse tecnológico.....	9
2.4.2. Bactérias indicadoras de higiene .....	10
2.5. Fatores físico-químicos com influência na qualidade da carne e produtos cárneos ...	11
2.5.1. Potencial hidrogeniónico (pH).....	11
2.5.2. Atividade da água ( $a_w$ ) .....	11
2.5.3. Temperatura.....	12
2.5.4. Cor.....	12
2.5.5. Aminas biogénicas .....	13
2.5.5.1. Estrutura e classificação das aminas biogénicas .....	13
2.5.5.2. Aminas biogénicas nos géneros alimentícios .....	13
2.5.5.2.1. Aminas biogénicas nos produtos cárneos .....	14
2.5.5.3. Efeitos das aminas biogénicas na saúde humana.....	15
2.5.5.4. Métodos analíticos de deteção e quantificação de aminas biogénicas em carnes e produtos cárneos .....	15
<b>3. Objetivos (geral e específico)</b> .....	15
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	16
4.1. Seleção e caracterização das amostras .....	16

4.2. Análise microbiológica .....	17
4.2.1. Meios de cultura e sua preparação .....	17
4.2.2. Sementeira e contagem de colónias .....	18
4.2.2.1. Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	18
4.2.2.2. Contagem de bactérias do ácido láctico.....	18
4.2.2.3. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos .....	19
4.2.2.4. Contagem de <i>Enterococcus</i> spp .....	19
4.3. Análises físico-químicas .....	19
4.3.1. Determinação do pH.....	19
4.3.2. Determinação do $a_w$ .....	20
4.3.3. Determinação da cor.....	20
4.3.4. Determinação das aminas biogénicas .....	21
4.4. Análise estatística.....	22
<b>5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>22</b>
5.1. Parâmetros microbiológicos.....	22
5.2. Parâmetros físico-químicos .....	24
5.2.1. Valores de pH dos enchidos do Fundão e Arganil .....	24
5.2.2. Valores de $a_w$ dos enchidos do Fundão e de Arganil .....	24
5.2.3. Valores da cor dos enchidos do Fundão e de Arganil.....	25
5.2.4. Comparação dos enchidos em estudo .....	27
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>30</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>31</b>

## Índice figuras

Figura 1: Classificação e estrutura química de aminas biogénicas (adaptado de Önal, 2007). .....	13
Figura 2: Amostras dos enchidos usados para análise. a) chouriço; b) morcela; c) paio. ....	16
Figura 3: Preparação da amostra para sementeira de microrganismos.....	18
Figura 4: Potenciómetro HANNA utilizado para medir o potencial hidrogeniónico (pH).....	20
Figura 5: Higroscópio Rotronic HygroPalm utilizado para medir a atividade da água (aw). .	20
Figura 6: Colorímetro CR-400 (Minolta, Japão) utilizado para medir a cor dos enchidos.....	21
Figura 7: Cromatógrafo líquido de alta pressão utilizado para a determinação das aminas biogénicas.....	22

## Índice Gráficos

Gráfico 1. Valores de pH (média $\pm$ desvio padrão) dos enchidos de Fundão e Arganil .....	24
Gráfico 2. Valores de aw (média $\pm$ desvio padrão) dos enchidos do Fundão e de Arganil. ...	25
Gráfico 3. Valores da cor (média $\pm$ desvio padrão) dos enchidos (fatias) do Fundão.....	25
Gráfico 4. Valores da cor (média $\pm$ desvio-padrão) dos enchidos (na amostra homogeneizada) do Fundão.....	26
Gráfico 5. Valores de cor (média $\pm$ desvio-padrão) dos enchidos (fatias) de Arganil.....	26
Gráfico 6. Valores de cor (média $\pm$ desvio-padrão) dos enchidos (amostras homogeneizadas) de Arganil.....	27

## **Índice tabelas**

Tabela 1. Valores médios das contagens de microrganismos nos enchidos do Fundão e de Arganil.....	23
Tabela 2. efeito da região de produção (Fundão versus Arganil) nos parâmetros físicos dos enchidos em estudo. ....	28
Tabela 3. Efeito da região (Fundão versus Arganil) no teor de amins biogénicas dos enchidos em estudo. ....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABs – Aminas biogénicas

$a_w$  – Atividade da água

BAL – Bactérias do ácido

láctico °C – Grau Celsius

h – Horas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / High Performance Liquid Chromatography

IAB \_ Índice de Aminas Biogénicas

ISO – Organização Internacional de Padronização / *International Organization for Standardization*

kg – Quilograma

Log – Logaritmo

decimal LOD – Limite

de deteção mg –

Miligrama

mL – Mililitro

MRS – *Man Rogasa Sharpe Agar*

MSA – *Mannitol Salt Agar*

pH- Potencial hidrogeniónico

NP – Norma Portuguesa

% - Percentagem

pH – Potencial hidrogeniónico

UE – União Europeia

ufc/g – Unidades formadoras de colónia por grama

VRBD – *Violet Red Bile Dextrose*

## 1. Introdução

Os produtos de salsicharia surgiram provavelmente da necessidade de conservação da carne, fonte de proteína de origem animal, constituindo um recurso alimentar para certas populações rurais. A produção de enchidos poderá ajudar no desenvolvimento rural devido à criação de emprego e independência económica. Sendo produtos tradicionais, podem ser identificadores de determinadas regiões e as suas particularidades e qualidade são influenciadas pelos animais que lhes dão origem, os ingredientes utilizados, o clima da região onde é produzido e a tecnologia de fabrico (Laranjo et al., 2016). O setor dos produtos de salsicharia é predominantemente constituído por pequenas empresas ou de tamanho familiar. Estas pequenas indústrias fornecem os mercados regionais, geralmente com produtos processados de forma tradicional enquanto o grande mercado é sustentado por grandes ou médias empresas. A maioria das empresas do setor em Portugal utiliza o porco como matéria-prima de base para o processamento dos produtos. Os produtos de salsicharia são essencialmente os enchidos secos fermentados/curados com baixa atividade de água ( $a_w < 0,90$ ) submetidos a um longo período de maturação e uma acidificação lenta (pH final de 5,2-5,8).

Contudo, o tipo de enchidos depende das características da carne e da região geográfica, dos ingredientes adicionados, do diâmetro, forma e tamanho. Por exemplo, no sul do País (Alentejo) os enchidos são feitos a partir da carne do porco Alentejano, já no Norte é utilizada a carne do porco Bísaro.

Os enchidos são consumidos, principalmente, pelo seu valor nutritivo e propriedades organoléticas. Os consumidores estão cada vez mais exigentes e preferem produtos artesanais e regionais com características típicas e desejáveis. Neste sentido, a indústria alimentar tem procurado responder às exigências e expectativas do consumidor através de uma melhoria da tecnologia do fabrico de enchidos, nas várias etapas do processo de produção, de modo a assegurar a sua qualidade higio-sanitária, nutricional, sensorial e o aumento do tempo de vida útil.

Durante a maturação dos enchidos, as proteínas e outros compostos nitrogenados sofrem uma série de transformações catalisadas por enzimas de origem endógena (próprias da carne) ou de origem exógena (produzidas pela microbiota), cuja atividade depende de fatores intrínsecos da carne e da tecnologia aplicada durante o fabrico dos produtos. Estas reações são responsáveis por um lado pelo desenvolvimento de características sensoriais desejáveis nos produtos, mas por outro lado podem originar compostos indesejáveis, como as aminas biogénicas, que causam efeitos fisiológicos e tóxicos distintos no organismo. O estudo do teor das aminas biogénicas e dos fatores que condicionam a sua produção ao longo do

processamento de enchidos, pode dar informações sobre a influência da tecnologia de produção, nomeadamente, matérias-primas e processamento, na qualidade e segurança de produtos de salsicharia tradicionais.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Enchidos e a sua origem**

Os enchidos são produtos cárneos processados resultantes da transformação da carne, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca (Regulamento (CE) nº853/2004). A elaboração de enchidos constitui uma forma de conservação da carne. A conservação da carne remonta talvez a 3000 anos a.C., sobretudo através da salga, fermentação e fumagem, que permitia que a carne e os produtos cárneos fossem consumidos em períodos de maior escassez de alimentos (Gomes, 2017).

Durante a Idade Média e até ao início do século XX, a carne de porco foi a carne mais consumida em todo o mundo (Dias, 2018). Os gregos foram peritos na arte de corte e conservação do porco, os designados allantaupólés, e os pioneiros na arte dos enchidos. Ao longo dos tempos surgiram diferentes métodos de conservação a partir da necessidade de armazenar os géneros alimentícios (Dias, 2018). Em tempos de escassez, um melhor aproveitamento, valorização e conservação da carcaça de um animal, suas vísceras e pequenos restos de carnes utilizadas na confeção de novos alimentos eram considerados importante para a sobrevivência da população (Bedin, 2014). O interior de todos os animais é, à exceção dos intestinos, estéril, mas a partir do momento do abate do animal e durante a desmancha os tecidos são contaminados com microrganismos que proliferam, provocando um processo de deterioração da carne (Gomes, 2017). Em Portugal, os primórdios da salsicharia remontam aos povos invasores que permaneceram em território nacional durante o século VI a.C., período em que esta foi uma importante componente da dieta das populações rurais (Gomes, 2017).

### **2.2. Os enchidos tradicionais**

Os enchidos tradicionais são produtos únicos que têm normalmente origem em zonas geográficas que são, em regra, associadas à respetiva designação comercial, e de tal forma que é possível demonstrar que a qualidade do produto é influenciada pelas raças de animais, pela natureza dos solos, da vegetação, do clima e pela tecnologia de fabrico (Almeida, 2009).

Na maioria dos países europeus, o consumo de enchidos tradicionais aumentou. Contudo dentro do setor de produtos cárneos processados existem duas categorias principais:

os produtos com origem numa produção mais tradicional e os produtos com origem na produção industrializada (Conceição, 2020).

Segundo Conceição (2020), os produtos com origem numa produção tradicional, provém de animais que são criados em quintas e o processo de fabrico é realizado em pequenas unidades de produção, sendo que o produto final será vendido diretamente pelo produtor. Já nos produtos com origem na produção industrializada, a matéria-prima pode provir de matadouros locais. O produto final será vendido diretamente pela unidade de produção, quer no mercado local nacional, quer para restaurantes tradicionais e gourmet.

A produção de alimentos tradicionais, tanto de forma “artesanal” como a um nível mais industrializado, deverá ser enquadrada segundo as exigências atuais de higiene/salubridade, numa dupla perspetiva: de proteção do consumidor e de valorização económica dos recursos locais. Os consumidores têm tendência para valorizar especialmente as características sensoriais e nutricionais dos produtos tradicionais, embora também tenham vindo a dar cada vez mais importância à segurança dos alimentos (Almeida, 2009).

A qualidade intrínseca dos produtos está intimamente ligada à região que lhe deu origem. Cada região é caracterizada por elementos físicos e socioculturais próprios que, de uma forma objetiva, mas também simbólica, são transportados para os produtos agrícolas e agroalimentares dessa região (Tibério, 2008).

Tradicionalmente os enchidos eram produzidos durante os meses de Inverno, período do ano em que as condições climáticas, mais especificamente de temperatura e humidade, são mais favoráveis à sua produção, permitindo uma melhor conservação da carne e do produto final. Os enchidos tradicionais portugueses fazem parte da cultura e da etnografia nacional, mas também 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 duráveis em Portugal (Almeida, 2009).

#### 2.2.1. Diversidade de enchidos tradicionais

Existe uma enorme variedade de enchidos produzidos em Portugal, dos quais se pode destacar a alheira, o chouriço de carne, o chouriço mouro, o chouriço de sangue, a morcela, a linguiça, a cacholeira, o salpicão, o paio e a farinheira, entre outras (Enchidos Portugueses, 2020). Entretanto, apesar desta diversidade, neste trabalho iremos analisar apenas o chouriço de carne, o paio e a morcela, de duas regiões, nomeadamente do Fundão e Arganil.

