



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO NA CONSERVAÇÃO DE UM
PRODUTO CÁRNEO TRANSFORMADO EM PORTUGAL

JOANA MARIA GOULÃO TRAVASSOS CORREIA DE MENDONÇA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques
Barreto
Doutor Miguel Nuno Geraldo Viegas Santos
Elias
Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza
Doutor António José Infante Alfaia

ORIENTADORA

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

CO-ORIENTADOR

Doutor António José Infante Alfaia

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO NA CONSERVAÇÃO DE UM
PRODUTO CÁRNEO TRANSFORMADO EM PORTUGAL

JOANA MARIA GOULÃO TRAVASSOS CORREIA DE MENDONÇA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques
Barreto
Doutor Miguel Nuno Geraldo Viegas Santos
Elias
Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza
Doutor António José Infante Alfaia

ORIENTADORA

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

CO-ORIENTADOR

Doutor António José Infante Alfaia

2012

LISBOA

DEDICATÓRIA

A todos os que confiaram nas minhas capacidades.

Em especial à minha mãe e tia que não só “aturaram” as minhas más disposições quando algo não corria como desejava, como ainda me apoiaram de forma incondicional na concretização desta tese.

Aos meus orientadores Professora Doutora Maria João Fraqueza e Professor Doutor António José Alfaia, que foram os grandes responsáveis pelo princípio, meio e fim desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio incondicional da Professora Doutora Maria João Fraqueza e do Professor Doutor António José Alfaia, respectivamente minha orientadora e meu co-orientador.

Fundamental foi também a ajuda de Maria José Fernandes e de Maria Helena Fernandes, responsáveis técnicas pelo Laboratório de Tecnologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

Sem a disponibilidade e prontidão de todas estas pessoas, teria sido difícil levar a bom termo este trabalho, que dependia muito do Saber de especialistas desta área.

Indispensável foi, ainda, a presença constante da minha mãe, Maria da Conceição Travassos, e da minha tia, Ana Isabel Travassos.

Importantes para desenvolver esta dissertação foram também os muitos ensinamentos que me foram transmitidos, por todos os professores, ao longo da minha vida académica, e a amizade e ajuda de colegas que partilharam comigo o Mestrado, tanto na sua vertente escolar, como de realização do trabalho laboratorial.

A todos um Muito Obrigada.

Por último, deixo um agradecimento a todos os que, directa ou indirectamente, me incentivaram na realização deste trabalho.

APLICAÇÃO DE TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO NA CONSERVAÇÃO DE UM PRODUTO CÁRNEO EM PORTUGAL

RESUMO

Comprovar a eficácia do método de altas pressões como inibidor de microrganismos de deterioração e de potenciais geradores de doenças, presentes em produtos de salsicharia fermentados, foi o grande objectivo deste trabalho.

O processamento de altas pressões é uma técnica não térmica, utilizada para a conservação de produtos cárneos, pois evita o crescimento de microrganismos nocivos à saúde do consumidor. A eficácia do método depende de parâmetros como a pressão (P), a temperatura de processamento (T) e o tempo de exposição.

Para analisar o efeito das altas pressões nas floras microbiana e tecnológica, foram efectuados dois ensaios com enchidos-modelo. No primeiro, o preparado de carne foi inoculado com *Staphylococcus xylosus* ATCC8166, sendo depois as amostras submetidas à pressão isostática (50-250 MPa) a temperatura controlada (1-30°C) durante 30 minutos.

Na segunda experiência, os enchidos-modelo foram inoculados com o patogénico *Listeria monocytogenes* 4aCECT934 e depois sujeitos à pressão de 50-250 MPa, a temperatura fixa de 15°C durante 5 a 60 minutos.

Em ambos os ensaios, verificou-se que as altas pressões impediram o crescimento de *Enterobacteriaceae*, comprovando o interesse deste método na inactivação de microrganismos indicadores de contaminação de origem fecal e de outros da família potencialmente nocivos para a saúde do consumidor.

PALAVRAS-CHAVE: Tecnologia de altas pressões, segurança, *Enterobacteriaceae*, enchido-modelo, *starter*.

THE USE OF HIGH PRESSURE TECHNOLOGY ON THE PRESERVATION OF A MEAT PRODUCT

ABSTRACT

The main purpose of this work was to prove the effectiveness of the method of High Hydrostatic Pressure (HHP) to inactivate spoilage and potential pathogenic microorganisms present in fermented sausages.

High pressure processing (HPP) is a non-thermal technology used to preserve meat and meat products and prevent spoilage bacteria growth.

However, the effectiveness of treatment can be extremely variable and depends on parameters such as Pressure (P), temperature (T) and exposure time. In this study we evaluated the HHP effect on spoilage and technological microbial flora of a fermented meat sausage model similar to a Portuguese fermented sausage. So, in the first experiment the strain *Staphylococcus xylosus* ATCC8166 was mixed with water and then added to the meat mixture, before the 24 hours ripening period. Then it was submitted to isostatic pressure (50-250 MPa) at various controlled temperatures (1-30°C) for 30 minutes.

In the second experiment, the *Listeria monocytogenes* 4aCECT934 was inoculated directly into the sausages and then they were submitted to isostatic pressure (50-250 MPa) at the controlled fixed temperature of 15°C for 5 to 60 minutes.

In both experiments, it was found that high pressures were effective in preventing the growth of *Enterobacteriaceae* which are potentially hazardous to consumer health.

KEW-WORDS: High Hydrostatic Pressure, *Enterobacteriaceae*, safety, Sausage-model, starter.

ÍNDICE GERAL

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
Lista de siglas e símbolos.....	x
1-Introdução	1
2-Revisão Bibliográfica	3
2.1- A origem dos produtos cárneos: sua evolução histórica em Portugal	3
2.2 - Os produtos cárneos transformados e secos em Portugal	3
2.3 - Processo de fabrico de enchidos fermentados e secos	6
2.3.1 - Ingredientes.....	6
2.3.1.1 - Ingredientes principais	6
2.3.1.2 - Ingredientes secundários	8
2.3.2 - Aditivos alimentares	10
2.3.2.1 - Nitratos e Nitritos	10
2.3.2.2 - Fosfatos.....	11
2.3.3 - Invólucros.....	11
2.3.4 - Elaboração do enchido fermentado e seco	12
2.4 - Técnicas de conservação de um produto cárneo	13
2.4.1 - Fermentação.....	13
2.4.2 - Secagem.....	21
2.4.3 - Fumagem.....	22
2.5 - Vida útil dos produtos cárneos fermentados e secos.....	23
2.5.1 - Parâmetros físico-químicos que contribuem para a estabilidade dos produtos cárneos fermentados e secos.....	24
2.5.2 – Potenciais perigos microbiológicos.....	25
2.5.2.1 - Presença de <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos cárneos transformados fermentados e secos.....	26
2.6 - Técnicas de conservação aplicadas em produtos cárneos transformados e secos.....	28
2.6.1 - Irradiação.....	29
2.6.2 - Campos eléctricos pulsantes de alta intensidade	29
2.6.3 - Campos magnéticos oscilantes.....	30
2.6.4 - Ultra-sons.....	30
2.6.5 - Luz pulsante	31
2.6.6 - Altas pressões hidrostáticas.....	31
2.7 - Desenvolvimento histórico da tecnologia de altas pressões	32
2.8 - Princípios gerais.....	35
2.8.1 - Equipamentos de altas pressões	35
2.8.1.1 - Descrição do processo	36
2.8.1.2 - Sistemas de pressurização	38
2.8.1.3. Produção e aplicação da pressão	38
2.8.2 – Factores que influenciam a eficácia da aplicação de altas pressões hidrostáticas e seus efeitos nos alimentos	39
2.8.2.1 - Efeito sobre os microrganismos.....	40
2.8.2.1.1 – Factores intrínsecos relacionados com o alimento que influenciam a eficácia das altas pressões sobre os microrganismos.....	41
2.8.2.1.2 - Factores relacionadas com os microrganismos	43