#### 2.2.1.1. Chouriço de carne

O chouriço de carne é um enchido curado, de calibre estreito e de formato variável, constituído por carne e gordura de suíno, cortados em fragmentos macroscopicamente visíveis, adicionados de condimentos e aditivos segundo a NP 589 (2006). O chouriço de carne pode ser classificado em chouriço de carne tradicional, chouriço de carne extra (com teor de gordura livre inferior a três vezes o teor em proteína total) e chouriço de carne corrente (com teor de gordura livre inferior ao dobro do teor em proteína total).

#### 2.2.1.2. Paio

O paio é um enchido que tem como ingrediente principal o lombo de porco, é defumado e o seu calibre é por norma elevado. Os seus condimentos, como é o caso de muitos enchidos portugueses, passam pela massa de pimentão, o alho, e o sal (Enchidos Portugueses, 2020).

#### 2.2.1.3. Morcela

A morcela é um enchido, constituído basicamente por gorduras de porco, finamente fragmentadas e sangue, adicionados de condimentos e aditivos. É tratado por escaldão e/ou fumo (NP 593 1990, 2009).

### 2.3. Tecnologia de fabrico dos enchidos

O processo de fabrico dos enchidos é semelhante em todos os lugares o que variando apenas com os fatores culturais e as preferências, mas em Portugal a matéria-prima é sempre a mesma, o que pode alterar são alguns ingredientes que podem ser adicionados mediante a localidade.

O fabrico de enchidos tradicionais conjuga várias operações cujo objetivo último é o aproveitamento tão completo quanto possível da carne, vísceras, gorduras e sangue do porco e a sua conservação para usos diversificados. No que respeita à tecnologia de produção de enchidos, podemos considerar, em geral, seis fases: seleção das matérias-primas, miga, preparação da massa, maturação da massa, enchimento e cura (secagem, fumagem e maturação) (Muguerza et al., 2004).

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 fabrico 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 deste modo uma produção contínua ao longo do ano, em qualquer zona geográfica, independente das condições climáticas (Almeida, 2009).

### 2.3.1. Principais etapas do processo de fabrico dos enchidos

O processo de produção de enchidos compreende vários passos: seleção da matéria-prima, miga, preparação da massa, maturação, enchimento, cura embalagem e rotulagem. Apesar da enorme variedade de enchidos tradicionais portugueses, a sua produção baseia-se em dois pilares fundamentais, a estabilização da matéria-prima e o desenvolvimento das características sensoriais (Mendes, 2013):

#### i. Estabilização da matéria-prima

Nesta fase pretende-se que a carne se transforme num produto estável à temperatura ambiente, sem que se verifique o desenvolvimento de microrganismos que o tornem impróprio para consumo. Isto é conseguido nas chamadas etapas frias de fabrico e que correspondem às primeiras etapas de elaboração dos enchidos: escolha, miga, preparação da massa e condimentação.

#### ii. Desenvolvimento das características sensoriais

O desenvolvimento das características é feito através de reações químicas e enzimáticas em que os lípidos e proteínas dão origem a compostos aromáticos que conferem as qualidades organoléticas características de cada enchido. Estas reações ocorrem na segunda fase de produção que corresponde à maturação ou cura.

##### a. Receção e seleção da matéria-prima

Tradicionalmente, os enchidos são feitos de carne de porco. No entanto, segundo Elias & Laranjo (2015), também se pode usar carne de bovino e carne de aves, entre outras, de acordo com os hábitos e costumes de cada região. A qualidade da matéria-prima vai influenciar as características do produto final. As carnes PSE apresentam geralmente menor aptidão para a transformação porque apresentam diminuição da capacidade de retenção de água devido ao pH da carne ser próximo do ponto isoelétrico das proteínas musculares (Alfaia, 2002). Nestas carnes, a desidratação muito rápida leva a um produto final muito seco, baixo rendimento, mais salgado e baixo poder emulsificante (Alfaia, 2002). As carnes PSE são as que aparecem mais frequentemente na indústria de transformação de carnes. As carnes DFD caracterizam-se por elevada capacidade de retenção de água, textura firme e valores de pH superiores a 6,2 o que conduz a maiores problemas tecnológicos.

A escolha criteriosa da carne e da gordura destinadas ao fabrico de cada enchido é fundamental para que se obtenha um produto final com composição e características organoléticas desejáveis. Quando se utilizam peças demasiado gordas incorre-se em problemas tecnológicos como o baixo poder de retenção de água, a reduzida firmeza, e a difícil ligação das massas. Quando se utilizam peças excessivamente magras pode ocorrer

uma rápida secagem do produto, com quebras de peso exageradas, sendo prejudicadas também a aparência, a textura e a saporidade do enchido.

#### b. Miga

Esta etapa tem por finalidade reduzir a matéria-prima a pequenos fragmentos com dimensões adequadas a cada tipo de enchido. Deste modo, há produtos constituídos por um só fragmento, caso do paio de lombo, fragmentos de dimensões variáveis, como é o caso da maioria dos enchidos, chouriços, linguiças, paios, palaios, entre outros, e ainda os de fragmentos tão diminutos que formam pastas, como é caso de alguns salames (Elias & Laranjo, 2015). O grau de redução de tamanho está diretamente relacionado com a eliminação de água, que será mais lenta nos fragmentos de maior dimensão, e estes, em termos gerais, estarão associados a períodos de cura mais prolongados. A miga deve ser realizada a baixas temperaturas, entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $0^{\circ}\text{C}$ , para que o corte seja preciso e sem que se liberte gordura intramuscular, nas carnes gordas, como é o caso do porco alentejano. Tal situação originaria alterações na cor dos enchidos durante a cura (Elias & Laranjo, 2015).

#### c. Preparação da massa

Depois de miga, a carne é colocada em recipientes apropriados, adicionando-se os outros ingredientes em função da natureza do enchido: água, vinho ou vinagre, arroz, pão, farinha, sangue, salsa, pimentão, alho, cominhos, cravinho, canela, colorau, sal, louro e erva-doce, entre outras. Estas substâncias são de extrema importância, uma vez que conferem características organolépticas desejáveis e apreciadas, contribuindo para a tipicidade dos produtos. Tem sido demonstrado o papel importante destes condimentos na inibição da atividade dos microrganismos de degradação e dos patogênicos. Por outro lado, parecem que favorecer o crescimento de bactérias lácticas promovendo a fermentação láctica (Mendes, 2013). Esta operação exige muita experiência, dado que, por um lado, é necessário que ocorra a mistura completa de todos os ingredientes e, por outro, esta movimentação não pode ser excessiva, para não introduzir muito oxigênio na massa, que iria facilitar as oxidações e dificultar a multiplicação das bactérias lácticas (Almeida, 2009).

Para se obter enchidos de qualidade, a mistura da massa com os condimentos deve ser efetuada de uma forma cuidada, evitando que fiquem demasiado gordos ou demasiado magros (Almeida, 2009). Nos enchidos tradicionais, os aditivos mais utilizados são os conservantes, nitritos e nitratos, que também têm ação positiva na estabilização da cor, alguns antioxidantes e alguns gelificantes, para aumentarem a retenção de água nos produtos tradicionais (Elias & Laranjo 2015).

#### d. Maturação

A maturação é um fenómeno resultante da ação desenvolvida pelo sal, água e microrganismos, favorecendo-se a interação dos diferentes ingredientes. Esta fase do processo é caracterizada, essencialmente, pela entrada de sal na carne em simultâneo com a extração de água e proteínas, e pelo desenvolvimento microbiano, de que resulta a libertação de produtos do seu metabolismo. As proteínas extraídas tornam as superfícies da carne viscosas e desempenham um papel determinante na ligação das massas. Os parâmetros ambientais indicados para que estes fenómenos ocorram de forma adequada são valores de temperatura entre 0°C e 10°C e de humidade relativa entre 90% e 95%. A duração desta etapa, dependendo do calibre dos enchidos e do grau de redução de tamanho a que foram submetidas as carnes, varia nos processos mais industrializados entre as 24 e as 48 horas e nos processos artesanais entre os 2 e os 4 dias (Elias & Laranjo, 2015).

#### e. Enchimento

Esta operação, segundo Almeida (2009), consiste em introduzir a pasta no invólucro que lhe é destinado. A tripa 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 decomposição. A tripa pode ser de origem animal, de celulose ou sintéticos de colagénio, dependendo das características do enchido e das condições tecnológicas.

#### f. Cura

A carne depois de migada, temperada, amassada e maturada, transforma-se mediante o processo de cura numa substância alimentar com características organolépticas, físicas e químicas muito particulares e próprias de cada tipo de enchido. Até há pouco tempo, o resultado dependia, em grande medida, dos microrganismos que se instalavam na massa e das condições climáticas no momento da produção dos enchidos. Atualmente, todos estes processos são controlados com maior rigor (Elias & Laranjo, 2015).

O processo de fumagem é um dos processos mais antigos de conservação de produtos alimentares. A fumagem consiste na exposição dos enchidos à ação do fumo resultante da combustão de determinadas madeiras. No sul e centro de Portugal, o azinho é indiscutivelmente a madeira mais utilizada. Contudo no norte do país, para além do azinho, há também a utilização de outras madeiras, como a faia e a oliveira.

Este processo confere um sabor característico ao produto e contribui para a sua conservação devido aos efeitos bactericidas e bacteriostáticos dos compostos do fumo. O fumo exerce propriedades antioxidantes devido aos compostos fenólicos presentes no

mesmo. No entanto, em determinadas condições, o processo de fumagem pode levar à formação de substâncias cancerígenas com efeitos indesejáveis para a saúde do consumidor, como são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

Os objetivos que se pretendem atingir com a fumagem das carnes transformadas traduzem-se na modificação do aroma, sabor e cor dos produtos fumados, na sua ação antioxidante sobre as gorduras, no efeito conservante resultante da sua ação antimicrobiana, e na sua intervenção sobre a textura dos produtos (Toldrá, 2014). Após a fumagem, os enchidos completam o processo de cura em câmaras à temperatura de 10-15°C, humidade relativa de 75-80% e ao abrigo da luz (Elias & Laranjo, 2015).

Nos enchidos com curas prolongadas há a possibilidade da microbiota característica destes produtos poder formar aminas biogénicas (por exemplo, triptamina, -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina), principalmente por descarboxilação bacteriana dos aminoácidos livres precursores (Toldrá, 2014). No entanto, e segundo a literatura, as concentrações de aminas biogénicas em enchidos variam desde níveis não detetáveis a baixas concentrações. Isto indica que é possível produzir produtos cárneos curados praticamente isentos de aminas biogénicas, pelo que um dos atuais desafios da indústria alimentar é a produção de enchidos com baixos teores em aminas biogénicas recorrendo a variadas alternativas (Elias & Laranjo, 2015).

Durante o processo de fabrico de enchidos, a desidratação das massas conduz a perda de peso que, dependendo do tipo de produto e da tecnologia adotada, pode variar entre 15% a 50% no final da cura. Para além disso, ocorre também a redução de nitratos a nitritos e estes, por sua vez, são convertidos no pigmento nitrosomioglobina, responsável pela cor estável dos enchidos curados.

#### g. Embalamento

A grande maioria dos produtos alimentares, até chegarem aos consumidores finais, independentemente do tipo de processamento que sofrem, passam por etapas de armazenamento e distribuição, nas quais as embalagens desempenham um importante papel na manutenção da qualidade do produto, contribuindo para o aumento da sua vida útil (Coma, 2008).

#### h. Rotulagem

De acordo com o Regulamento (UE) No 1169/2011, a rotulagem é constituída por todas as indicações, menções, marcas de fabrico ou comerciais, imagens ou símbolos referentes a um género alimentício que figurem em qualquer embalagem, documento, aviso, rótulo, anel ou gargantilha que acompanhem ou se refiram a esse género alimentício. Segundo o mesmo regulamento, as informações mais importantes que um rótulo deve conter, são: denominação

do género alimentício, a lista de ingredientes; os ingredientes ou auxiliares tecnológicos que provoquem alergias ou intolerâncias; a quantidade de determinados ingredientes ou categorias de ingredientes; a data de durabilidade mínima ou a data-limite de consumo; as condições especiais de conservação e/ou as condições de utilização; o nome ou a firma e o endereço do operador da empresa do setor alimentar responsável pela informação; o país de origem ou local de proveniência; o modo de emprego, quando a sua omissão dificultar uma utilização adequado do género alimentício; e uma declaração nutricional. Estas informações não podem induzir o consumidor em erro, não podem ser ambíguas nem confusas para o consumidor; se adequado, devem basear-se em dados científicos relevantes (Regulamento (UE) No 1169/2011).

#### 2.4. Impacto da microbiota na qualidade dos produtos cárneos

##### 2.4.1. Bactérias de interesse tecnológico

As bactérias ácido lácticas (BAL) são bactérias não esporuladas, em forma de cocos, cocobacilos ou bacilos, e geralmente imóveis, que produzem ácido láctico como principal produto final de fermentação (Almeida, 2009; Felipe, 2008). As BAL são caracterizadas como Gram-positivas, catálase negativas, anaeróbias facultativas, mas toleram pequenas quantidades de oxigénio, designando-se por microaerófilas. As BAL incluem espécies dos géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Outros géneros incluídos são *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Oenococcus* e *Tetragenococcus* (Almeida, 2009). Existem subgrupos com estirpes heterofermentativas que produzem, para além de ácido láctico, grandes quantidades de CO<sub>2</sub> e ácido acético ou etanol. Segundo Beasley (2004) estes últimos compostos orgânicos são responsáveis pelo aroma e sabor característicos dos produtos fermentados. Também podem ser homofermentativas, em que o produto final é quase exclusivamente ácido láctico. Estas bactérias podem ser utilizadas como starter em produtos cárneos sendo consideradas culturas protetoras, porque produzem peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) que inibem o crescimento de microrganismos patogénicos, como a *Listeria monocytogenes*, e também de microrganismos deteriorantes, melhorando a qualidade e segurança dos produtos. Durante a fermentação dos chouriços, as bactérias lácticas absorvem oxigénio, diminuindo o potencial redox e transformando o nitrito para prevenir o crescimento de bactérias patogénicas e de deterioração (Laranjo et al., 2017; Metaxopoulos et al., 2002).

O género *Staphylococcus* pertence à família Micrococaceae, em conjunto com os géneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Foram descritos pela primeira vez em matérias purulentas de abcessos cirúrgicos, em 1880, pelo médico escocês Alexander Ogston, que assim o designou pelo formato em cachos de uva (staphylo, em grego). Os estafilococos são microrganismos com células esféricas, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 µm,

Gram-positivos, não esporulados e imóveis, anaeróbios facultativos (com exceção do *S. saccharolyticus* que é anaeróbio), catalase positivos e oxidase negativos, que ocorrem na natureza na forma simples ou aos pares e em grupos irregulares. Para além de habitarem a pele e as mucosas de vertebrados de sangue quente, estão presentes em produtos alimentares, pó e água (Carvalho, 2010).

#### 2.4.2. Bactérias indicadoras de higiene

Os membros da família Enterobacteriaceae, são bactérias ubíquos, ou seja, podem ser encontrados no solo, em vegetais e em animais. As espécies provenientes da microbiota humana muitas vezes são patogénicas causando infeções intestinais (diarreia) e infeções extraintestinais, são exemplos a *Salmonella* entérica serotipo Typhi, *Shigella* e *Escherichia coli*. Conceição (2020) defende que a transmissão de infeção intestinal é, normalmente, fecal-oral podendo acontecer através de contato direto com animais, com o ambiente ou de pessoa para pessoa. A família Enterobacteriaceae é constituída por bactérias Gram-negativas, bacilos não esporulados, oxidase negativa, catalase positiva, móveis com o auxílio de flagelos (à exceção da *Klebsiella granulomatis*), reduzem nitratos a nitritos, fermentadoras de glucose e a temperatura ótima de crescimento é 37 °C, podendo crescer em atmosfera aeróbica e anaeróbica.

As bactérias da família Enterobacteriaceae são indicadoras de higiene e são rapidamente inativadas pelos desinfetantes usuais. A presença ou ausência de elevadas contagens destas bactérias não permite confirmar a presença ou ausência de microrganismos patogénicos entéricos. As contagens elevadas de Enterobacteriaceae nos alimentos indicam processamento pouco higiénico, contaminação numa fase posterior ou ambas as situações (Castro, 2008).

Há ainda a realçar o papel das bactérias Gram-negativas como principais responsáveis pela decomposição das carnes. De entre estas são de salientar os géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* e *Achromobacter* (Calixto, 2009).

O género *Enterococcus* foi proposto por Thiercelin e Jouhaud, em 1903, como diplococcus Gram-positivos de origem intestinal (Santos, 2011). Os enterococos são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos com formato ovoide que podem organizar-se em cadeias curtas, aos pares ou simples. Este grupo de microrganismos apresenta uma taxonomia controversa que evoluiu muito ao longo das décadas. Até à década de 80, encontravam-se incluídos no grupo D do género *Streptococcus* da classificação de Lancefield devido às suas características antigénicas (Gouveia, 2013).

Como os *Streptococcus*, não apresentam enzima citocromo oxidase sendo, assim, catalase negativos, apesar de algumas estirpes produzirem uma reação de catalase fraca

(Santos, 2011). A presença/expressão de fatores de virulência bem como a resistência intrínseca ou adquirida a vários antibióticos e a capacidade de produzir biofilmes atribuem certa patogenicidade aos *Enterococcus* (Santos, 2011). Este género pertence à microbiota intestinal humana e animal sendo a espécie *Enterococcus faecalis* predominante seguida de *E. faecium* (Gouveia, 2013). O grupo *Enterococci* tem um papel importante na produção de alimentos, uma vez que são resistentes e apresentam características fenotípicas benéficas para as características organolépticas finais do produto. Dentro das espécies mais encontradas incluem-se *E. faecium* e *E. faecalis*, sendo esta última a mais frequentes em alimentos e fezes de animais. *E. faecium* seguida de *E. faecalis* e *E. cecorum*, são as espécies mais frequente em bovinos, suínos e aves domésticas enquanto *E. galinarum* e *E. durans/hirae* ou *E. avium* são menos frequentes (Santos, 2011).

## 2.5. Fatores físico-químicos com influência na qualidade da carne e produtos cárneos

### 2.5.1. Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH exerce uma função importante na estabilidade dos produtos alimentares. O pH da carne desempenha um papel importante no processo da maturação da mesma. O pH é um importante fator físico-químico que condiciona as reações enzimáticas, a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos nos alimentos, constituindo uma potencial barreira que interessa conhecer e controlar ao longo de todo o processo produtivo, a fim de garantir uma maior segurança e conservação dos géneros alimentícios até ao seu consumo final (Hierro et al., 2014).

Segundo Almeida (2009), os valores de pH da carne de porco crua variam entre 5,6-6,0 devido à diminuição do pH após a morte dos animais como consequência dos fenómenos proteolíticos endógenos. Durante o processo de fabrico dos enchidos este valor pode baixar para 4,5. De acordo com Silva (2003), o pH dos enchidos é superior a 4,5. 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 por redução do pH, através da adição de ácidos fracos ou através da fermentação láctica, por ação das bactérias lácticas (Almeida, 2009).

### 2.5.2. Atividade da água ( $a_w$ )

A água tem um papel importante na proliferação bacteriana porque facilita o transporte de pequenas moléculas através da membrana citoplasmática externa da célula bacteriana através de gradientes de pressão osmótica (Coles & Kirwan, 2011). A atividade da água ( $a_w$ ) é um parâmetro que exprime a água disponível para reações químicas e para o desenvolvimento microbiano nos alimentos. De facto, este parâmetro é de grande interesse

para a indústria alimentar, porque é um indicador da estabilidade microbiológica dos alimentos (Alonzo, 2008; Maneffa et al., 2017).

A atividade da água para além de ser um indicador da estabilidade microbiológica dos alimentos, também desempenha um papel importante nas propriedades sensoriais dos alimentos como o aroma, sabor e textura e também influencia os mecanismos químicos e bioquímicos nos alimentos como a oxidação lipídica, a perda de nutrientes e alteração da atividade enzimática (Maneffa et al., 2017). Os valores da  $a_w$  variam entre  $>0$  e  $1$  e, quanto mais baixo for o valor de  $a_w$  de um alimento, maior será a sua estabilidade. A ação inibitória da  $a_w$  é potenciada por determinados fatores como o pH, o potencial redox, a temperatura e a presença de certas substâncias. A presença de substâncias como o sal e açúcares (substâncias osmoticamente ativas), baixam a  $a_w$  dos alimentos (Dias, 2018). Segundo os mesmos autores, a importância atribuída ao parâmetro da  $a_w$  levou à classificação dos alimentos em três categorias:

- alimentos de humidade elevada –  $0,90 < a_w < 1,00$
- alimentos de humidade intermédia –  $0,60 < a_w < 0,90$
- alimentos de humidade reduzida –  $a_w < 0,60$

### 2.5.3. Temperatura

A temperatura é um fator extrínseco que influencia não só a qualidade, mas também a segurança dos géneros alimentícios, e neste caso, dos enchidos. A temperatura tem um papel fundamental na velocidade das reações enzimáticas e no desenvolvimento microbiano. Durante o processo tecnológico de fabrico dos enchidos, nas fases com temperaturas mais elevadas os fenómenos químicos e bioquímicos atingem a sua intensidade mais elevada, refletindo-se nas fases seguintes do processo de produção.

### 2.5.4. Cor

A cor dos alimentos pode ser avaliada objetivamente através da medição dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  do sistema de cor CIELab (Commission Internationale d'Éclairage), na superfície das amostras com um colorímetro Chroma Meter CR-300 (Minolta, Japão), utilizando como padrão de calibração a cor branca. O parâmetro  $L^*$  exprime a luminosidade, a coordenada de cromaticidade  $a^*$  que está associada à cor vermelha quando positiva e à verde quando negativa; a coordenada de cromaticidade  $b^*$  exprime o amarelo quando positiva e a azul se negativa.

### 2.5.5. Aminas biogénicas

As aminas biogénicas (ABs) são bases orgânicas de baixo peso molecular que se formam a partir da descarboxilação dos aminoácidos livres durante o metabolismo normal de animais, plantas e microrganismos (Dias, 2019). A reação de descarboxilação conduz à perda do grupo carboxilo dos aminoácidos precursores e libertação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) com formação da respetiva amina. A sua formação nos géneros alimentícios ocorre a partir de reação enzimática por ação de enzimas descarboxilases endógenas presentes nas matérias-primas e do crescimento de microrganismos descarboxilase positivos, tais como *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae*, e de condições favoráveis à sua multiplicação (Erdag et al., 2019).

#### 2.5.5.1. Estrutura e classificação das aminas biogénicas

As ABs mais usuais nos géneros alimentícios podem classificar-se em monoaminas aromáticas (ex: tiramina e  $\alpha$ -feniletilamina), aminas aromáticas heterocíclicas (ex: histamina e triptamina), diaminas alifáticas (ex: putrescina e cadaverina) e poliaminas alifáticas (ex: espermidina, espermina e agmatina), segundo a sua estrutura química (Latorre-Moratalla et al., 2012). A Figura 1 apresenta a classificação e estrutura química de aminas biogénicas.