2.8.2.1.3 - Factores relacionados com o processo tecnológico.....	44
2.8.2.2 - Efeito sobre os componentes dos alimentos.....	46
2.8.2.3 - Efeito sobre as características sensoriais dos produtos alimentares.....	47
2.9 - Aplicação de tratamentos combinados.....	48
2.10 - Aplicação de altas pressões nos produtos cárneos fermentados e secos.....	49
3 - Aplicação da tecnologia de alta pressão na conservação de um produto cárneo em Portugal	
3.1 - Justificação e objectivos do trabalho.....	50
3.2 - Materiais e Métodos.....	51
3.2.1 - Primeira experiência: aplicação de alta pressão em chouriço-modelo inoculado com <i>St xylosus</i> ATCC8166.....	51
3.2.1.1 - Estirpe bacteriana de referência utilizada.....	51
3.2.1.2 - Preparação da suspensão de <i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 8166 e inoculação do enchido-modelo.....	51
3.2.1.3 - Processo de fabrico e condições de altas pressões.....	52
3.2.2 - Segunda experiência: aplicação de alta pressão em chouriço-modelo inoculado com <i>Listeria monocytogenes</i> 4aCECT934.....	53
3.2.2.1 - Estirpe bacteriana de referência utilizada.....	53
3.2.2.2 - Preparação da cultura de <i>Listeria monocytogenes</i> 4a CECT934 para inoculação.....	53
3.2.2.3 - Processo de fabrico e condições de altas pressões.....	53
3.2.3 - Equipamento de altas pressões e modo de execução.....	54
3.2.4 - Análises microbiológicas.....	56
3.2.4.1 - Preparação da amostra para contagem dos microrganismos.....	56
3.2.4.2 - Contagem de aeróbios totais a 30°C.....	56
3.2.4.3 - Contagem de bactérias ácido lácticas.....	57
3.2.4.4 - Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	57
3.2.4.5 - Contagem de <i>Staphylococcus coagulase</i> negativos.....	57
3.2.4.6 - Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	58
3.2.5 - Análises Físico-químicas.....	58
3.2.5.1 - Determinação do pH.....	58
3.2.5.2 - Determinação da actividade da água (aw).....	59
3.2.6 - <i>Design</i> experimental e análise estatística dos resultados.....	59
4 - Apresentação dos resultados.....	60
4.1 - Caracterização microbiológica das matérias-primas utilizadas no fabrico do enchido-modelo.....	60
4.2 - Efeito da aplicação de alta pressão e da temperatura de processamento em enchidos-modelo inoculado com <i>St xylosus</i> ATCC8166 (primeiro ensaio).....	61
4.3 - Aplicação de alta pressão em chouriço-modelo inoculado com <i>Listeria monocytogenes</i> 4 aCECT934 (segundo ensaio).....	65
4.4. - Influência das altas pressões nos parâmetros físico-químicos.....	70
5 - Discussão.....	71
6- Conclusões.....	81
7- Bibliografia.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mudanças durante a maturação dos enchidos fermentados e secos (contagem microbiana- <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcaceae</i>), pH, aw.....	14
Figura 2 - Distribuição de equipamentos de altas pressões nos diferentes sectores da indústria alimentar	34
Figura 3 - Evolução da Temperatura e Pressão durante o processamento de altas pressões.....	45
Figura 4 - Equipamento de Altas Pressões.....	55
Figura 5 – Perfil de variação da temperatura no interior do vaso de pressão durante um ciclo de compressão e descompressão.....	55
Figura 6 - Análise da superfície de resposta no impacto binomial da temperatura (VAR1) e da pressão (VAR2) sobre a população de <i>Enterobacteriaceae</i> (VAR3) dos enchidos-modelo inoculados com <i>Staphylococcus xylosum</i> ATCC8166.....	64
Figura 7 - Análise da superfície de resposta no impacto binomial da temperatura (VAR1) e da pressão (VAR2) sobre a população de AT a 30°C (VAR6) dos enchidos-modelo inoculados com <i>St.xylosum</i> ATCC8166.....	65
Figura 8 - Análise da superfície de resposta no impacto binomial da pressão (VAR1) e do tempo (VAR2) sobre a população de <i>Enterobacteriaceae</i> (VAR3) dos enchidos-modelo inoculados com <i>Listeria monocytogenes</i> 4aCECT934.....	69
Figura 9 - Análise da superfície de resposta no impacto binomial da pressão (VAR1) e do tempo (VAR2) sobre a população de <i>Listeria monocytogenes</i> (VAR4), dos enchidos-modelo inoculados com <i>Listeria monocytogenes</i> 4aCECT934.....	69
Figura 10 – Análise da superfície de resposta no impacto binomial da pressão (VAR1) e do tempo (VAR2) sobre a flora tecnológica, BAL e SCN (VAR5 e VAR7, respectivamente) dos enchidos-modelo inoculados com <i>Listeria monocytogenes</i> 4aCECT934.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de produtos de salsicharia fermentados.....	15
Tabela 2 - Critérios para seleccionar as bactérias ácido lácticas como <i>starters</i> na fermentação dos produtos de salsicharia.....	17
Tabela 3 - Requisitos para as diferentes estirpes de BAL e SCN, a serem utilizadas como <i>starters</i> em produtos cárneos fermentados e secos.....	19
Tabela 4 - Exemplos de produtos cárneos fermentados e composição dos <i>starters</i> adicionadas.....	20
Tabela 5 - Utilização de <i>starters</i> no fabrico de enchidos fermentados, nos diferentes países europeus.....	21
Tabela 6 - Matérias-primas: Média e desvio-padrão para resultados de análise microbiológicas (log ufc/g).....	61
Tabela 7 - Caracterização microbiológica do enchido-modelo antes e após inoculação com <i>St.xylosus</i> ATCC8166 e submetidos a pressões isostáticas (50-250 MPa) a temperatura controlada (1-30°C) durante 30 minutos (média e desvio-padrão).....	62
Tabela 8 - Efeitos da pressão e da temperatura de processamento na flora microbiana dos enchidos-modelo fermentados e inoculados com <i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC8166, mediante a análise dos níveis de significância correspondentes (p) e dos valores dos coeficientes (R^2 e R^2_{adj}).....	63
Tabela 9 - Caracterização microbiológica do enchido-modelo antes e após inoculação com <i>Listeria monocytogenes</i> 4aCECT934 e submetidos a pressões isostáticas (50-250 MPa) a temperatura fixa de 15°C durante intervalos de tempo de 5 a 60 minutos (média e desvio padrão).....	66
Tabela 10 - Efeitos da pressão e do tempo na flora microbiana dos enchidos-modelo fermentados e inoculados com <i>Listeria monocytogenes</i> 4aCECT934, mediante a análise dos níveis de significância correspondentes (p) e dos valores dos coeficientes (R^2 e R^2_{adj}).....	67
Tabela 11 - pH e aw: médias e desvio padrão dos enchidos-modelo fermentados e inoculados com <i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC8166.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico
aw - Actividade da água
ALOA - Agar Listeria Ottavini Agosti
A.T a 30°C - microrganismos aeróbios totais a 30°C
BAL - Bactérias Ácido Lácticas
BHI - Brain heart infusion
CE - Comunidade Europeia
CEE - Comunidade Económica Europeia
DOP - Denominação de Origem Protegida
DL- Decreto Lei
E_h - Potencial rédox
Ent - *Enterobacteriaceae*
E.U.A - Estados Unidos da América
FAO - Food Agricultural Organization
HACCP - Hazard analysis critical control point
HP - Alta pressão
HR - Humidade Relativa
IGP - Indicação Geográfica Protegida
ISO- International Organization for Standardisation
L.monocytogenes - *Listeria monocytogenes*
L.sakei - *Lactobacillus sakei*
MRS - Man Rogosa Sharpe Agar
MSA - Manitol Salt Agar
NP - Norma Portuguesa
PIF - Pressão isostática a frio
PIQ - Pressão isostática a quente
RSM - *Response Surface Design*
SCN - *Staphylococcus* coagulase negativos
St.aureus - *Staphylococcus aureus*
St.carnosus - *Staphylococcus carnosus*
St. xylosus - *Staphylococcus xylosus*
Starters – culturas de arranque
TGA - Tryptone Glucose Agar
TSA -Tryptic Soy Agar
VRBD - Violet Red Bile Glucose Agar

LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

°C - graus Celsius

atm - atmosfera

cm - centímetro

d - diluição

g - grama

g/kg - grama por quilo

h - hora

J/cm² - joule por centímetro quadrado

KGy - kilogray

Log - logaritmo

ms - milissegundo

mg/kg - miligrama por quilo

MHz – mega-hertz

MPa - Megapascal

nm - nanómetro

NaCl - Cloreto de sódio

P - Pressão

p - níveis de significância

Quad - quadrático

R² - coeficiente de correlação quadrático

R²_{Adj} - coeficiente de correlação quadrático ajustado

T - Temperatura

t - tempo

ufc - unidades formadoras de colónias

ufc/g - unidades formadoras de colónias por grama

ufc/cm² - unidades formadoras de colónias por centímetro quadrado

W/cm² - watts por centímetro quadrado

V - volume

VAR - Variável

µs - microssegundo

ΣC - Soma das colónias presentes

% - percentagem

< - menor

> - maior

Aplicação de Tecnologia de Alta Pressão na conservação de um produto cárneo transformado em Portugal

1 - Introdução

A transformação da carne numa multivariada de produtos tem extrema importância em diversos países, nomeadamente em Portugal. A sua valorização através da melhoria e modificação de características como a cor, o sabor e a durabilidade, originou uma enorme diversidade de produtos de salsicharia tradicionais.

De forma a aumentar a vida útil dos produtos de salsicharia, aplicam-se ingredientes no seu fabrico, como o sal; implementam-se boas práticas de higiene durante a sua elaboração; e utilizam-se processos de conservação, como a fermentação, fumagem e secagem.

Na categoria de produtos cárneos crus curados estão incluídos os de salsicharia fermentados e secos, que são caracterizados pela adição de sal e de outras substâncias e submetidos a um processo de maturação e secagem ou fumagem (Varman & Sutherland, 1998; Toldrá, 2006; Garriga & Aymerich, 2007).

Quando o fabrico se baseia na acção de microrganismos (adicionados na forma de culturas de arranque e/ou presentes na matéria-prima), esses produtos são denominados de produtos fermentados. A adição de culturas de arranque permite que o processo de fermentação do enchido seja um método eficaz na inibição do crescimento de microrganismos patogénicos, prevenindo a elaboração de um produto final com características indesejáveis. Um bom microrganismo iniciador para um produto cárneo é aquela que, adicionada directamente à massa cárnea, melhora a vida útil do enchido fermentado, aumentando a sua aceitabilidade (López, 1999).

Os produtos de salsicharia, para além de fermentados ou não, são normalmente classificados como secos ou semi-secos, consoante a região onde são elaborados. Assim, nos países do Mediterrâneo, os enchidos passam, geralmente, por um longo processo de maturação, enquanto no Norte da Europa este período é mais curto (Flores, 1997).

Nos últimos anos e no que concerne às intoxicações relacionadas com a ingestão de carne e seus derivados, como os produtos cárneos fermentados, tem-se verificado um aumento de listeriose e uma diminuição de salmonelose. Só em 2009, o acréscimo de casos de listeriose (explicados por *Listeria monocytogenes*) foi de 19% e atingiu sobretudo as crianças e os idosos. Tendo em conta a evolução crescente da listeriose, adoptou-se o Regulamento CE nº 1441/2007, para controlo dos critérios microbiológicos da *Listeria monocytogenes* (EFSA, 2011).

O consumidor dos países desenvolvidos encontra-se cada vez mais informado e como tal, conhecedor e consciente dos potenciais perigos que poderão surgir na cadeia alimentar,

exigindo não só produtos cárneos seguros que mantenham as suas propriedades nutritivas e sensoriais, mas que também não contenham aditivos (Torrezan, 2003; Ferreira, 2008). Assim, a indústria deve otimizar a aplicação de tecnologias alternativas ao processo térmico e de junção de aditivos, das quais sobressai as Altas Pressões.

O método de alta pressão hidrostática possibilita o processamento do alimento à temperatura ambiente ou a temperaturas mais baixas, produzindo a transmissão uniforme da pressão sobre o alimento, independentemente da sua forma e tamanho, ocorrendo inactivação enzimática e a eliminação de microrganismos patogénicos que se encontram no alimento, sem que, para tal, seja necessário recorrer ao uso de aditivos químicos ou de outras tecnologias térmicas. Minimiza-se, assim, a utilização de processos que alteram muito as características organolépticas dos alimentos, garantindo-se a manutenção de alimentos frescos por mais tempo (Norton & Sun, 2008; Rendueles *et al.*, 2011).

Segundo vários autores (Bárboza-Cánovas *et al.*, 1998; Patterson, 2005; Rendueles *et al.*, 2011), a aplicação de altas pressões e, conseqüentemente, a inactivação microbiana nos produtos de salsicharia transformados e secos garante a manutenção do aroma, sabor e valor nutritivo, obtendo-se, assim um produto final de elevada qualidade e seguro.