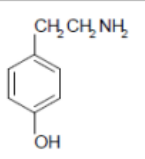
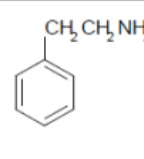
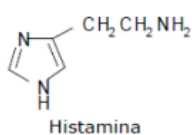
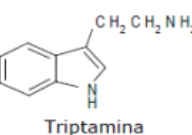
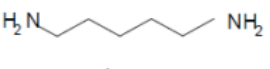
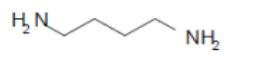
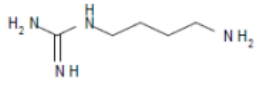
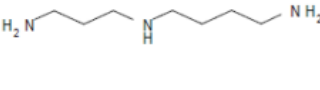
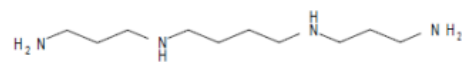
<b>Monoaminas aromáticas</b>	 Tiramina	 2-Feniletilamina
<b>Aminas heterocíclicas</b>	 Histamina	 Triptamina
<b>Diaminas alifáticas</b>	 Cadaverina	 Putrescina
<b>Poliaminas alifáticas</b>	 Agmatina	 Espermidina
	 Espermina	

Figura 1: Classificação e estrutura química de aminas biogénicas (adaptado de Önal, 2007).

#### 2.5.5.2. Aminas biogénicas nos géneros alimentícios

As ABs podem ser encontradas em vários produtos alimentares, tais como peixe, mariscos, cervejas, vinho tinto, carne, leite, produtos fermentados, produtos curados, frutas e

vegetais (Nam et al., 2007). Os enchidos e também os queijos são os que apresentam maior quantidade de aminas biogénicas (Latorre-Moratalla et al., 2012). Nos produtos cárneos fermentados, a presença de ABs está geralmente ligada à produção por microrganismos utilizados no processo de fermentação.

A formação das ABs é influenciada por vários fatores, como a temperatura, pH, concentração de sal, diâmetro dos produtos cárneos, potencial redox, temperatura de armazenamento, aditivos, entre outros, que também influenciam o desenvolvimento microbiano e a atividade enzimática. Quanto à temperatura, a maioria das ABs são estáveis ao calor pois algumas descarboxilases continuam ativas mesmo após o processamento térmico. Quanto ao pH, o valor ótimo para a atividade das descarboxilases situa-se entre 2,5 e 6,5. Concentrações elevadas de sal inibem o crescimento da maior parte dos microrganismos e os hidratos de carbono afetam a atividade descarboxilativa das bactérias (Halász et al., 1994). Outro fator que afeta o teor de ABs é o diâmetro dos produtos cárneos, verificando-se uma menor concentração de sal e atividade da água superior em produtos com maior diâmetro e logo maior quantidade de aminas biogénicas, em particular de tiramina e putrescina (Suzzi & Gardini, 2003).

No que respeita à segurança dos alimentos, os produtos alimentares devem ser produzidos, transportados e armazenados sob boas condições higiénicas para evitar a proliferação de microrganismos e produção de elevados teores de ABs, como a tiramina e a histamina, que podem originar efeitos adversos nos consumidores (Claro, 2009).

#### 2.5.5.2.1. Aminas biogénicas nos produtos cárneos

Em geral, as carnes e produtos cárneos têm revelado a presença de grandes quantidades de ABs quando submetidos a condições que permitam a atividade bacteriana, como por exemplo, a maturação/fermentação e o armazenamento inadequado (Vidal-Carou et al., 2009). Neste tipo de produtos, o estudo do teor de ABs é importante uma vez que pode ser usado como indicador da perda de frescura e da qualidade higiénica das matérias-primas usadas (Vidal-Carou et al., 2009). Por outro lado, os tratamentos térmicos aplicados pela indústria da carne aos produtos cárneos inativam os microrganismos, mas não reduzem o teor de ABs uma vez que são termorresistentes. De acordo com Claro (2009), a acumulação de ABs nos produtos cárneos pode indicar práticas de higiene deficientes e baixa qualidade higiénica das matérias-primas ou contaminação devido a más condições durante o processamento e armazenamento dos alimentos (Önal, 2007). A qualidade higiénica e frescura de determinados alimentos pode ser determinada pelo índice de aminas biogénicas (IAB), que corresponde ao somatório das quantidades de histamina, putrescina e cadaverina a dividir por 1 mais a soma das quantidades da espermina e espermidina (Vidal-Carou et al.,

2014). Valores de IAB maiores que 1 indicam baixa qualidade do produto e valores menores que 1 indicam uma boa qualidade do produto. O aumento do índice IAB está correlacionado com a deterioração do produto e com a microbiota presente no mesmo (Ahmad et al., 2020).

#### 2.5.5.3. Efeitos das aminas biogénicas na saúde humana

Para além dos efeitos fisiológicos ao nível do sistema imunológico, intestinos e das funções metabólicas (Erdag et al., 2019), a presença das ABs nos alimentos também pode levar a problemas de saúde (Karovicova & Kohajdova, 2005). Assim, a tiramina e a  $\alpha$ -feniletilamina pelas suas propriedades vasoativas podem conduzir ao aumento da pressão arterial, causar cefaleias, suores, vómitos, entre outros efeitos (Latorre-Moratalla et al., 2012). A histamina pode também provocar vasodilatação com consequente hipotensão, problemas gastrointestinais e neurológicos (Latorre-Moratalla et al., 2012). De todas as ABs, a histamina e a tiramina, são consideradas as aminas mais tóxicas e relevantes do ponto de vista da segurança dos alimentos (EFSA, 2011). No entanto, se presentes nos alimentos em quantidades vestigiais, não são consideradas um risco para a saúde dos consumidores porque são destoxificadas por ação das enzimas aminooxidases ou por conjugação (Alfaia, 2002).

#### 2.5.5.4. Métodos analíticos de deteção e quantificação de aminas biogénicas em carnes e produtos cárneos

A análise de ABs nos géneros alimentícios é importante devido às preocupações relacionadas com a qualidade e segurança dos alimentos e ao seu impacto na saúde humana (Ahmad et al., 2020; Önal, 2007). Existem várias metodologias analíticas para a deteção e quantificação de ABs nos géneros alimentícios, como a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), a cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar (CE), e ainda técnicas eletroquímicas, colorimétricas e fluorométricas (Liu et al., 2023).

A cromatografia líquida de alta eficiência ou alta pressão (HPLC) é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação de ABs em carne e produtos cárneos, mas requer etapas de pré-derivatização antes da sua separação, deteção e quantificação (Mayer et al., 2010). Após a extração dos produtos cárneos, as ABs por reação com o reagente de derivatização, como o cloreto de dansilo, formam derivados fluorescentes que podem ser analisados usando detetores de UV-Visível e de fluorescência.

### 3. Objetivos (geral e específico)

O objetivo deste estudo consistiu na caracterização microbiológica e físicoquímica de enchidos tradicionais (chouriço de carne, paio e morcela) da Beira Baixa e da Beira Litoral. Procedeu-se à avaliação da microbiota presente nos enchidos do Fundão (Beira Baixa) e de Arganil (Beira Litoral), fazendo a contagem das bactérias de interesse tecnológico (bactérias

ácido lácticas e *Staphylococcus coagulase* negativos) e de bactérias indicadoras de higiene (*Enterobacteriaceae* e *Enterococcus spp.*). Além da análise microbiológica, avaliaram-se as características físico-químicas dos enchidos, através da determinação do pH, atividade de água ( $a_w$ ), cor e o teor de aminas biogénicas.

#### 4. Materiais e Métodos

##### 4.1. Seleção e caracterização das amostras

Foram adquiridos três tipos de enchidos tradicionais (Figura 2). numa superfície de Lisboa (chouriço, paio e morcela) (n=2) provenientes de duas regiões de Portugal, Beira Baixa (Fundão) e Beira Litoral (Arganil), de 2 lotes diferentes.

Os ingredientes utilizados nos enchidos do Fundão foram no chouriço, carne de suíno, gordura de suíno, vinho tinto (sulfitos), sal, especiarias, alho, emulsionante (E451, tripolifosfato), dextrose, antioxidante (E300, ácido ascórbico) e conservante (E250, nitrito de sódio); na morcela são carne de suíno, gordura, sangue, coração, fécula de batata, sal, especiarias, emulsionante (E451, tripolifosfato), dextrose, antioxidante (E300, ácido ascórbico) e conservante (E250, nitrito de sódio); no paio, carne de suíno, vinho tinto (sulfitos), sal, especiarias, alho, emulsionante (E451, tripolifosfato), dextrose, antioxidante (E300, ácido ascórbico) e conservantes (E250, nitrito de sódio).

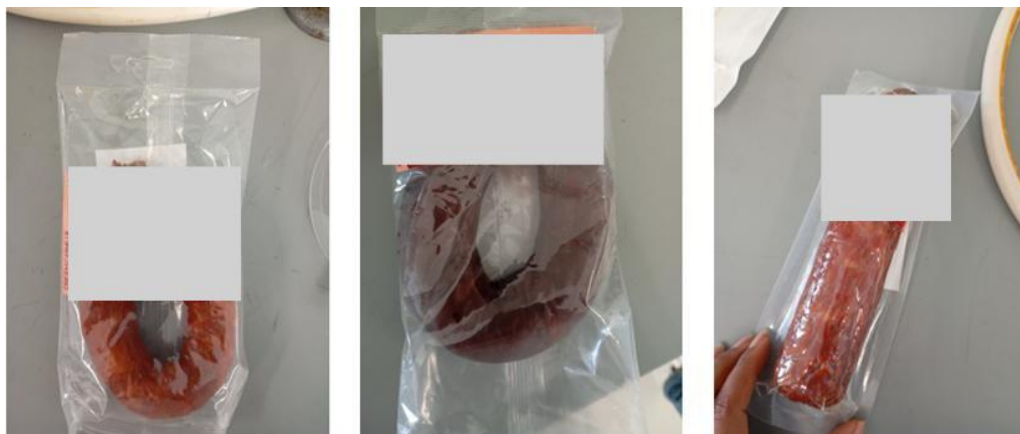


Figura 2: Amostras dos enchidos usados para análise. a) chouriço; b) morcela; c) paio.

Os ingredientes utilizados no fabrico dos enchidos de Arganil não diferem muito dos usados no Fundão. O chouriço de Arganil, é feito a partir de carne de suíno (91%), com a envolvimento de alguns ingredientes tais como: vinho (contem sulfitos), sal, alho, açúcar (dextrose), estabilizadores (E451i, E450i), extrato de especiarias em sal, antioxidante (E316), conservante (E250, nitrito de sódio), especiarias e óleo de pimentão. É utilizado tripa natural de bovino. Na produção da morcela de Arganil foram usados os seguintes ingredientes: gordura e sangue (12%) de suíno, farinha de trigo (glúten), farinha de milho, sal, cebola,

especiarias e conservantes (E250, nitrito de sódio). É utilizado tripa natural de (bovino). O paio é feito de lombo de suíno (94%), vinho (sulfitos) sal, alho, açúcares (dextrose), estabilizadores (E451i e E450i), extrato de especiarias em sal, antioxidante (E316), conservante (E250, nitrito de sódio) e especiarias. Enchido em tripa não comestível.

#### 4.2. Análise microbiológica

A análise microbiológica consistiu na contagem de alguns microrganismos indicadores tecnológicos e de higiene. Os microrganismos analisados foram *Enterobacteriaceae*, Bactérias do ácido láctico (BAL), *Staphylococcus coagulase* negativos e *Enterococcus*. Para esta análise procedeu-se à preparação dos meios de cultura VRBD, MRS, Slanetz e MSA para a contagem de *Enterobacteriaceae*, BAL, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, respetivamente. O material usado foi material de uso comum no laboratório de microbiologia, nomeadamente pinças, bisturi, placas de Petri, tubos, pipetas, bico de Busen, balança, sacos Stomacher, vortex, Stomacher, estufa, entre outros. Todos os utensílios utilizados já se encontravam esterilizados de forma a evitar qualquer forma de contaminação e as análises eram realizadas em condições assépticas com o bico de Busen aceso, desde o início até ao fim da análise. A bancada era desinfetada com álcool a 70% antes e no fim de cada uso.

##### 4.2.1. Meios de cultura e sua preparação

Os meios de cultura usados durante a análise foram VRBD (Violet Red Bile Dextrose), MRS (Man Rogosa Sharpe Agar), Slanetz (Slanetz and Bartley Agar Base) e em ágar-sal de Manitol (MSA, Mannitol Salt Agar, Scharlau, Espanha) para a análise de *Enterobacteriaceae*, BAL, *Enterococcus* e *Staphylococcus coagulase* negativos, respetivamente. Os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, colocados em recipientes de 500 mL e esterilizados em autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Depois de arrefecidos à temperatura ambiente foram mantidos em refrigeração a 4 °C. Sendo meios sólidos à temperatura ambiente, antes de utilizados nas análises eram fundidos em banho de água a 100 °C e arrefecidos a  $\pm 50$  °C.

#### 4.2.2. Sementeira e contagem de colónias

A implementação dos métodos analíticos para controlo microbiológico teve por base os requisitos da International Organization for Standardisation (ISO). A preparação das amostras foi realizada de acordo com a norma ISO 6887-1:2017. Pesaram-se, em balança analítica, 10 g de cada enchido para saco de Stomacher e adicionaram-se 90 mL de soluto isotónico diluidor - triptona sal - (Figura 3). Homogeneizou-se no Stomacher de forma a obter a suspensão inicial (diluição 10<sup>-1</sup>). Procedeu-se em seguida à preparação das diluições decimais seriadas, retirando 1 mL da diluição 10<sup>-1</sup> para tubo de ensaio ao qual foi previamente adicionado 9 mL do soluto triptona sal. Homogeneizou-se no vortex para obter a diluição 10<sup>-2</sup> e assim sucessivamente até à diluição pretendida.

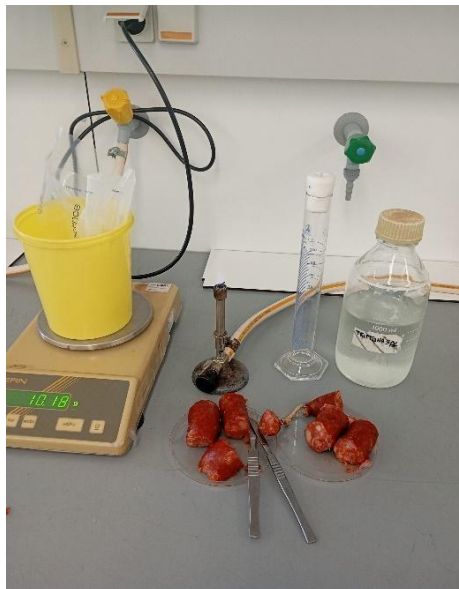


Figura 3: Preparação da amostra para sementeira de microrganismos

##### 4.2.2.1. Contagem de *Enterobacteriaceae*

Para a contagem das bactérias da família *Enterobacteriaceae*, semeou-se por incorporação 1 mL do inóculo das diluições 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup> nas placas de Petri. Em seguida, o meio de cultura VRBD agar (Violet Red Bile Dextrose, Scharlau, Espanha) previamente fundido e arrefecido foi adicionado e após estar solidificado, as placas foram incubadas na estufa a 37 °C durante 48 a 72 horas. As colónias características presentes (cor rosa a vermelho, com ou sem halo de precipitação de sais biliares, ou incolores e mucosas) foram contadas de acordo com a ISO 21528-2:2004. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de amostra (ufc/g).

##### 4.2.2.2. Contagem de bactérias do ácido láctico

Procedeu-se à sementeira de 1 mL de inóculo das diluições 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> nas placas de Petri e adicionou-se por incorporação o meio MRS agar (Scharlau, Espanha)

suplementado com 1% de trifeniltetrazol e 5% de acetato de tálio por cada 100 mL do meio. A incubação realizou-se na estufa em anaerobiose a 30 °C por 72 h (ISO 15214:1998). A contagem foi realizada considerando apenas colónias com coloração rosa e rosa lilás, com os resultados expressos em ufc/g.

#### 4.2.2.3. Contagem de *Staphylococcus* coagulase negativos

A sementeira dos estafilococos coagulase negativos foi realizada a partir de diluições seriadas semeando-se por incorporação 1 mL do inóculo das diluições 10-2, 10-3 e 10-4 nas placas de Petri com o meio Manitol salt agar (MAS, Scharlau, Espanha) juntamente com 5 mL de gema de ovo (Oxoid, Inglaterra) por cada 100 mL do meio. A contagem das colónias características de cor rosa a vermelho foi realizada após incubação a 30 °C por 24h a 48 h em aerobiose e os resultados expressos em ufc/g.

#### 4.2.2.4. Contagem de *Enterococcus* spp.

A sementeira por incorporação dos enterococos foi realizada a partir de 1 mL de inóculo das diluições 10-1, 10-2 e 10-3 nas placas de Petri adicionando-se o meio Slanetz, Slanetz Agar (Scharlau, Spain) suplementado com 0,5 mL de trifeniltetrazol por cada 50 mL do meio. Após homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas a 37 °C durante 48 a 72 horas. Em seguida procedeu-se à contagem das colónias e os resultados foram expressos em ufc/g.

### 4.3. Análises físico-químicas

A análise físico-química dos enchidos em estudo foi realizada por medição do pH, aw, parâmetros da cor e determinação do teor de aminas biogénicas. Para esta análise foram utilizados alguns utensílios e equipamentos comuns do laboratório de Química Alimentar, tais como pinças, tábuas, picadora Moulinex, higrómetro, potenciómetro, colorímetro, Ultra-turax T25 e cromatógrafo líquido de alta resolução. Para as análises, os enchidos foram usados em fatias e homogeneizados. No processo de homogeneização foi utilizada uma picadora Moulinex, garantindo a uniformidade da amostra.

#### 4.3.1. Determinação do pH

A leitura de pH, foi feita nas amostras já homogeneizadas, utilizando o potenciómetro HI-99163 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA), que foi previamente calibrado, utilizando soluções tampão padrão de pH conhecido, pH=4,00 (Scharlau, Espanha) e pH=7,00 (Scharlau, Espanha) de acordo com a ISO 2917:1999. Para cada amostra foram realizadas 3 medições utilizando uma sonda de pH de carnes (Figura 4). O eléctrodo foi lavado com água destilada entre leituras e após a medição era guardado numa solução de armazenamento de KCl 0,1 M.



Figura 4: Potenciômetro HANNA utilizado para medir o potencial hidrogeniônico (pH).

#### 4.3.2. Determinação do $a_w$

Para determinar a atividade da água ( $a_w$ ) foi utilizado o higroscópio da Rotronic HygroPalm (Nova Iorque, EUA), estabilizado a uma temperatura de 23 °C (Figura 5). Foi efetuada a calibração prévia do aparelho com uma ampola de calibração 0,5% de Humidade relativa (HR) e depois com uma ampola a 80% HR; posteriormente procedeu-se à confirmação da leitura com uma ampola a 50% de HR. Colocou-se parte da amostra homogeneizada num copo de poliestireno e seguidamente introduziu-se na câmara de análise do aparelho para se proceder a leitura da  $a_w$  registando-se o valor encontrado.



Figura 5: Higroscópio Rotronic HygroPalm utilizado para medir a atividade da água ( $a_w$ ).

#### 4.3.3. Determinação da cor

Para a avaliação da cor foi utilizado o sistema de cor CIELAB para determinar os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  usando um colorímetro CR-400 (Minolta, Japan) (Figura 6). Antes das análises o aparelho era devidamente calibrado usando uma placa de calibração com os

seguintes valores na escala de  $L^*$ -94,30;  $a^*$ -0,07;  $b^*$ -2,98. Para cada amostra foram realizadas seis determinações, sendo três em fatias e três na amostra já homogeneizada.



Figura 6: Colorímetro CR-400 (Minolta, Japão) utilizado para medir a cor dos enchidos.

#### 4.3.4. Determinação das aminas biogénicas

A determinação das ABs consistiu na extração, desproteinização, derivatização e análise por HPLC. Pesaram-se 2 g da amostra, em duplicado, em balança analítica de precisão e adicionaram-se 100  $\mu$ L de padrão interno (1,7 diaminoheptano) a 1 mg/mL. Seguidamente, extraiu-se com 10 mL de ácido perclórico 0,4 M homogeneizando a amostra no Ultra-turrax T25 a 18000 rpm, sob gelo fundente. Em seguida procedeu-se a uma centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos a 20 °C e por fim o sobrenadante foi filtrado com filtro de Whatman nº1. A 1 mL dos extratos preparados adicionou-se 500  $\mu$ L de solução saturada de carbonato de sódio, 1 mL do reagente de derivatização (cloreto de dansilo) e incubou-se à temperatura ambiente no escuro durante 60 min. No fim da reação de derivatização, adicionaram-se 250  $\mu$ L de amónia a 25% para remover o excesso do reagente de derivatização e incubou-se novamente à temperatura ambiente no escuro durante 30 min. Seguidamente, extraiu-se com 1 mL de éter dietílico e agitou-se os extratos no vórtex durante aproximadamente 1 minuto. Procedeu-se à centrifugação a 2500 rpm durante 5 minutos. Aspirou-se a fase orgânica, para um novo tubo e repetiu-se este processo 2 vezes. A fase orgânica foi evaporada em corrente de azoto e ao resíduo seco adicionou-se 1 mL de acetonitrilo. Os extratos foram filtrados com filtros de membrana 0,45  $\mu$ m com o auxílio de uma seringa e o volume de 10  $\mu$ L foi injetado no cromatógrafo líquido (Figura 7). A determinação dos derivados dansilados das ABs foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RPHPLC), no cromatógrafo DIONEX Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipado com detetor UV-vis photodiode array (DAD a 254 nm), e forno termostaticável a uma temperatura controlada de 40 °C. Na separação foi usado um gradiente de eluição, constituído por dois solventes (A e B): Água Milli Q (solvente A) e acetonitrilo Lichrosolv (solvente B). O fluxo de injeção foi de 0,8 mL/min e o tempo de análise foi de 20 minutos. A quantificação das ABs foi efetuada por integração automática das respetivas áreas,

através do método de adição do padrão interno. As concentrações das aminas estudadas foram calculadas a partir de curvas de calibração das soluções da mistura padrão das aminas preparadas a diferentes concentrações dos seus sais (0,05-20  $\mu$ g/mL), utilizando a razão das áreas dos picos cromatográficos das aminas e do padrão interno. O teor de ABs é expresso em mg de cada amina livre/kg da amostra.



Figura 7: Cromatógrafo líquido de alta pressão utilizado para a determinação das aminas biogénicas.

#### 4.4. Análise estatística

Os dados dos parâmetros analíticos foram submetidos a uma análise descritiva das amostras, sendo calculadas as médias e desvio padrão utilizando o Excel. Em seguida procedeu-se a uma análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento Generalized Linear Model (GLM) do programa SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Para avaliar o efeito da região de produção dos enchidos foi realizado um teste de comparações múltiplas significativas utilizando a opção PDIFF, que foi ajustado pelo método de Tukey-Kramer. As diferenças entre as médias foram significativas quando  $P < 0,05$ , isto é, com um nível de confiança de 95%.

### 5. Resultados e Discussão

Apresentam-se os resultados obtidos nas diversas análises microbiológicas e físico-químicas efetuadas neste estudo.

#### 5.1. Parâmetros microbiológicos

A segurança microbiológica dos enchidos é um fator essencial para garantir a sua qualidade e aptidão para consumo. A presença de microrganismos pode influenciar tanto as propriedades organolépticas tanto quanto a estabilidade dos enchidos. Este estudo avaliou a microbiota presente em chouriço, paio e a morcela de duas regiões distintas de Portugal, com

foco nas *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido lácticas (BAL) *Staphylococcus* coagulase negativos e *Enterococcus spp.* O número e tipo de microrganismos presentes num alimento permitem avaliar a qualidade higio-sanitária dos alimentos (Doyle & Beuchat, 2007). A qualidade dos enchidos pode ser comprometida sempre que microrganismos se desenvolvem e alteram as suas características sensoriais afetando negativamente a qualidade deste tipo de produtos. O seu controlo nos alimentos é de extrema importância, tendo em vista a garantia da saúde dos consumidores (Doyle & Beuchat, 2007). A tabela 1 apresenta os resultados das contagens de *Enterobacteriaceae*, bactérias do ácido láctico, *Staphylococcus* coagulase negativos e de *Enterococcus spp.* nos enchidos da Beira Baixa (Fundão) e da Beira Litoral (Arganil).