Segundo o exposto acima, o método de alta pressão hidrostática reveste-se de especial importância pela sua capacidade em conservar os alimentos, através da melhoria da sua qualidade higiénico-sanitária (Nieto *et al.*, 2004).

Neste trabalho, pretendeu-se: (1) modelizar um produto cárneo transformado inoculando um agente comum nas culturas de arranque (*Staphylococcus xylosus*) e um agente patogénico (*Listeria monocytogenes*); (2) otimizar o processo de altas pressões tendo em vista as combinações Tempo x Temperatura x Pressão, avaliando as suas repercussões na flora microbiana de um enchido modelo, sabendo que os microrganismos são indicadores tecnológicos e de higiene; (3) averiguar o efeito das altas pressões nas características intrínsecas do produto cárneo (pH e actividade da água); (4) avaliar o efeito das diferentes condições de alta pressão sobre o agente patogénico – *Listeria monocytogenes*.

A estrutura global da dissertação, divide-se em: Revisão Bibliográfica, onde é feita uma análise da temática escolhida; Materiais e Métodos, onde são apresentados os diferentes métodos aplicados no decorrer do trabalho experimental, com o objectivo de fornecer informação que esclareça o efeito da aplicação da metodologia de alta pressão em produtos cárneos, tendo em conta a inoculação de flora tecnológica e patogénica; e apresentação dos Resultados obtidos na aplicação da metodologia, com a sua Discussão e Conclusões gerais face a outros estudos publicados no âmbito deste tema.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1- A origem dos produtos cárneos: sua evolução histórica em Portugal

Há milhares de anos, que o Homem consome carne. No Paleolítico, a caça era uma actividade de enorme interesse; os homens eram essencialmente caçadores, para se alimentarem. Nesse período, desconhecia-se o fogo e a carne era consumida crua, sendo a componente principal da dieta alimentar.

Houve uma enorme evolução do período Paleolítico para o Neolítico. Neste último, a dieta humana era já variada e a carne era conservada sob fumagem ou por cocção.

Um dos avanços mais importantes da civilização foi a criação de métodos de conservação dos alimentos para armazenamento e transporte. A secagem foi, provavelmente, o primeiro deles, seguindo-se a fumagem que é um método natural (Toldrá, 2007).

O fabrico de produtos cárneos é uma das tecnologias mais antigas de processamento de alimentos, encontrando-se referências específicas 500 anos A.C (Hart & Fisher, 1991; Talon & Leroy, 2006).

Os romanos aprenderam a arte de fazer chouriços e conservar a carne de porco com os celtas, herança de que os portugueses ainda beneficiam presentemente (Garriga & Aymerich, 2007). Os romanos foram os responsáveis pela edificação dos primeiros matadouros, e, assim, pelo desenvolvimento da indústria de transformação da carne, com o fabrico de uma enorme diversidade de produtos cárneos, denominando de “salsicia” um produto cru e salgado, muito semelhante à salsicha da actualidade (Hugas, 1984, citado por López 1999 a).

A introdução de algumas especiarias com a invasão árabe (século VIII d.c), também contribuiu para a elaboração dos produtos de salsicharia

Na Idade Média, a carne de porco era a base alimentar, salgando-se para ser conservada durante todo o Inverno. Com ela, elaborava-se também uma série de produtos de salsicharia que eram fumados durante muito tempo (Fraqueza, 2003).

O fabrico artesanal industrializou-se no início do século XX, surgindo as primeiras salsicharias com a revolução industrial (Ribeiro, 1978).

2.2 - Os produtos cárneos transformados e secos em Portugal

Na Europa, o fabrico de produtos cárneos fermentados tem grande tradição, principalmente nos países do Mediterrâneo (Buckenhuskes, 1990 citado por Niinivaara, 1991; Maurici, 1994), como Portugal, dado o seu clima favorável (temperatura e humidade relativa) e ao processo de secagem (Lucke, 1984, citado por López, 1999a; Comi *et al.*, 2005; Demeyer, 2006).

No mercado europeu, existe uma grande variedade de produtos cárneos fermentados, devido às diferentes tradições culturais dos países e regiões e ao recurso a diferentes matérias-primas, ingredientes, formulações, processos de fabrico, condições de fermentação e culturas de arranque (*starters*) adicionadas (se os produtos são fabricados de forma industrial) (Garriga & Aymerich, 2007). Tal diversidade é baseada no teor de humidade, no conteúdo proteico, no rácio humidade/proteína e na perda de peso, originando produtos cárneos fermentados com texturas e aromas característicos e de grande importância na economia (Lucke, 1998, López, 1999a; Hansen, 2002; Talon *et al.*, 2008).

A Europa é ainda o maior produtor e consumidor de produtos cárneos fermentados (López, 1999a). Para satisfazer a procura de mercado necessita-se de um fabrico industrial de produtos de salsicharia fermentados, embora persistam as pequenas unidades de fabrico artesanal, com produtos muito valorizados pelo consumidor (Maurici, 1994; Talon & Leroy, 2006).

O fabrico industrial de produtos de salsicharia segue, de modo geral, os requisitos de higiene explicitados no *Códex Alimentarius* e no Regulamento CE nº 1441/2007, de 5 de Dezembro, sendo o fabrico dos produtos efectuado em locais adequados para o efeito, com controlo da temperatura, humidade relativa (HR) e circulação do ar. A sua produção é caracterizada pela adição de culturas de arranque (*starters*) que, para além de tornarem estes produtos mais uniformes, aceleram a sua fermentação com uma menor variabilidade da microflora presente, de forma a uniformizar e controlar o processo de fabrico e garantir a estabilidade do produto (Talon *et al.*, 2007).

No fabrico tradicional, não são adicionadas, normalmente, *starters*. Assim, os microrganismos necessários, originados pela própria carne e pelo ambiente fabril, constituem parte da flora presente no produto, a chamada “flora da casa” (uma flora heterogénea devido às múltiplas etapas de abate, manipulação e maturação da carne), ocorrendo uma fermentação espontânea (López, 1999; Wigley, 2000; Holzapfel, 2002; Talon & Leroy, 2006; Casaburi *et al.*, 2007). A caracterização e o controlo de flora tecnológica, que permitem inibir o crescimento de patogénicos e reduzir a formação de amins biogénicas, são essenciais para garantir a qualidade sensorial e a segurança do produto (Aymerich *et al.*, 2004; Talon *et al.*, 2008).

Os produtos de salsicharia do Mediterrâneo, onde se incluem os portugueses, são secos, com a actividade da água (*aw*) baixa (<0,90), submetidos a um longo período de maturação, a uma acidificação lenta, e onde o nitrito não é usualmente empregue (Flores, 1997). Têm um pH final de 5,2-5,8 devido ao baixo conteúdo em ácido láctico (0,5-1,0%) e relação humidade: proteína inferior a 2,3:1. O tipo de enchidos destes países depende do seu diâmetro, forma, tamanho, ingredientes adicionados e características da carne. A

denominação que lhes é atribuída está de acordo com a região geográfica de onde provêm (Toldrá *et al.*, 2007; Ordoñez & de la Hoz, 2007; Vignolo *et al.*, 2010).

Em Portugal, a cura está quase sempre associada à fumaça, o que dá continuidade aos processos físicos, químicos e microbiológicos que tiveram início na fase de maturação, resultando num produto com características organolépticas e de conservação completamente diferentes das da matéria-prima que lhe deu origem (Rosário, 1989, citado por Elias *et al.*, 2006).

No Alentejo, a excelência dos produtos é conseguida com a utilização da carne de porco da raça Ibérica, variedade alentejana (Paiva, 1944 citado por Fraqueza, 2008).

No Norte do País, a carne do porco Bísaro é utilizada no fabrico de diversos produtos cárneos. Esta raça nacional fornece mais carne quando comparada com a do porco ibérico, que apresenta grande quantidade de gordura (Fraqueza, 2003; Fraqueza, 2008).

A diversidade de produtos de salsicharia a nível nacional está relacionada com a variedade das peças da carcaça de suíno, cuja utilização é função da qualidade.

Dos enchidos mais consumidos em Portugal, alguns remontam ao período da Inquisição, como a alheira e a farinheira, sendo a primeira fabricada principalmente no Norte do País, com destaque para a região de Mirandela, e a segunda produzida à base de farinha e gordura de porco.

Desde o século XVIII que são produzidos e consumidos no Norte de Portugal, o salpicão e a chouriça de Vinhais. Ambos são fumados e feitos a partir de carne de porco, especiarias e vinho.

O painho de Portalegre é um enchido fumado seco, em que a massa de pimentão e o alho são utilizados como ingredientes (Vignolo *et al.*, 2010).

A morcela e a cacholeira são fabricadas com ingredientes muito perecíveis. Na primeira, o sangue é o ingrediente principal, sendo a morcela produzida em diversas regiões do País, como a morcela de arroz em Leiria. O fígado, pulmão e baço são os ingredientes fundamentais da cacholeira, que é fabricada, sobretudo, no Alto Alentejo.

O presunto é uma das peças nobres conservada pelo sal e fumada. Nas regiões do nordeste transmontano (presunto de Chaves) e do Alentejo (presunto de Barrancos) são produzidas as variedades mais conhecidas em Portugal. Contudo, é o chouriço de carne, com sabor “*sui generis*”, fabricado em larga escala em todo o País, que tem a preferência dos consumidores portugueses (Fraqueza, 2003; Fraqueza, 2008).

Os produtos de salsicharia são típicos de cada região, dando origem a um património cultural que deve ser mantido.

Em Portugal, os consumidores dão preferência a produtos artesanais, com as indústrias de salsicharia a produzirem os enchidos baseados em receitas antigas, e são cada vez mais exigentes, existindo assim muitos produtos com Denominação de Origem Protegida (DOP)

ou Indicação Geográfica Protegida (IGP). Estes afixos indicam que as características do produto são influenciadas pelos solos, clima, raças dos animais, variedades vegetais e pelo saber fazer das pessoas que trabalham nesta área, identificando os produtos de salsicharia, factor que é fulcral não só para os produtores mas também para os consumidores, garantido a qualidade do produto final (Fraqueza, 2003).