Tabela 1. Valores médios das contagens de microrganismos nos enchidos do Fundão e de Arganil.

Contagens (ufc/g)	Fundão			Arganil		
	Chouriço	Paio	Morcela	Chouriço	Paio	Morcela
<i>Enterobacteriaceae</i>	<10*	<10	<10	1,10.10 <sup>2</sup>	<10	1,90.10 <sup>2</sup>
Bactérias ácido láctico (BAL)	3,81.10 <sup>4</sup>	1,77.10 <sup>5</sup>	<10	1,30.10 <sup>2</sup>	1,29.10 <sup>4</sup>	4,50.10 <sup>3</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa	<10	3,54.10 <sup>3</sup>	1,80.10 <sup>3</sup>	<10	<10	3,34.10 <sup>4</sup>
<i>Enterococcus spp.</i>	2,84.10 <sup>4</sup>	6,05.10 <sup>5</sup>	<10	1,10.10 <sup>3</sup>	<10	2,44.10 <sup>5</sup>

\*limite de quantificação (LOQ)

As *Enterobacteriaceae*, são bactérias indicadoras de higiene no processo de fabrico de géneros alimentícios e podem sinalizar contaminação microbiana. Na maioria das análises efetuadas aos enchidos, foram inferiores ao limite de deteção (LOD, <10 ufc/g), exceto no chouriço de Arganil com 1,1.10<sup>2</sup> ufc/g (2,0 log ufc/g) e na morcela de Arganil com 1,9.10<sup>2</sup> ufc/g (2,3 log ufc/g). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Mendes (2013) em enchidos portugueses, em que os valores de *Enterobacteriaceae* variaram entre 0 e 4,7 log ufc/g, o que é semelhante aos meus resultados.

As BAL desempenham um papel fundamental na fermentação e maturação dos enchidos, sendo responsáveis pela estabilização microbiológica e características sensoriais. Neste estudo, o paio do Fundão apresenta maior contagem, 1,8.10<sup>5</sup> ufc/g (5,3 log ufc/g), indicando uma possível predominância destas bactérias durante a fermentação/maturação. Os valores são comparáveis a estudos anteriores, onde contagens de BAL entre 10<sup>4</sup> e 10<sup>7</sup> ufc/g foram consideráveis aceitáveis para produtos fermentados.

Os *Staphylococcus* podem estar presentes naturalmente nos enchidos, participando no processo de maturação, mas também servem de indicadores de higiene. Existe uma

variação nos valores obtidos, com contagens mais elevadas na morcela de Arganil com 3,3.104 ufc/g (4,52 log ufc/g) e no paio de Fundão com 3,5.103 ufc/g (3,55 log ufc/g).

Relativamente aos *Enterococcus spp.*, também o paio de Fundão e a morcela de Arganil foram os que apresentaram valores mais elevados, com 6,1.105 ufc/g e 2,4.105 ufc/g, respetivamente, indicando assim uma população significativa na microbiota destes produtos. Os enterococos para além do seu potencial papel tecnológico, especialmente nos produtos tradicionais fermentados, têm sido considerados como microrganismos patogénicos emergentes devido à sua elevada resistência aos antibióticos e produção de fatores de virulência (Santos, 2011). No entanto, não são conhecidas toxinfecções causadas por enterococos, pelo que o risco associado ao consumo destes produtos é baixo.

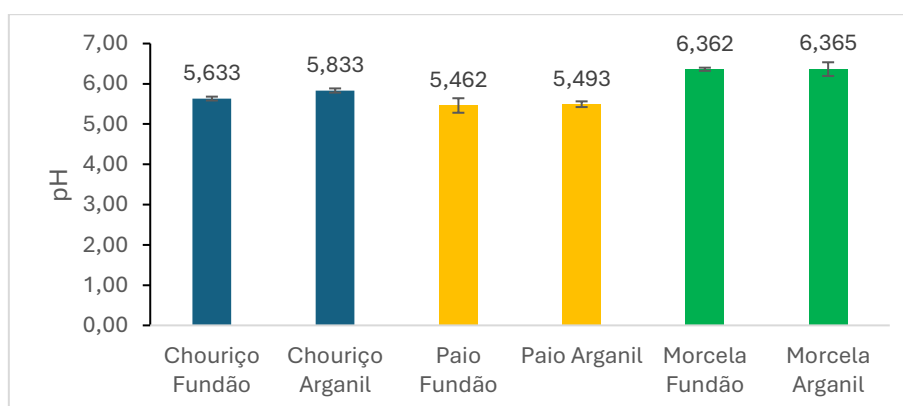
## 5.2. Parâmetros físico-químicos

A estabilidade microbiológica dos géneros alimentícios pode ser avaliada com base nos parâmetros de pH e atividade da água ( $a_w$ ), que influenciam o desenvolvimento de microrganismos e a durabilidade dos produtos alimentares.

### 5.2.1. Valores de pH dos enchidos do Fundão e Arganil

O gráfico 1 mostra os valores de pH (média  $\pm$  desvio-padrão) dos enchidos do Fundão e de Arganil. Ambos os chouriços de Fundão e Arganil apresentam valores de pH de 5,66 e 5,83, respetivamente, embora o chouriço de Arganil apresenta um pH mais alto do que o de Fundão. Os paios do Fundão e de Arganil são os enchidos que apresentam valores de pH mais baixos (5,46 e 5,49, respetivamente). As morcelas de ambas as regiões são as que apresentam valores de pH mais altos (6,36 e 6,37, respetivamente), indicando assim menor acidez.

Gráfico 1. Valores de pH (média  $\pm$  desvio padrão) dos enchidos de Fundão e Arganil

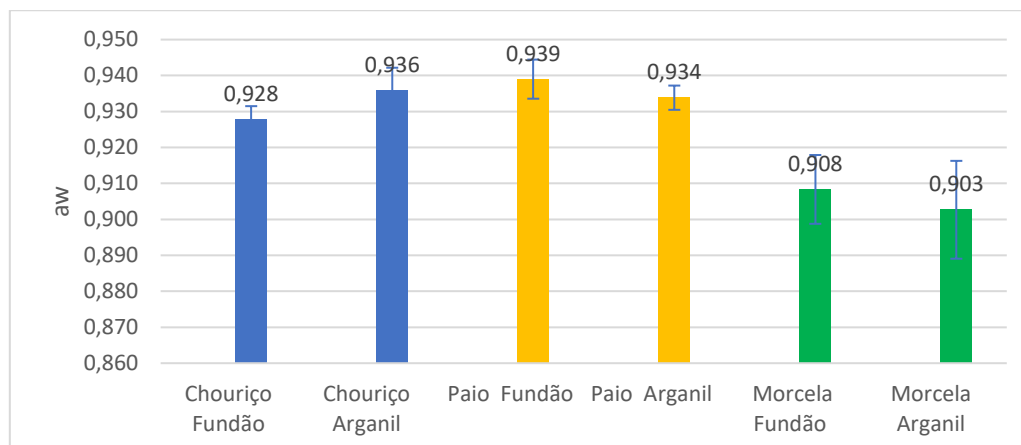


### 5.2.2. Valores de $a_w$ dos enchidos do Fundão e de Arganil

No gráfico 2 são apresentados os valores de  $a_w$  (média  $\pm$  desvio-padrão) dos enchidos do Fundão e de Arganil que oscilam entre 0,903 a 0,939. De um modo geral os enchidos de

Fundão apresentam valores médios de aw mais alto do que os de Arganil, com exceção do chouriço. De entre os enchidos analisados, as morcelas de ambas as regiões são as que apresentam valores de aw mais baixos indicando menor suscetibilidade de desenvolvimento microbiano.

Gráfico 2. Valores de aw (média ± desvio padrão) dos enchidos do Fundão e de Arganil.

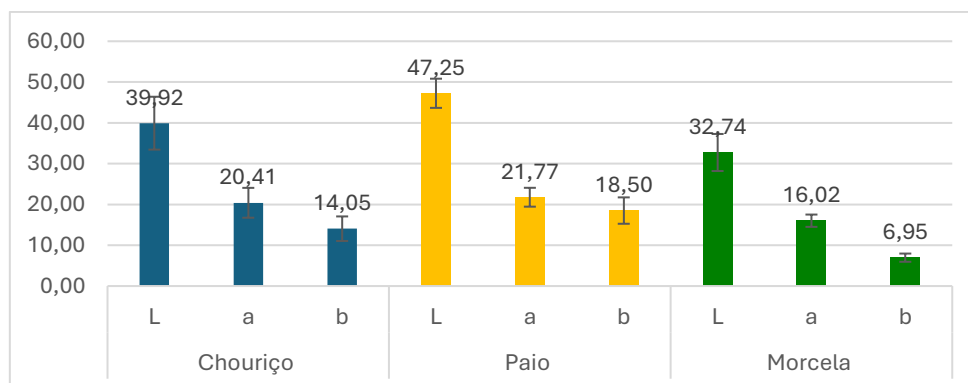


Os resultados de aw no presente estudo vão de encontro aos obtidos por Dias (2018), que também observou valores de aw superiores a 0,90 no chouriço da Beira Baixa, mouro e farinha, o que não garante a segurança microbiológica dos enchidos.

### 5.2.3. Valores da cor dos enchidos do Fundão e de Arganil

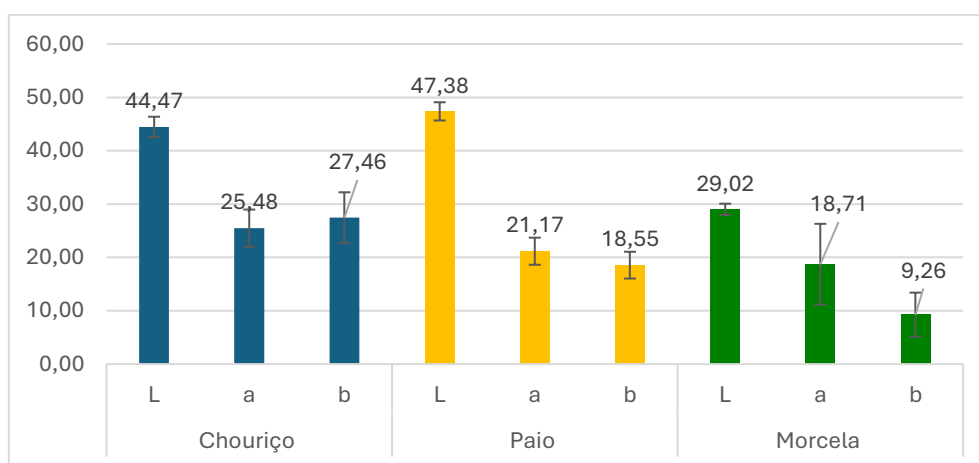
O gráfico 3 apresenta os valores dos parâmetros de cor nas fatias dos enchidos da região da Beira Baixa (Fundão). Pela observação do gráfico 3, o paio é que apresenta um valor de luminosidade ( $L^*$ ) mais clara (47,25) em comparação com o chouriço (39,92) e a morcela (32,74). Em relação à coordenada de cromaticidade  $a^*$ , o paio também apresenta um valor mais alto (21,77), logo mais vermelho, seguido do chouriço (20,41) e por fim da morcela (16,02). De igual forma, o paio é o que apresenta um valor de  $b^*$  mais alto (18,50), seguido pelo chouriço (14,01) e morcela (6,95).