2.3 - Processo de fabrico de enchidos fermentados e secos

No fabrico de produtos de salsicharia fermentados e secos tem que se ter em consideração variáveis como o corte e o tamanho da carne, o tipo e a quantidade de gordura adicionada, o sal (na forma de NaCl) e outros ingredientes, resultando numa grande gama de produtos, cuja estabilidade é determinada pela acidificação (devido à produção de ácido láctico) e pela diminuição da aw, como resultado da adição de sal e do processo de secagem. Posteriormente, o preparado da carne é introduzido em tripa e deixado a fermentar e a secar (Hugas & Monfort, 1997; Fontana *et al.*, 2005; Demeyer, 2006; Vignolo *et al.*, 2010).

2.3.1 - Ingredientes

Muitos são os ingredientes que podem ser utilizados no fabrico de produtos transformados fermentados secos portugueses, como são os casos da carne, gordura, água, sal, massa de alho e pimentão e os invólucros próprios para o efeito (tripa natural ou sintética) (Elias *et al.*, 2006).

A qualidade dos ingredientes ou aditivos determina a qualidade dos enchidos (Fraqueza & Patarata, 2006).

2.3.1.1 - Ingredientes principais

No Sul da Europa, a carne de porco é a base do fabrico de produtos de salsicharia, sendo proveniente de diferentes regiões da carcaça. As carnes mais utilizadas são as da pá, da entremeada, da perna e, em menor proporção, do cachaço e do lombo. (Sousa & Ribeiro, 1983; Elias *et al.*, 2007). As aparas de carne resultantes da desmancha (*trimmings*), classificadas em função do teor de gordura, também são utilizadas (Ribeiro, 1978).

Contudo, em países como a Turquia, devido a questões religiosas, a carne mais utilizada em produtos de salsicharia é a de ovino e bovino.

De acordo com Pezacki, 1979 (citado por Elias *et al.*, 2006), as carnes utilizadas para o fabrico de produtos de salsicharia devem ser firmes, com elevado poder tampão, boa capacidade de retenção da água, normalmente com aw > 0,98, com valores de pH entre 5,4-

6,0, o que as torna num substrato apetecível para os microrganismos (McDonald & Sun, 1999; Elias *et al.*, 2006). Preferencialmente, o pH da carne deve estar próximo de 5,8 (Feiner, 2006).

Os microrganismos iniciais da carne podem ser bactérias gram-negativas (*Enterobacteriaceae.*, *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Achromobacter* spp.) e bactérias gram-positivas (*Lactobacillus* spp, *Micrococcaceae*, *Enterococcus* spp, *Brochotrix thermosphacta*, *Pediococcus* spp), não esquecendo os patogénicos como a *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, e *Clostridium botulinum* (Garriga *et al.*, 1996; Ordoñez & de la Hoz, 2007; Mejia & Molina, 2008).

A carne a ser processada deve ser de qualidade higiénica elevada, apresentando baixo teor microbiano (valor de $10^2 / 10^3$ unidades formadoras de colónias/ grama de carne (ufc/g)) e sem defeitos, como, por exemplo, manchas de sangue (Varnam & Sutherland, 1998).

A gordura a ser introduzida no fabrico do produto de salsicharia deve ser firme, branca e com baixo conteúdo em ácidos gordos insaturados, uma vez que estes estão envolvidos nos fenómenos de oxidação lipídica (Frey, 1995, citado por Elias *et al.*, 2006; Varnam & Sutherland, 1998).

A gordura tem um impacto no pH e na aw final do produto. Altos níveis de gordura aumentam o pH do preparado da carne, mas sem influência na fermentação do produto (Feiner, 2006).

O elevado conteúdo em gordura nos produtos de salsicharia (40-50%) é essencial para obter determinadas propriedades sensoriais (dureza, suculência e sabor) e funções tecnológicas (Wirth, 1988 citado por Olivares *et al.*, 2011). No entanto, o excesso de gordura poderá causar danos na saúde do consumidor, não sendo recomendado o seu uso excessivo.

É importante a selecção do tipo de gordura adicionada, uma vez que a gordura demasiado branda tem um elevado conteúdo em ácidos gordos insaturados (linoleico e linolénico), sensíveis à oxidação lipídica e que podem aumentar as características sensoriais indesejáveis (acelerar a rancificação do produto e alteração do sabor e aparecimento de coloração amarela) (López *et al.*, 1999).

A percentagem de gordura no enchido poderá ser baixa (10%), alta (40%) ou difícil de avaliar, caso a carne e a gordura não tenham sido separadas no preparado de carne (Lebert *et al.*, 2007).

O rácio carne/gordura é de 2:1 na maioria dos preparados de carne dos produtos de salsicharia industriais, enquanto esta proporção é variável nos enchidos tradicionais (Lebert *et al.*, 2007).

A água não exerce funções tecnológicas e é considerada um meio de difusão de condimentos e aditivos, tornando-os facilmente absorvíveis pela carne e facilitando a homogeneização das massas. No decorrer da mistura dos ingredientes, a água garante a dissolução de proteínas exógenas e de amido (Toldrá, 2007; Ruiz, 2007). Por outro lado, a água é um meio propício ao desenvolvimento microbiano, uma acção desejável em produtos fermentados (Elias *et al.*, 2007). Em substituição da água, pode-se juntar vinho branco aos preparados da carne (Fraqueza, 2008).

2.3.1.2 - Ingredientes secundários

Os condimentos conferem qualidades organolépticas aos produtos e desempenham um papel importante na maturação (Sousa & Ribeiro, 1983).

O sal é um dos ingredientes alimentares mais antigos, inibindo o crescimento microbiano quando adicionado em elevadas concentrações (numa proporção de 2-4% ou de 25-30 g/kg de carne) (López *et al.*, 1999; Demeyer, 2006; Feiner, 2006; Vignolo *et al.*, 2010). Como tal, foi usado nos primeiros métodos de conservação da carne.

De acordo com o Decreto-Lei nº 350/2007, de 19 de Outubro, o sal alimentar é o produto cristalino de extracção, no estado natural ou tratado, essencialmente constituído por cloreto de sódio num mínimo de 90% do produto seco. Para além de conferir sabor aos produtos de salsicharia, actua como conservante, aumenta a capacidade de retenção de água, contribuindo para a solubilização das proteínas miofibrilhares, e reduz a actividade de algumas enzimas (Toldrá, 2006; Elias *et al.*, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Ruiz, 2007). Permite, também, uma redução da temperatura da massa de carne em cerca de 1-2°C (Feiner, 2006) e pode contribuir para a estabilidade do produto transformado final, uma vez que actua sobre a microflora aeróbia total, retardando o seu crescimento quando adicionado em concentrações superiores a 2% (ou 25 g/kg de carne), na medida em que diminui a a_w inicial para valores de 0,96-0,97, agindo como agente bacteriostático.

As bactérias gram-negativas (como *E. coli* e *Salmonella* spp) e os microrganismos patogénicos são muito sensíveis aos decréscimos dos valores de a_w mas, por outro lado, a flora láctica tolera estas condições. Assim, indirectamente, o sal favorece o desenvolvimento destes microrganismos (Elias *et al.*, 2007).

Este ingrediente cria situações que favorecem a selectividade das bactérias lácticas no início da fermentação dos produtos cárneos, impedindo o crescimento de microrganismos indesejáveis (Varman & Sutherland, 1998).

A produção de aminas biogénicas é inibida com a presença de altos níveis de sal ($\geq 5\%$) nos produtos cárneos fermentados (Varman & Sutherland, 1998; López *et al.*, 1999 a; Feiner, 2006; Ruiz, 2007). Contudo, o sal em excesso nos produtos alimentares poderá causar

danos na saúde do consumidor, sendo um dos principais factores pelo aumento de doenças cardiovasculares.

As especiarias são produtos de origem vegetal, fraccionados ou reduzidos a pó que, quando adicionados ao produto cárneo, conferem sabor e aroma, podendo ainda influenciar a cor do mesmo (Foundation, 1960). Devido ao seu elevado conteúdo em óleos essenciais, impedem o desenvolvimento de aromas indesejáveis e conferem textura ao produto final.

De acordo com Rosário (1989) citado por Elias *et al.*, (2007), quanto menor forem as partículas de especiarias maior será a sua acção.

As especiarias apresentam actividade bacteriostática, antioxidativa e antimicrobiana (Rust, 1994, citado por López *et al.*, 1999; Verluyten *et al.*, 2004), o que pode explicar a estabilidade dos produtos cárneos transformados, quando armazenados e embalados de forma adequada. Contudo, as especiarias podem ser uma grande fonte de contaminação dos alimentos, pelo que, normalmente, não se adiciona mais de 1% de especiarias (Elias *et al.*, 2007). No entanto, algumas variedades como o chouriço, podem ter mais de 2% de pimentão (Rust, 1994 citado por López *et al.*, 1999a).

O alho é uma planta aromática com vários componentes antimicrobianos, sendo a alicina a principal substância activa com um efeito bacteriostático (Verluyten *et al.*, 2004).

Os produtos de salsicharia fermentados e secos podem conter 1 a 3% de alho (Vignolo *et al.*, 2010).

A massa de pimentão apresenta uma cor vermelha-alaranjada, uma textura pastosa e um aspecto homogéneo, conferindo um sabor e um aroma típicos. A fermentação bacteriana, que ocorre nos produtos cárneos transformados, pode ser limitada por elevadas quantidades deste ingrediente e de outras especiarias (Leistner, 1992, citado por López *et al.*, 1999a). A massa de pimentão está presente em muitos produtos de salsicharia, normalmente numa percentagem de 0,2 a 0,3% e é caracterizada por ter muito manganésio (Zaika & Kissinger, 1984 citado por Verluyten *et al.*, 2004).

Os açúcares mais utilizados em produtos de salsicharia são a sacarose, a dextrose e a lactose. Quando adicionados, têm inúmeras funções. Devido ao seu sabor doce, mascaram o sabor salgado e provocam reacções de Maillard por reagirem com as proteínas. São uma fonte de energia para as Bactérias Ácido Lácticas (BAL), que produzem ácido láctico mais rapidamente na presença de açúcares (López *et al.*, 1999 a; Ruiz, 2007). Têm um papel bacteriostático, uma vez que diminuem a actividade microbiana, com a consequente redução da *aw*, e são estabilizadores da cor e promotores dos agentes redutores de nitratos a nitritos (Fraqueza, 2008).

Os enchidos com processo de fermentação curto são normalmente suplementados com 0,5-0,7% de glucose ou sacarose ou 1% de lactose, enquanto os produtos de salsicharia com

um longo período de fermentação têm, em regra, níveis de 0,3% para a glucose ou sacarose, ou 0,5% de lactose (Ruiz, 2007).

2.3.2 - Aditivos alimentares

De acordo com o Decreto-Lei nº 192/89, 8 de Junho de 1989, “o aditivo alimentar é qualquer substância, com ou sem valor nutritivo, que não é considerada por si só um género alimentício nem ingrediente característico de um género alimentício, mas cuja adição intencional com finalidade tecnológica ou organoléptica em qualquer fase de obtenção, tratamento, acondicionamento, armazenamento ou transporte de um género alimentício, tem como consequência quer a incorporação nele ou a presença de um derivado, quer a modificação de características desse género”.

Um aditivo alimentar conserva a qualidade nutritiva do produto alimentar; aumenta a conservação e estabilidade de um alimento e melhora as suas propriedades organolépticas e facilita a transformação, preparação, embalagem e armazenagem dos géneros alimentícios. Porém, em doses elevadas, os aditivos alimentares podem ter efeitos nefastos no consumidor, por serem tóxicos. Por este motivo, para cada aditivo existe uma dose diária admissível (Fraqueza, 2008).

2.3.2.1 - Nitratos e Nitritos

Os nitratos, que por vezes são adicionados a produtos cárneos, podem funcionar como um obstáculo ao crescimento de microrganismos patogénicos, especialmente durante a fase inicial de fermentação, actuando como antioxidantes (Feiner, 2006). São também agentes primários para o desenvolvimento da cor rosa desejada, devido à redução dos nitratos a nitritos por acção microbiana (*Lactobacillus* e *Micrococcus*) e contribuem para obter o sabor específico de produtos de salsicharia cozidos ou curados (Lópes *et al.*, 1999 a; Feiner, 2006; Fraqueza, 2008; Vignolo *et al.*, 2010).

Ao contrário do nitrato, o nitrito inibe o crescimento de *Enterobacteriaceae* e de *Brochothrix thermosphacta*, além de outros microrganismos patogénicos, não alterando a flora tecnológica (Fraqueza, 2008).

Os nitratos ou nitritos poderão facilitar os processos de fermentação e de secagem (Campbell-Platt, 1995).

As quantidades de nitratos e nitritos a usar estão regulamentadas na maioria dos países. Em Portugal, a quantidade legalmente autorizada para o fabrico de produtos cárneos fermentados é de 150 mg/kg de carne para os nitritos e de 300 mg/kg de carne para os

nitratos. A quantidade residual para o nitrito é de 50 mg/kg e para o nitrato de 250 mg/kg (Decreto-Lei nº363/1998, de 19 de Novembro).

Os nitratos são controversos, uma vez que poderão ser prejudiciais para a saúde do consumidor, estando directamente relacionados com o aparecimento de neoplasias gástricas, devido à formação de nitrosaminas (Roncáles, 2007).

A adição de nitratos ou nitritos não é muito comum nos enchidos de carne tradicionais fermentados e fumados condimentados com massa de pimentão ou colorau.

2.3.2.2 - Fosfatos

Os fosfatos aumentam significativamente a capacidade funcional da carne. Possuem uma acção gelificante (interacção entre cadeias proteicas quando são desnaturadas pela temperatura ou pelo pH) e uma acção emulsionante (aumenta a capacidade emulsionante das proteínas). Estes aditivos têm um efeito específico sobre as proteínas miofibrilares, aumentando a solubilização (Fraqueza, 2008).

A adição de fosfatos permite uma melhor ligação da carne com as partículas de gordura, favorecendo uma secagem mais equilibrada, uma maior suculência e um aumento da vida útil dos enchidos (Roncalés, 2007).

A utilização de fosfatos nos enchidos faz com que o preparado de carne se converta num enchido mais compacto, o que facilita o processo de secagem (Feiner, 2006).

Normalmente, as concentrações máximas residuais de fosfato são de 5 mg/kg de carne, não devendo ser esquecido que a carne contém quantidades significativas de fosfato (Decreto-Lei nº363/1998, de 19 de Novembro).

Em produtos de carne cozidos são muito utilizados pela capacidade que têm em aumentar a retenção de água na carne.

2.3.3 - Invólucros

No fabrico de produtos de salsicharia são utilizados invólucros, normalmente tripas naturais ou sintéticas.

A tripa proporciona à massa de carne maturada coesão, forma e dimensão, protegendo-a de influências externas superficiais como a contaminação microbiana, não podendo ela própria constituir uma fonte de contaminação microbiana, física ou química (Elias *et al.*, 2006).

Em processos ditos artesanais utilizam-se tripas naturais provenientes dos intestinos delgado e grosso de suínos ou de ovinos. Podem ser gordas, semi-gordas ou magras, consoante a sua composição, sendo as tripas magras excessivamente permeáveis.

As tripas naturais são perecíveis, razão pela qual são normalmente conservadas em sal, a temperaturas de 2-4°C, congeladas ou desidratadas (Elias *et al.*, 2007). Por conterem quantidades razoáveis de gordura e de tecido conjuntivo, podem actuar como tampão de humidade, protegendo o produto cárneo transformado de forma mais eficaz (Feiner, 2006). Para além disso, adicionam valor nutricional ao produto, dada a sua composição proteica. Têm sabor neutro, não alterando o aroma do enchido (Wu & Chi, 2007).

No processo industrial, utilizam-se com maior frequência as tripas artificiais, por serem mais baratas e mais resistentes para usos em máquinas de encher, sendo as de colagénio as mais usadas pois, além de serem comestíveis e uniformes, não necessitam de refrigeração para a sua conservação (Sousa & Ribeiro, 1983; Wu & Chi, 2007).

Independentemente do tipo, as tripas devem apresentar uma boa permeabilidade à água e ao ar, o que permite uma boa evaporação de água (Varman & Sutherland, 1998; Toldrá, 2006).

Para se obter um enchido de elevada qualidade, deve-se fazer uma boa selecção da tripa a utilizar e do seu calibre, bem como ter em consideração que o diâmetro dos produtos fermentados secos está directamente relacionado com a importância da fermentação (pH) vs secagem (aw) (Demeyer, 2006).

2.3.4 - Elaboração do enchido fermentado e seco

Após o corte de carne em dimensões reduzidas, são adicionados e misturados os ingredientes que fazem parte da receita.

O corte da carne tem uma grande importância nas características finais dos produtos de salsicharia, pois quanto menor for o tamanho dos fragmentos, maior será a superfície de contacto destes com os ingredientes adicionados (Rust 1994 citado por López, 1999a; Ordoñez & de la Hoz, 2007).

No método de corte há uma menor desnaturação proteica, quando comparado com o método de miga (Fraqueza & Patarata, 2006).

Uma misturadora eficiente permite obter, num curto espaço de tempo, uma massa homogénea. Nesta fase, os ingredientes, incluindo as culturas de arranque se aplicadas, são distribuídos uniformemente no preparado da carne (Vignolo *et al.*, 2010). Este processo é feito a uma velocidade lenta das pás, pois um aumento de velocidade destas contribui para subir a temperatura do preparado de carne, o que poderá afectar negativamente as características sensoriais do produto (Feiner, 2006). No fim desta etapa, a temperatura do preparado deve ser no máximo de 2°C (Werner, 1985, citado por López, 1999a).

Segue-se um período de repouso, de duração variável, durante o qual se realiza a maturação, onde o sal penetra nos fragmentos da carne, extraíndo a água e as proteínas

das fibras musculares e impedindo o desenvolvimento de bactérias que exigem grande a_w (como é o caso de espécies patogénicas).

Nesta fase, a flora microbiana que se vai desenvolver é halotolerante, como é o caso das BAL que podem interferir no desenvolvimento das propriedades resultantes do amadurecimento, acidificando o meio por fermentação láctica dos açúcares da carne e melhorando a capacidade ligante das proteínas extraídas (Sousa & Ribeiro, 1983; Bedia *et al.*, 2011).

Posteriormente, efectua-se o enchimento da massa maturada em tripas, proporcionando maior coesão e protegendo o produto de agressões externas, nomeadamente de contaminações microbianas.

Durante a fase de enchimento, o preparado de carne deve estar a uma temperatura de 4-5°C de forma a evitar o desenvolvimento microbiano (López *et al.*, 1999a; Fraqueza & Patarata, 2006). Esta etapa poderá ser feita manualmente ou com o auxílio de uma enchedora. Neste último caso, as máquinas são accionadas por motores eléctricos, por dispositivos hidráulicos ou por ar comprimido. As máquinas permitem a extracção do ar das massas (Ribeiro, 1978).

Deve-se evitar a entrada de ar na tripa, uma vez que a quantidade de oxigénio influencia a estabilidade da cor e o aroma e provoca alterações da fermentação, interferindo no valor do potencial rédox (E_h) e no desenvolvimento de bactérias patogénicas (Werner, 1985 citado por López *et al.*, 1999a; Feiner, 2006; Ordoñez & de la Hoz, 2007).

Após o enchimento, os produtos de salsicharia são colocados em salas de maturação/cura com controlo da temperatura (18-24°C), humidade relativa de 90% e velocidade do ar de 0,5-0,8 m/s. Os enchidos são mantidos durante 1-2 dias nessas câmaras, para a fermentação (Ordoñez & de la Hoz, 2007).

2.4 - Técnicas de conservação de um produto cárneo

2.4.1 - Fermentação

A fermentação é o processo em que a massa de salsicha crua e microbiologicamente instável se transforma num produto estável, com elevadas qualidades organolépticas e inócuo do ponto de vista microbiológico (Feiner, 2006). Consiste, essencialmente, no aumento da temperatura dos enchidos após o enchimento, de forma a promover o desenvolvimento da microflora láctica, naturalmente presente na carne. Este processo é feito a uma temperatura de 20°C e HR de 85%, a uma ventilação moderada durante 3-5 dias (Fraqueza & Patarata, 2006).

Tem sido utilizada há muitos séculos, não só para conservar os produtos alimentares, mas também para alterar as suas características sensoriais. É, deste modo, utilizada para

umentar a vida útil de matérias-primas perecíveis, sendo fundamental no processamento de produtos de salsicharia de forma a produzir produtos de elevada qualidade (Rantsiou & Coccolin, 2006; Adsworth *et al.*, 2009).

A Europa é a maior produtora e consumidora dos produtos de salsicharia fermentados, existindo uma grande diversidade, como consequência de variações nas matérias-primas, na formulação e no processamento de fabrico, dependendo dos hábitos e costumes dos diferentes países e regiões (Campbell-Platt, 1995; Lebert *et al.*, 2007).