Gráfico 3. Valores da cor (média ± desvio padrão) dos enchidos (fatias) do Fundão.



No gráfico 4, podemos observar os parâmetros de cor nos mesmos enchidos do Fundão, mas na amostra homogeneizada. Os resultados são ligeiramente diferentes aos observados para as fatias. O paio também é o que apresenta um valor de L\* mais alto (47,38), e por isso mais claro, mais brilhante, em comparação ao chouriço (44,47) e à morcela (29,02). Mas em relação às coordenadas de cromaticidade a\* e b\*, o chouriço apresenta valores mais elevados de ambas as coordenadas (25,48 e 27,46, respetivamente), a seguir encontra-se o paio (21,17 e 18,55, respetivamente) e morcela (18,71 e 9,26, respetivamente). A morcela é a que apresenta os parâmetros de cor mais baixos e por isso menos clara, menos vermelha e menos amarelada.

Gráfico 4. Valores da cor (média ± desvio-padrão) dos enchidos (na amostra homogeneizada) do Fundão.



Os parâmetros de cor L\*, a\* e b\* nos enchidos de Arganil, quer nas fatias (gráfico 5) quer na amostra homogeneizada (gráfico 6), são mais altos no chouriço, seguidos do paio, e por último a morcela tal como anteriormente observado para os enchidos do Fundão.

Gráfico 5. Valores de cor (média ± desvio-padrão) dos enchidos (fatias) de Arganil.

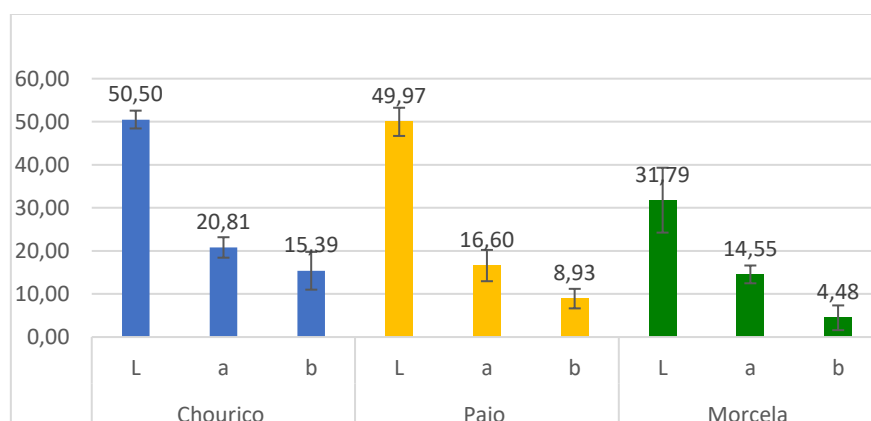
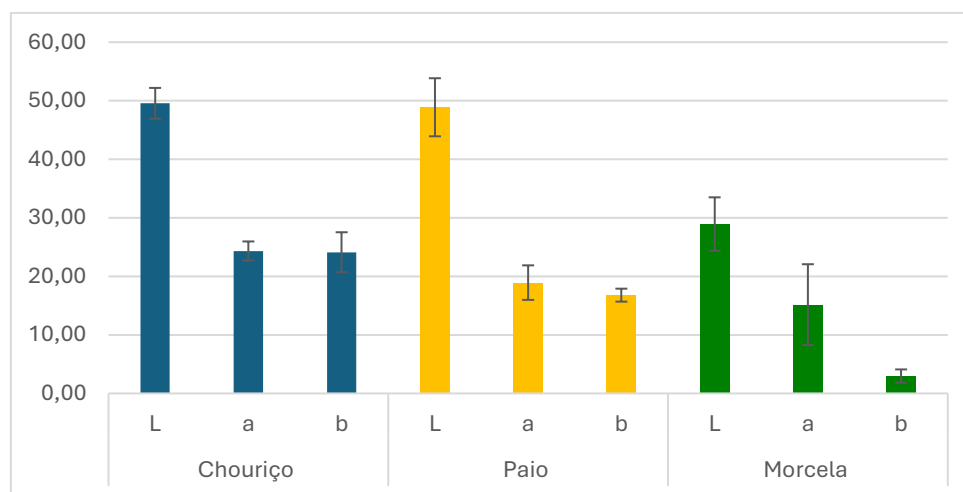


Gráfico 6. Valores de cor (média  $\pm$  desvio-padrão) dos enchidos (amostras homogeneizadas) de Arganil.



#### 5.2.4. Comparação dos enchidos em estudo

Os dados apresentados na Tabela 2 referem-se ao efeito da região de produção e implicitamente à tecnologia de fabrico dos enchidos em estudo. Pela análise da tabela 2 pode-se observar que todos os parâmetros físicos (pH,  $a_w$  e cor) dos enchidos das duas regiões foram significativamente diferentes. Atendendo à região, os chouriços da Beira Baixa (Fundão) e da Beira Litoral (Arganil) apresentam valores médios de pH significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ), sendo mais elevado no chouriço de Arganil, logo menos ácido. Nos paios e morcelas, de ambas as regiões de produção, os valores médios de pH não diferem estatisticamente entre si ( $P > 0,05$ ). No entanto, são as morcelas que apresentam valores de pH estatisticamente superiores comparativamente ao chouriço e paio ( $P < 0,0001$ ) e por isso menos ácidas. O pH, tal como a  $a_w$ , exerce uma função importante na estabilidade microbiológica dos enchidos. A inibição dos microrganismos pode ser conseguida reduzindo o pH, ou seja, aumentando a acidez.

Relativamente ao  $a_w$ , as morcelas de ambas as regiões (Fundão e Arganil) apresentaram diferenças estatísticas comparativamente aos chouriços e paios ( $P < 0,0001$ ). Os valores médios de  $a_w$  foram significativamente menores nas morcelas não havendo diferenças entre regiões, tal como para os chouriços e paios ( $P > 0,05$ ). A redução da atividade da água ( $a_w$ ) nos alimentos torna-os menos favoráveis para a multiplicação e atividade dos microrganismos, entre os quais, os envolvidos nas alterações dos produtos e os patogénicos. Muitas vezes, a ação inibitória da  $a_w$  é potenciada por fatores como o pH, o potencial oxidação-redução, a temperatura e a presença de certas substâncias (Prandl et al., 1994). Os resultados de  $a_w$  obtidos nos diferentes enchidos não eram expectáveis atendendo a morcela ser um produto cozido enquanto o chouriço e o paio serem produtos fermentados secos cujas propriedades específicas (pH,  $a_w$ ) são principalmente devidas ao efeito do metabolismo

bacteriano e à desidratação. De facto, a  $a_w$  é um parâmetro importante para a estabilidade dos enchidos, no entanto, é necessário atender à heterogeneidade dos ingredientes e aos processos de fabrico. Os enchidos analisados não são estáveis microbiologicamente, devido a valores elevados de  $a_w$  e pH.

Quanto aos parâmetros da cor, os valores de  $L^*$  nas fatias e amostras homogeneizadas foram significativamente maiores no chouriço e paio de Arganil ( $P < 0,0001$ ). Os enchidos do Fundão tendem a ser mais escuros (menores valores de  $L^*$ ) comparados aos de Arganil. Em relação à coordenada de cromaticidade  $a^*$  houve efeito da região de produção e tecnologia de fabrico quer nas fatias quer nas amostras homogeneizadas dos enchidos ( $P = 0,0002$ ). Em geral, os enchidos de Arganil tendem a ser mais vermelhos (maior valor de  $a^*$ ) comparados aos do Fundão, com exceção da morcela do Fundão (homogeneizado) que apresenta valores superiores de  $a^*$  relativamente à morcela de Arganil. Quanto à coordenada  $b^*$  existe também diferenças estatisticamente significativas entre as duas regiões indicando diferenças na tonalidade amarela ( $P < 0,0001$ ). Nas fatias, os valores da coordenada  $b^*$  são significativamente menores no paio de Arganil comparativamente ao do Fundão significando que o paio do Fundão é mais amarelo do que o de Arganil ( $P < 0,05$ ). Nas amostras homogeneizadas, com exceção do paio, o chouriço e a morcela do Fundão apresentam-se mais amarelos do que os de Arganil ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2.feito da região de produção (Fundão versus Arganil) nos parâmetros físicos dos enchidos em estudo.

	Fundão			Arganil			EPM	P
	Chouriço	Paio	Morcela	Chouriço	Paio	Morcela		
pH	5,63 <sup>a</sup>	5,46 <sup>c</sup>	6,36 <sup>d</sup>	5,83 <sup>b</sup>	5,49 <sup>c</sup>	6,37 <sup>d</sup>	0,028	<0,0001
$a_w$	0,928 <sup>a</sup>	0,939 <sup>a</sup>	0,908 <sup>b</sup>	0,936 <sup>a</sup>	0,934 <sup>a</sup>	0,903 <sup>b</sup>	0,003	<0,0001
cor (rodela)								
$L^*$	39,9 <sup>ad</sup>	47,2 <sup>bd</sup>	32,7 <sup>ac</sup>	50,5 <sup>b</sup>	50,0 <sup>b</sup>	31,8 <sup>c</sup>	1,899	<0,0001
$a^*$	20,4 <sup>ac</sup>	21,8 <sup>a</sup>	16,0 <sup>b</sup>	20,8 <sup>a</sup>	16,6 <sup>bc</sup>	14,6 <sup>b</sup>	1,076	0,0002
$b^*$	14,1 <sup>ac</sup>	18,5 <sup>a</sup>	6,95 <sup>b</sup>	15,4 <sup>a</sup>	8,93 <sup>bc</sup>	4,00 <sup>b</sup>	1,178	<0,0001
cor (homogeneizado)								
$L^*$	44,5 <sup>a</sup>	47,4 <sup>ab</sup>	29,0 <sup>c</sup>	49,6 <sup>b</sup>	48,9 <sup>ab</sup>	28,9 <sup>c</sup>	1,113	<0,0001
$a^*$	25,5 <sup>a</sup>	21,2 <sup>b</sup>	18,7 <sup>b</sup>	24,3 <sup>a</sup>	18,9 <sup>b</sup>	15,2 <sup>c</sup>	0,685	<0,0001
$b^*$	27,5 <sup>b</sup>	18,6 <sup>e</sup>	9,26 <sup>c</sup>	24,1 <sup>a</sup>	16,8 <sup>e</sup>	2,98 <sup>d</sup>	0,609	<0,0001

EPM - erro padrão da média; P – probabilidade.

Letras diferentes significam  $P < 0,05$

A tabela 3 apresenta o efeito da região de produção e da tecnologia de fabrico dos enchidos nos teores de ABs. Estas substâncias formam-se durante o processo de fermentação/maturação dos enchidos e em condições de elevada atividade bacteriana podem

levar à acumulação das aminas. O tipo e quantidade de AB presentes dependem de vários fatores, como por exemplo das estirpes microbianas, da concentração em aminoácidos livres, e das condições ambientais. De acordo com a tabela observam-se diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) em relação à região de produção dos enchidos para todas as aminas biogénicas, com exceção da espermidina. Em geral, os teores das aminas foram significativamente mais elevados no paio de Arganil ( $P < 0,001$ ). A tiramina e a cadaverina foram as aminas que se acumularam mais no chouriço e paio de Arganil em comparação com os restantes enchidos. As morcelas de Arganil são as que apresentam valores estaticamente inferiores ( $P < 0,0001$ ) de cadaverina comparativamente aos chouriços e aos paios. De qualquer forma, as concentrações de ABs nos enchidos em estudo estão de acordo com os resultados de  $a_w$  e dos parâmetros microbiológicos, não representando perigo para os consumidores.

Tabela 3. Efeito da região (Fundão versus Arganil) no teor de aminas biogénicas dos enchidos em estudo.