No caso dos países do Mediterrâneo, como Portugal, os produtos de salsicharia têm um período de maturação relativamente longo quando comparado com os produtos do norte da Europa, onde o tempo de maturação é menos intenso e a fermentação é acompanhada por um processo de fumagem (Flores, 1997; Ordoñez & de la Hoz, 2007).

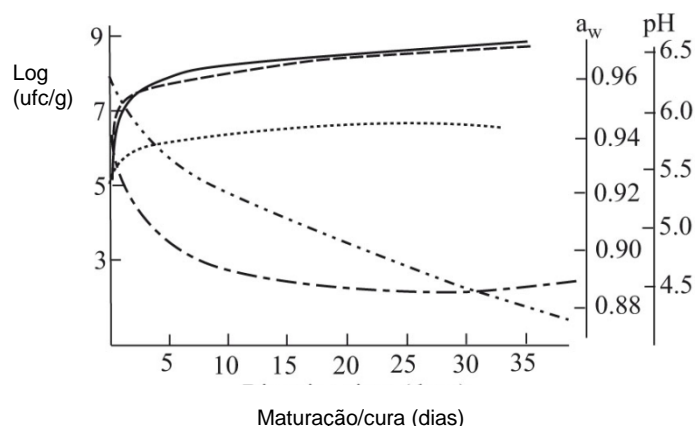
Os produtos de salsicharia fermentados e secos são o resultado de mudanças físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais que ocorrem numa mistura de carne (essencialmente de porco), gordura e outros ingredientes durante a maturação, em condições definidas de temperatura e de HR do ar (Leroy *et al.*, 2006; Casaburi *et al.*, 2007).

Durante a fermentação, o pH dos produtos cárneos diminui normalmente de 5,7 para 5,0 ou mesmo para valores entre 4,6 e 4,2 (em produtos de salsicharia fermentados a temperaturas superiores a 37°C) (Petaja-Kanninen & Puolanne, 2007).

Ao longo da fermentação, devido à adição do sal durante o processo de fabrico dos enchidos, a a_w diminui, dependendo da concentração de sais e do conteúdo em gordura do produto (Varman & Sutherland, 1998; Garriga & Aymerich, 2007).

A redução do pH e a queda da a_w inibem o crescimento microbiano, produzindo produtos seguros, podendo mesmo os fermentados serem armazenados durante um longo período de tempo (Fraqueza & Patarata, 2006; Ockerman & Basu, 2007) (Figura 1).

Figura 1 - Mudanças durante a maturação dos enchidos fermentados e secos (contagem microbiana-*Lactobacillus* (-----), *Micrococcaceae* (.....)), pH (- - - - -), a_w (- - - - -) (Ordoñez & de la Hoz, 2007)



Vários estudos confirmaram o efeito benéfico da redução de aw durante a maturação do produto (Mata *et al.*, 2001; Blaiotta *et al.*, 2004; Marcos *et al.*, 2007; Casaburi *et al.*, 2007; Latorre- Moratalla *et al.*, 2010).

Após a fermentação, nos países do Mediterrâneo, os valores da temperatura e de HR dos produtos de salsicharia fermentados são reduzidos até 10-14°C e 85-87%, respectivamente, em 4-6 dias. Estes valores são mantidos até final da maturação/cura, fase na qual muitos compostos do aroma são desenvolvidos (Ordoñez & de la Hoz, 2007).

Lucke (1998) propõe uma classificação microbiológica que se baseia na aw e no método de conservação (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação de produtos de salsicharia fermentados (Lucke, 1998)

Categoria	Tempo de Maturação/Cura	Actividade da água (aw)	Aplicação de fumagem
Enchido seco com bolores	>4 Semanas	<0,90	Não
Enchido seco com bolores	>4 Semanas	<0,90	Sim
Enchido seco sem bolores	>4 Semanas	<0,90	Sim/ Não
Enchido semi-seco com bolores	<4 Semanas	0,90-0,95	Não
Enchido semi-seco sem bolores	<4 Semanas (10-20 dias)	0,90-0,95	Sim
Produto de salsicharia fresco	<2 Semanas	0,94- 0,96	Sim /Não

O tipo de microflora que se desenvolve na fermentação de produtos de salsicharia está muitas vezes relacionado com a técnica de maturação. Assim, produtos sujeitos a um curto período de maturação têm mais BAL e um sabor mais ácido, cuja intensidade depende do valor do pH final do produto. Por outro lado, produtos com longo período de maturação, e como tal, maior actividade microbiana contêm BAL, *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e leveduras, o que origina altos níveis de compostos voláteis com baixos limiares sensoriais (Rantsiou & Coccolin, 2006; Iacumin *et al.*, 2006).

Hoje, a maioria dos produtos transformados são fabricados industrialmente com recurso a *starters*, uma vez que a sua inoculação acelera a fase inicial da fermentação, com alterações desejáveis durante o processo. Antigamente, eram utilizados apenas microrganismos endógenos da própria carne, como as BAL (Holzapfel, 2002; Flores & Toldrá, 2011), que constituem a principal flora microbiana no fim do período de maturação, com valores finais de 10^7 a 10^9 (ufc/g de produto), seguindo-se os SCN com uma população de 10^5 a 10^8 (ufc/g de produto) (Talon *et al.*, 2006; Lebert *et al.*, 2007; Garriga & Aymerich, 2007; Paramithiotis *et al.*, 2010) (Figura 1).

A selecção e identificação de bactérias e a sua utilização como culturas de arranque tiveram início há um século, tornando-se extensivo o seu uso na segunda década do século XX (Talon & Leroy, 2011). Em 1920, Cesari e Guillermondi (citado por López, 1999) recomendaram o uso de culturas puras de leveduras para o desenvolvimento do aroma em produtos cárneos fermentados. Em 1940, Jensen e Paddock (citado por Cocconcelli, 2007) desenvolveram a ideia de inocular enchidos fermentados com *Lactobacillus*, com o objectivo de acelerar a fermentação. Na década de 50, culturas de *Micrococcus* spp e de *Pediococcus cerevisiae* foram desenvolvidas na Europa por Ninivaara (1955) e nos E.U.A por Deibel e Niven (1957) (citado por Cocconcelli, 2007). A combinação das primeiras experiências em produtos cárneos fermentados levaram Nurmi (1966) a desenvolver a primeira cultura mista, composta por *Lactobacillus* e *Micrococcus* (Cocconcelli, 2007).

Os *starters* contribuem positivamente para a acidificação, cor e sabor do produto cárneo (diminuindo a produção de aminas), redução do tempo de fermentação, conferindo estabilidade microbiológica, qualidade padronizada e maior segurança ao mesmo. São geralmente estirpes seleccionadas de BAL e SCN, que são adicionadas ao preparado de carne no início do processo de mistura e distribuídas uniformemente (normalmente 10^7 por grama de preparado) de forma a assegurar uma fermentação mais uniforme e segura (Hugas *et al.*, 1997; Hugas, 1998; Feiner, 2006; Josephsen & Jespersen, 2006; Petaja-Kannen & Puolanne, 2007; Aro Aro *et al.*, 2010; Vignolo *et al.*, 2010; Flores & Toldrá, 2011; Bedia *et al.*, 2011).

Os produtos de salsicharia fermentados apresentam elevados níveis de BAL e de SCN e contagens reduzidas de *Enterobacteriaceae* e coliformes (Mata *et al.*, 2001).

O nível de acidificação e da selecção de *starters* depende das propriedades sensoriais desejáveis requeridas para o produto cárneo fermentado e seco (Cocconcelli & Fontana, 2010).

Na fase inicial de fermentação do enchido ocorre um contínuo decréscimo do pH determinado pela adição de culturas de arranque, sendo esta acidificação um factor de conservação dos produtos de salsicharia, inibindo a proliferação de microrganismos patogénicos (Benezet *et al.*, 2010; Stollewerk *et al.*, 2011).

As BAL acidificam rapidamente as matérias-primas através da formação de ácidos orgânicos, principalmente ácidos láctico e acético, com conseqüente diminuição do pH, afectando as propriedades tecnológicas e a estabilidade microbiana do produto final (Niskanen & Nurmi, 1976; Flores, 1997; Garriga *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2000; Papamanoli *et al.*, 2002; Mata *et al.*, 2001; Leroy & de Vuyst, 2004; Drosinos *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2007; Casaburi *et al.*, 2008; Diez *et al.*, 2008; Aro Aro *et al.*, 2010; Leroy *et al.*, 2006; Garriga & Aymerich, 2007; Okerman & Basu, 2007; Cocconcelli & Fontana, 2010).

As BAL são responsáveis pelas propriedades proteolíticas e lipolíticas que ocorrem no produto fermentado (García-Varona *et al.*, 2000), pela produção de compostos aromáticos (Leroy & de Vuyst., 2004), redução da capacidade de retenção da água e aceleração do processo de secagem (Lucke & Hechlmann, 1987, citado por Sanchez-Mollinero & Arnau, 2008).

As BAL utilizadas como *starters* incluem os géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconoctoc*, *Weissella* e *Enterococcus*. Os *Lactobacillus* são os mais abundantes e deles fazem parte as espécies: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum* (Hugas, 1998; Wigley, 1999; Leroy *et al.*, 2006; Talon *et al.*, 2008; Talon & Leroy, 2011), que apresentam características tecnológicas específicas e desejadas tal como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Critérios para seleccionar as bactérias ácido lácticas como *starters* na fermentação dos produtos de salsicharia (Varman & Sutherland, 1998)

Critérios para Bactérias Ácido Lácticas utilizadas como <i>starters</i>
Devem ter a capacidade de competir com a flora láctica endógena
Devem produzir quantidades adequadas de ácido láctico
Devem ser tolerantes ao sal (NaCl) e ter a capacidade de crescer a concentrações inferiores a 6%
Devem ter a capacidade de crescer numa larga gama de temperatura (15-40°C), com óptimo de 30-37°C
Devem ser homofermentativas
Não devem ser proteolíticas
Não devem produzir grandes quantidades de H ₂ O ₂
Devem ter a capacidade de reduzir o nitrato
Devem ser catalases-positiva
Devem ter efeito importante no desenvolvimento do sabor e aroma do enchido
Não devem produzir aminas biogénicas
Devem ter um efeito antagónico para agentes patogénicos e outros microrganismos indesejáveis
Devem ser tolerantes com outras culturas de arranque

Os SCN, principalmente os *Staphylococcus xylosus*, os *Staphylococcus carnosus*, os *Staphylococcus equorum* e os *Staphylococcus saprophyticus*, são frequentemente utilizados como *starters* em produtos de salsicharia fermentados e secos (Wigley, 1999; Leroy *et al.*, 2006; Talon *et al.*, 2008; Cocconcelli & Fontana, 2010; Talon & Leroy, 2011).

Os SCN estão envolvidos em reacções que ocorrem durante a maturação do produto cárneo, permitindo a preservação das suas características, como da cor vermelha, através

da actividade da nitrato-redutase (que limita a oxidação lipídica), que é a propriedade tecnológica mais importante deste grupo de microrganismos (García-Varona *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2006). Permitem, também, o desenvolvimento do aroma e do sabor, devido às propriedades redutoras, lipolíticas e proteolíticas e, por fim, algumas estirpes de *Staphylococcus xylosus* inibem o desenvolvimento de microrganismos patogénicos com consequente aumento da vida útil dos enchidos, pela produção de substâncias antimicrobianas inibitórias do crescimento de *Listeria monocytogenes* e em menor proporção de *St. aureus* (Di Maria *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2006; Garriga & Aymerich, 2007; Martín *et al.*, 2007).

Muitos autores sugerem que o género *Staphylococcus* tem um papel fulcral na prevenção da rancificação dos produtos de salsicharia fermentados e secos, em detrimento das BAL (Tabela 3), o que lhe confere um papel importante na fermentação de produtos de salsicharia (Rossi *et al.*, 2001; Blaiotta *et al.*, 2004; Garriga & Aymerich, 2007; Cocconcelli & Fontana, 2010).

Os *Staphylococcus xylosus*, juntamente com os *Staphylococcus carnosus*, são capazes de produzir ésteres e outros compostos aromáticos a partir de aminoácidos (principalmente os de cadeia ramificada, como a leucina, isoleucina e valina), prevenindo a formação de compostos desagradáveis, principalmente pela actividade da catalase e da nitrato-redutase (Leroy *et al.*, 2006). Este grupo permite, ainda, a decomposição de peróxidos e a produção de diferentes substâncias aromáticas.

O pH final do produto depende da temperatura durante a fermentação. Quanto maior esta for, mais rápida é a queda de pH, considerando-se que um aumento de 5°C duplica a velocidade de formação de ácido. Contudo, a temperaturas mais elevadas aumenta o número de microrganismos indesejáveis (Varman & Sutherland, 1998; López *et al.*, 1999).

O pH final dos enchidos está relacionado com o tipo e concentração de açúcares adicionados e com a flora microbiana presente. Aumentando os açúcares adicionados em cerca de 1%, o pH diminui na mesma proporção, visto estes serem uma fonte de energia para as BAL (Samelis *et al.*, 1998; López *et al.*, 1999; FSRE, 2005).

O diâmetro do invólucro do enchido também influencia o pH final. Normalmente, a fermentação demora mais tempo em produtos de salsicharia com diâmetro maior, devido à lenta penetração do calor, determinando uma secagem mais morosa, resultando num pH final menor (FSRE, 2005).

Nos enchidos do Mediterrâneo, a contagem de bolores e fungos é, inicialmente, de 10^2 - 10^3 ufc/cm², mas rapidamente aumenta para 10^6 - 10^7 ufc/cm², em 25 dias de fermentação. As espécies mais frequentes são o *Penicillium* e o *Aspergillus*. A sua presença nos enchidos tem um efeito antioxidativo, pelo consumo de oxigénio, degradação de peróxido e protecção contra a luz, o que contribui para a estabilização da cor, qualidade do produto e

desenvolvimento de sabores típicos através da oxidação do lactato, proteólise, degradação de aminoácidos e lipólise.

Tabela 3 - Requisitos para as diferentes estirpes de BAL e SCN, a serem utilizadas como *starters* em produtos cárneos fermentados e secos (Vignolo *et al.*, 2010)

Grupo Microbiano	Actividade metabólica	Benefícios durante fermentação de salsichas
BAL	<p>Acidificação (Velocidade e extensão)</p> <p>Proteolítica (aminopeptidases)</p> <p>Actividade antimicrobiana (bacteriocinas)</p> <p>Actividade antioxidativa (produção da catalase)</p>	<p>Modulação do sabor ácido/picante</p> <p>Inibição dos patogénicos e contaminantes</p> <p>Desenvolvimento da textura</p> <p>Aceleração da formação da cor e secagem</p> <p>Desenvolvimento do aroma (compostos não voláteis)</p> <p>Inibição de patogénicos e contaminantes</p> <p>Extensão da vida útil do produto</p> <p>Protecção da cor</p>
SCN	<p>Actividade da nitrato-redutase</p> <p>Catabolismo das cadeias ramificadas</p> <p>Actividade proteolítica e lipolítica</p>	<p>Formação da cor vermelha típica</p> <p>Remoção do excesso de nitrato</p> <p>Desenvolvimento do aroma (compostos voláteis que aumentam o aroma)</p> <p>Prevenção da rancificação</p>
Bolores e Leveduras	<p>Actividade proteolítica e lipolítica</p> <p>Actividade antioxidativa</p>	<p>Desenvolvimento do aroma</p> <p>Prevenção da rancificação</p> <p>Melhoria da cor</p>

Os *starters* produzidos no norte da Europa adaptam-se mal e nem sempre são capazes de competir com a flora endógena que coloniza os produtos industriais do Sul da Europa, resultando em perdas das características sensoriais destes (Samelis *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 2006). Por este motivo, as salsichas fermentadas de modo artesanal são, muitas vezes, de qualidade superior, em comparação com aquelas que são inoculados com *starters*, devido às matérias-primas e tecnologias utilizadas (Moretti *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2006). O desenvolvimento de *starters* a partir das bactérias tecnológicas endógenas, bem adaptadas à carne, permite o fabrico de produtos de salsicharia fermentados típicos de cada região, com sabores específicos. Deste modo, estas culturas de arranque, para além de

melhorarem a qualidade higiénica e manterem as características sensoriais dos produtos, garantem uma diminuição do nível de aminas biogénicas, limitando a oxidação de ácidos gordos (Talon *et al.*, 2008).

Os *starters* são específicos para cada tipo de enchido fermentado e variando a flora de composição conforme se trate de um produto de salsicharia fermentado seco ou semi-seco (Tabela 4).

Tabela 4 - Exemplos de produtos cárneos fermentados e composição dos *starters* adicionados (Josephsen & Jespersen, 2006)

Produtos de salsicharia fermentados	Culturas de arranque adicionadas
<u>Produtos de salsicharia semi-secos</u>	<i>Staphylococcus carnosus</i> +/- <i>Lactobacillus pentosus</i> +/- <i>Lactobacillus pentosaceus</i>
<u>Produtos de salsicharia secos</u>	<i>Staphylococcus xylosum</i> +/- <i>Lactobacillus pentosaceus</i>

Na selecção dos *starters* deve-se considerar, a formulação específica do enchido e a tecnologia da fermentação, uma vez que os factores ambientais, como as condições de maturação (temperatura, HR, pH da carne) e o processo de fabrico irão interagir para seleccionar as estirpes que dominarão o processo de fermentação (Mata *et al.*, 2001).

Outro aspecto a considerar é a aptidão dos *starters*. Estes podem desempenhar bem a sua função num determinado produto de salsicharia fermentado, mas não serem eficientes noutro enchido maturado (Aro Aro *et al.*, 2010). Uma boa cultura de arranque deve ter a capacidade de reduzir nitratos, de produzir ácido em condições aeróbias a partir de glucose, de ser tolerante ao sal e ao nitrito, crescer a temperaturas entre 20-43°C (com óptimo de crescimento em 37°C), não originar sabores desagradáveis, não produzir substâncias tóxicas ou ser prejudicial para a saúde (López, 1999).

Visto os *starters* serem aplicadas com o objectivo de melhorarem a cor, salubridade, textura sabor e valor nutritivo do produto cárneo, a sua utilização é considerada um ponto fulcral para a obtenção de produtos cárneos de elevada qualidade, garantindo a redução do tempo de fermentação, podendo ser definidos como um pré-requisito das indústrias alimentares (Elias *et al.*, 2006). Garriga *et al.* (2005) conclui que a utilização destas culturas de arranque é útil para melhorar a higiene e segurança de produtos cárneos fermentados, como os enchidos.

A frequência da utilização de *starters* na produção de enchidos fermentados depende do país de origem tal como se observa na Tabela 5. Utilizando-se em Portugal uma proporção

de *starters* inferior a 20 % na produção dos enchidos fermentados fabricados de modo artesanal e uma proporção superior a 80% no fabrico industrial destes produtos, sendo estes essencialmente endógenos.

Tabela 5 - Utilização de *starters* no fabrico de enchidos fermentados, nos diferentes países europeus (Lucke, 2000)

Países	% na Produção		Starters bacterianos
	Tradicional	Industrial	
Dinamarca, Suécia, Finlândia, Noruega, Holanda	0	>95	BAL e SCN (com menos frequência)
Alemanha, Bélgica	10	85	80% da produção
Áustria	30	80	80% da produção
Suíça	60	50	80% da produção
França	95	90	50% da produção
Itália	80	60	20-30% da produção
Espanha	65	70	20-30% da produção
Grécia, Portugal	<20	>80	<30% da produção

Os produtos fermentados desempenham um papel importante nas dietas, constituindo um grupo de alimentos ricos do ponto de vista nutritivo. São saborosos e saudáveis, aromáticos, de textura agradável, vida útil alargada e elevada segurança (Holzapfel, 2002; Talon & Leroy, 2006; Okerman & Basu, 2007).

2.4.2 - Secagem

A secagem dos alimentos é um dos métodos mais antigos de conservação, onde a água é evaporada pela exposição do alimento ao calor (luz solar, microondas, etc) e ao ar.

A intensidade da secagem pode ser variável, influenciando as propriedades físico-químicas e organolépticas do produto e promovendo a sua estabilidade durante o armazenamento (Varman & Sutherland, 1998; Fraqueza & Patarata, 2006). A perda de humidade deve ser gradual e uniforme, de forma a não alterar as características do produto (López *et al.*, 1999). Durante a secagem, o produto cárneo transformado perde cerca de 30-49% do seu peso inicial, devido à evaporação da água (Andrés *et al.*, 2007).

Para que a secagem seja eficaz, a temperatura da câmara deve estar compreendida entre 10-17°C, com uma HR, variável entre os mínimos de 63% a 75% e os máximos de 86% a 95% em enchidos fermentados secos, durante 2-3 meses. A secagem remove 20 a 50% de

humidade, dando origem a enchidos com relação humidade: proteína não superior a 2,3:1,0 (Fraqueza & Patarata, 2006; Ockerman & Basu, 2007).