	Fundão			Arganil			EPM	P
	Chouriço	Paio	Morcela	Chouriço	Paio	Morcela		
Triptamina	2,30 <sup>a</sup>	1,50 <sup>a</sup>	1,91 <sup>a</sup>	1,88 <sup>a</sup>	16,4 <sup>b</sup>	2,52 <sup>a</sup>	1.124	<0,0001
□-								
Fenilalanina	2,25 <sup>a</sup>	1,75 <sup>a</sup>	2,09 <sup>a</sup>	1,50 <sup>a</sup>	30,5 <sup>b</sup>	3,83 <sup>a</sup>	1,057	<0,0001
Putrescina	4,80 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,89 <sup>a</sup>	5,73 <sup>a</sup>	28,2 <sup>b</sup>	3,52 <sup>a</sup>	3,514	0,0004
Cadaverina	3,52 <sup>a</sup>	3,29 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	38,6 <sup>b</sup>	38,1 <sup>b</sup>	3,46 <sup>a</sup>	4,477	<0,0001
Histamina	1,01 <sup>a</sup>	0,395 <sup>a</sup>	0,978 <sup>a</sup>	0,415 <sup>a</sup>	3,45 <sup>b</sup>	0,268 <sup>a</sup>	0,212	<0,0001
Tiramina	11,6 <sup>a</sup>	2,53 <sup>a</sup>	5,31 <sup>a</sup>	55,8 <sup>a</sup>	201,6 <sup>b</sup>	11,1 <sup>a</sup>	12,2	<0,0001
Espermidina	4,00	4,03	4,03	3,59	3,08	3,97	0,758	0.9311
Espermina	22,9 <sup>b</sup>	26,1 <sup>b</sup>	8,86 <sup>a</sup>	22,0 <sup>b</sup>	21,2 <sup>b</sup>	5,14 <sup>a</sup>	2,38	<0,0001

EPM - erro padrão da média; P – probabilidade.

Letras diferentes significam  $P < 0,05$

Tendo em conta que as ABs, especialmente a histamina e a tiramina, estão associadas a potenciais riscos de intoxicação alimentar, é importante monitorizar e controlar os níveis dessas substâncias durante a produção e armazenamento de enchidos para garantir a qualidade e segurança dos alimentos.

## 6. Conclusão

O objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar enchidos tradicionais, prontos a consumir, de duas regiões distintas de Portugal. De acordo com os resultados obtidos, existem diferenças de qualidade entre os enchidos da Beira Baixa (Fundão) e da Beira Litoral (Arganil). Os resultados mostram que a contagem de *Enterobactereaceae* nos enchidos analisados foram inferiores ao limite de detecção, com exceção na morcela e no chouriço de Arganil. O número de colónias das bactérias do ácido láctico foi superior nos paios e chouriços, indicando uma predominância destas bactérias durante a fermentação/maturação. As contagens de *Staphylococcus* coagulase negativos e de *Enterococcus spp* tendem a ser mais elevadas no paio do Fundão e na morcela de Arganil. Vários fatores como o tipo, a temperatura e o tempo dos diferentes processos a que os enchidos são sujeitos, influenciam significativamente a microbiota do produto final. A heterogeneidade dos processos de fabrico dos enchidos e os ingredientes utilizados pode também influenciar os valores de  $a_w$  e pH e, consequentemente, a estabilidade microbiológica dos produtos cárneos. Foram também os paios que apresentaram valores de  $a_w$  mais elevados, e por isso mais propensos a proliferação microbiana. Quanto às morcelas, apesar de apresentarem valores de  $a_w$  mais baixos, foram as que apresentaram valores de pH mais altos, logo menos ácidas, favorecendo também o desenvolvimento dos microrganismos. Relativamente às diferenças de cor observadas nos enchidos do Fundão e de Arganil, estas poderão de influenciar a preferência e aceitabilidade do consumidor. Em relação às ABs, as concentrações foram, em geral, mais elevadas no paio de Arganil comparativamente aos restantes enchidos, especialmente de tiramina e cadaverina. As diferenças encontradas em termos de microbiota e parâmetros físico-químicos poderão ser atribuídas a variações nos processos de produção (binómio tempo/temperatura, secagem), ingredientes e condições de armazenamento influenciando a qualidade dos enchidos em estudo.

## 7. Referências bibliográficas

- Ahmad, W., Mohammed, G. I., Al-Eryani, D. A., Saigl, Z. M., Alyoubi, A. O., Alwael, H., Bashammakh, A. S., O'Sullivan, C. K., & El-Shahawi, M. S. (2020). Biogenic Amines Formation Mechanism and Determination Strategies: Future Challenges and Limitations. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50(6), 485–500. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1657793>
- Alfaia, C. M. R. P. M. (2002). Perfil de aminoácidos livre, aminas biogénicas e outras frações azotadas em presunto de cura rápida: Sua influência na qualidade e no risco toxicológico do alimento. Dissertação de Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Lisboa: Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.
- Almeida, I. (2009). Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
- Alonzo, A. G. (2008). Estimation of water activity from pH and °Brix values of some food products. *Food Chemistry*, 108(3), 1106–1113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.077>
- Beasley, S. (2004). Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Faculty of Agriculture and Forestry Viikki Graduate School in Biosciences, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki.
- Bedin, M. (2014). Utilização de Bactérias do Ácido Láctico como Culturas Protectoras em Enchidos Fermentados Portugueses. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2024.
- Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & Huis in 't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11(1), 73–84. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90040](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90040)
- Calixto, F. (2009). Synthesis of biodiesel from wastes of food industry via direct transesterification with methanol/carbon dioxide mixtures. Faculdade de Ciências e Tecnologias - Universidade Nova de Lisboa, Departamento de Química, Lisboa.
- Carvalho, L.M.C.P.Q. (2010). Identificação e caracterização de isolados de *Staphylococcus*: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Castro, S. (2008). Boas Práticas de Higiene: Um Pilar para a Produção de Alimentos Seguros. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.
- Claro, F. (2009). Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de aminas biogénicas em enchidos. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2009.
- Coles, R., & Kirwan, M. (2011). *Food and Beverage Packaging Technology* (R. Coles & M. Kirwan, Eds.; 1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781444392180>
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1–2), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.035>

- Conceição, S. (2020). Avaliação da segurança química e microbiológica de enchidos curados do Alentejo. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, 2020.
- Dias, C. I. (2018). Avaliação microbiológica e físico-química de três tipos de enchidos com e sem a adição de aditivos alimentares. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, Faculdade de Medicina e Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2018.
- Dias, R.F. (2019). Determinação de amins biogénicas: Implementação de uma metodologia em produtos cárneos. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, 2019.
- Doyle, M. P., & Beuchat L. R. (2007). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press. pp.112-116.
- EFSA, 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. European Food Safety Authority.
- Elias, M., & Laranjo, M. (2015). Salsicharia tradicional portuguesa: melhorar a segurança, manter a qualidade. Livro de Atas (pag. 45-52). Universidade de Évora.
- Enchidos Portugueses (2020). *Enchidos Portugueses: Guia Essencial*. Acedido em 28 de fevereiro de 2024. <https://alheiras.com/enchidos-portugueses/>
- Erdag, D., Merhan, O., & Yildiz, B. (2019). Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines. In *Biogenic Amines*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81569>
- Felipe, L. (2008). Associação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Clostridium estertheticum* com a deterioração “Blown Pack” em cortes cárneos embalados a vácuo. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - São Paulo.
- Gomes, A. (2017). Influência da tecnologia de produção na qualidade e segurança de produtos de salsicharia tradicional. Tese de Doutoramento em Ciências Agrárias, Universidade de Évora, Évora, 2017.
- Gouveia, I. (2013). Avaliação da produção de amins biogénicas por *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* isolados de produtos cárneos fermentados/fumados Portugueses. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.
- Halasz, A. Barath, A., Simon-Sarkadi, L. & Holzapfel, W. H. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Foods Science Tecnology*, 5, 42-49. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90070-1)
- Hierro, E., Fernández, M., Hoz, L. de la, & Ordóñez, J. A. (2014). Mediterranean Products. In *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 301–312). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118522653.ch35>
- ISO 15214 (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 °C. Switzerland: International Organization for Standardization.

- ISO 6887-1:2017 Microbiology of the food chain. Preparation of samples for analysis, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organization for Standardization.
- ISO 21528-2:2004: Microbiology of food and feed — Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. Switzerland: International Organization for Standardization
- ISO 2917:1999: Meat and meat products — pH measurement — Reference method. International Organization for Standardization.
- Karovicova, J., & Kohajdova, Z. (2005). Biogenic Amines in Food. *Chem. Inform*, 36(34). <https://doi.org/10.1002/chin.200534338>
- Laranjo, M., Elias, M., & Fraqueza, M. J. (2017). The Use of Starter Cultures in Traditional Meat Products. *Journal of Food Quality*, 2017, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2017/9546026>
- Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A. C., Potes, M. E., Cabrita, M. J., Garcia, R., Rocha, J. M., Roseiro, L. C., Fernandes, M. J., Fernandes, M. H., Fraqueza, M. J., & Elias, M. (2016). Characterisation of “Catalão” and “Salsichão” Portuguese traditional sausages with salt reduction. *Meat Science*, 116, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.01.015>
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2012). Control of biogenic amines in fermented sausages: Role of starter cultures. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 3, Issue MAY). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00169>
- Liu, Y., He, Y., Li, H., Jia, D., Fu, L., Chen, J., Zhang, D., & Wang, Y. (2023). Biogenic amines detection in meat and meat products: the mechanisms, applications, and future trends. In *Journal of Future Foods* (Vol. 4, Issue 1, pp. 21–36). Beijing Academy of Food Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.05.002>
- Maneffa, A. J., Stenner, R., Matharu, A. S., Clark, J. H., Matubayasi, N., & Shimizu, S. (2017). Water activity in liquid food systems: A molecular scale interpretation. *Food Chemistry*, 237, 1133–1138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.046>
- Mayer, H. K., Fiechter, G., & Fischer, E. (2010). A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*, 1217(19), 3251–3257. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.027>
- Mendes, J. (2013). Qualidade nutricional e microbiológica de enchidos. Dissertação de Mestrado em Tecnologias da Ciência Animal, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- Metaxopoulos, J., Mataragas, M., & Drosinos, E. H. (2002). Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 40C. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 363–373. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01701.x>
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 15(9), 452–457. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.010>
- Nam, K. C., Ko, K. Y., Min, B. R., Ismail, H., Lee, E. J., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2007). Effects of oleoresin–tocopherol combinations on lipid oxidation, off-odor, and color

- of irradiated raw and cooked pork patties. *Meat Science*, 75(1), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.016>
- NP 589 (2006). Carnes, derivados e produtos cárneos. Chouriço de carne. Definição, classificação, características e acondicionamento. (I. P. Qualidade, Ed.)
- NP 593 (2009). Carnes, derivados e produtos cárneos. Morcela Definição, classificação e características. (I. P. Portugal, Ed.)
- Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Foods*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.028>
- Regulamento (UE) N° 1169/2011. (2011). Regras de rotulagem e apresentação de géneros alimentícios.
- Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis.
- Regulamento 1441, CE. 2007. Regulamento (CE) n° 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo a critérios Microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. 05 de Dezembro de 2007.
- Santos, S. F. C. (2011). The dual role of *Enterococci* in food technology: bacteriocin production versus pathogenicity potential. Tese de mestrado em Microbiologia Aplicada. Lisboa: Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa.
- Silva, M. V. (2003). Segurança alimentar de produtos cárneos tradicionais, enchidos e produtos curados. Porto: AESBUC/UCP
- Suzzi, G. & Gardini, F. (2003). Biogenics amines in dry fermented sausages: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00080-1)
- Tibério, L. (2008). Origem e qualidade dos produtos agroalimentares tradicionais. A influencia das características, culturais e históricas. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 6–9.
- Toldrá, F. (2014). *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasarán, J. G. Sebranek, & R. Talon, Eds.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118522653>
- Vidal-Carou, M. C., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., & Bover-Cid, S. (2009). Biogenic Amines: Risks and Control. In *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 413–428). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118522653.ch47>