A aw apresenta valores compreendidos entre 0,83 e 0,93 para os produtos de salsicharia fermentados e secos provenientes de Portugal, França, Espanha e Itália, uma vez que o processo de secagem destes produtos situa-se entre 4 e 12 semanas, enquanto os enchidos tradicionais da Grécia possuem normalmente uma aw alta (0,95), visto serem submetidos a um curto processo de secagem (1 a 3 semanas) (Lebert *et al.*, 2007; Vignolo *et al.*, 2010).

A redução da aw durante a secagem afecta a evolução da maturação por redução da actividade enzimática (Varman & Sutherland, 1998). Uma aw inferior a 0,91 é sinal de estabilidade do produto e um parâmetro chave para a conservação do mesmo (Montel, 1999; Fraqueza & Patarata, 2006; Thévenot *et al.*, 2006; Stollewerk *et al.*, 2011).

Os produtos são colocados em câmaras de secagem para evitar a ventilação excessiva e não provocar uma desidratação elevada da superfície do produto com endurecimento do mesmo (Toldrá, 2006).

A HR da sala de secagem deve ser inferior à aw do produto, promovendo a remoção da humidade das camadas externas do produto e uma maior concentração de sal na sua superfície (Feiner, 2006).

O tempo de secagem depende de uma série de variáveis, como as relacionadas com o ar (temperatura, velocidade, humidade e características do fluxo) e com o produto (humidade, tamanho das partículas de carne, invólucro e estrutura) (Andrés *et al.*, 2007). A velocidade do ar é um dos principais factores, e quanto maior for, mais elevada será a taxa de secagem.

A secagem e, portanto, a redução da aw do produto têm um impacto significativo no seu sabor, aroma, textura e cor. É difícil de definir o momento em que termina a fermentação e começa o processo de secagem, pois a perda de peso do produto ocorre desde o início da fermentação. A secagem começa quando se obtém a estabilidade microbiana, isto é, quando o pH final baixa para 5,0-6,0, dependendo o valor do tipo de produto. Nos produtos de salsicharia do Mediterrâneo, como em Portugal, o pH final situa-se, em regra, entre 5,3-5,6 (Feiner, 2006; Zukál & Incze, 2010; Vignolo *et al.*, 2010).

2.4.3 - Fumagem

A fumagem é um procedimento tecnológico em que os produtos são submetidos à acção de compostos químicos obtidos pela combustão lenta das madeiras não resinosas e bem secas. Alguns desses compostos têm propriedades conservantes e conferem características sensoriais aos enchidos (Fraqueza & Patarata, 2006).

A fumagem tem um efeito antimicrobiano e antioxidante, dando origem a componentes responsáveis pelo aroma (Feiner, 2006; Toldrá, 2006; Vignolo *et al.*, 2010).

A fumagem tem implicações nutricionais e melhora a qualidade sensorial, a segurança e a vida útil do produto cárneo fermentado e seco, dependendo esta transformação de muitos factores, como a HR, a velocidade e a temperatura do ar, bem como do tipo, densidade, composição e tempo de actuação do fumo (Yean *et al.*, 1998 citado por Andrés *et al.*, 2007). Antes de se efectuar a fumagem dos produtos, deve proceder-se a um controlo da HR e da circulação do ar, para que o invólucro do produto seja uniformemente seco (Feiner, 2006).

Há vários tipos de fumagem: a frio, onde os produtos são submetidos à acção de fumo pouco denso, com circulação lenta, HR de 70-80% e temperaturas de 15-25°C, sendo utilizada como acabamento dos produtos alimentares, melhorando as suas características; a quente, feita por três etapas, a primeira com temperaturas de 30°C, a segunda de 50°C e a terceira de 60-80°C e uma HR de 70-80%; densa, onde a circulação do fumo é moderada e os produtos são submetidos a temperaturas de 60-80°C e a uma HR de 50-60%, sendo aplicada normalmente nos enchidos cozidos semi-secos (Incze, 2007); e a artificial, que consiste no contacto do produto a fumar com extractos de fumo, que se podem encontrar na fase líquida ou em pó. Estes extractos possuem acção benéfica, sendo antioxidantes e estando isentos de componentes prejudiciais.

Na fermentação rápida ou moderadamente rápida, a fumagem é aplicada após 36-48 horas da fermentação, verificando-se uma queda acentuada do pH para valores de 5,2 ou mais baixos (Flores, 1997; Demeyer, 2006). Contudo, se a fumagem é aplicada muito cedo (durante a fermentação), pode alterar as características sensoriais do produto, originando uma cor castanha.

O processo artesanal é caracterizado por longos períodos de fumagem, pouco intensa e a temperaturas que raramente atingem os 70°C. As temperaturas mais elevadas afectam negativamente o produto. Por outro lado, a fumagem de forma industrial permite acelerar a cura e reduzi-la a poucas horas, mas garantindo a qualidade do produto (Sousa & Ribeiro, 1983).

2.5 - Vida útil dos produtos cárneos fermentados e secos

É difícil de alcançar a segurança microbiológica dos produtos fermentados, representando este um risco potencial para a saúde do consumidor. Microrganismos patogénicos como a *Salmonella* spp, o *S.aureus* e a *L.monocytogenes* podem estar presentes no ambiente de processamento das carnes devendo ser tomadas medidas adequadas para a sua eliminação. De acordo com o sistema HACCP (Hazard analysis critical control points), é sobretudo nos pré-requisitos que se deve intervir, uma vez que não existem etapas

específicas durante o fabrico dos produtos cárneos fermentados que eliminem os patogénicos (Fraqueza & Barreto, 2010).

Os alimentos perecíveis estão sujeitos a contaminação microbiana, uma vez que apresentam elevada aw, pelo que utilizam-se técnicas de conservação, como a secagem ou a fumagem, para aumentar a sua vida útil.

A estabilidade microbiológica dos enchidos fermentados e secos tem por base a combinação de diversos factores que ocorrem durante a fermentação, impedindo o crescimento microbiano e, como tal, permitindo a conservação deste tipo de produto com a melhoria das suas características sensoriais e nutritivas.

Apesar dos produtos de salsicharia fermentados e secos, ou semi-secos, serem estáveis, podem ocorrer possíveis contaminações microbianas durante o fabrico, caso não se cumpram boas práticas de higiene (Stollewerk *et al.*, 2011).

A adição de nitritos e sal, a redução do E_h , a intervenção de uma flora láctica competitiva, a diminuição do pH e da aw são os principais factores que contribuem para a conservação de produtos de salsicharia fermentados (Mata *et al.*, 2001).

2.5.1 - Parâmetros físico-químicos que contribuem para a estabilidade dos produtos cárneos fermentados e secos

O pH exerce uma importante função na estabilidade dos produtos cárneos transformados e secos, dado que a inibição dos microrganismos pode ser conseguida pelo aumento da acidez de forma artificial (adição de *starters*) ou de forma natural (Peres, 2000).

A aw refere-se unicamente à quantidade de água livre no alimento e que está disponível para participar nas reacções do metabolismo microbiano. Os produtos com elevada aw, isto é, com humidade elevada, estão sujeitos a contaminações microbianas. Assim, nas indústrias alimentares é de extrema importância que se reduza a aw para limitar o crescimento microbiano nos alimentos perecíveis, como os produtos cárneos transformados, principalmente através da adição de sal (Peres, 2000; Toldrá *et al.*, 2007; Benezet *et al.*, 2010).

O efeito isolado da aw garante a estabilidade dos produtos de salsicharia tradicionais, uma vez que estes não apresentam valores baixos de pH (Peres, 2000).

Os produtos de salsicharia fermentados e secos do Mediterrâneo, como Portugal, apresentam elevadas condições de higiene que são garantidas pelo baixo pH (5,2-5,8) e baixa aw (0,85-0,91) do produto final, o que lhes confere uma longa vida útil, não sendo necessária a manutenção do produto a baixas temperaturas (Toldrá, 2006; Vignolo *et al.*, 2010).

A redução do E_h , diminuindo os níveis de oxigénio limita a sobrevivência das bactérias aeróbias como as *Pseudomonas* spp, não havendo desenvolvimento de bactérias anaeróbias quando o pH se situa entre 5,5 e 5,9 (Fraqueza & Patarata, 2006).

Por outro lado, um baixo E_h torna o nitrito eficaz ao ser utilizado como uma barreira contra a deterioração microbiológica (Feiner, 2006).

2.5.2 – Potenciais perigos microbiológicos

A carne fresca é um produto altamente perecível, devido à sua composição biológica. A composição diversificada dos nutrientes da carne, com uma actividade da água elevada (0,98) e riqueza nutritiva permite o crescimento da flora microbiana (Zhou *et al.*, 2010; Lacasse, 1995; FSIS, 2008).

A flora microbiana inicial da carne é muito heterogénea. Contudo, a maioria dos microrganismos alterantes são bactérias psicotróficas aeróbias, pertencentes ao género das *Pseudomonas* e *Moraxella*; anaeróbios facultativos como as *Enterobacteriaceae* psicotróficas; e alguns microrganismos gram-positivos como *Brochothrix thermosphacta*. No entanto, a principal causa de deterioração de produtos cárneos são as bactérias gram-negativas, que incluem flora microbiana de origem intestinal e bactérias proteolíticas que decompõem a proteína da carne, produzindo odores e sabores desagradáveis (Garriga *et al.*, 1996; García-López *et al.*, 1998; FSRE, 2005).

Os microrganismos têm efeitos nefastos nos produtos alimentares, incluindo a sua deterioração, afectando negativamente a sua qualidade, contudo alguns ditos patogénicos provocam intoxicações alimentares (FSIS, 2008). As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp e *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* são exemplos de agentes patogénicos. Estes microrganismos são inibidos pelo pH ácido, presença de nitrito e baixa a_w (FSRE, 2005). Deste modo, a inibição de bactérias gram-negativas é necessária durante a fermentação e maturação e consequente domínio de BAL e *Micrococcus*, para o sucesso do fabrico de produtos de salsicharia fermentados e secos (Rebecchi *et al.*, 1998; Samelis *et al.*, 1998; Mata *et al.*, 2001; Drosinos *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2007; Casaburi *et al.*, 2008; Talon *et al.*, 2008; Baka *et al.*, 2011). De forma a evitar doenças do foro alimentar, como a campylobacteriose, a salmonelose e a listeriose, estes microrganismos devem ser inactivados mediante tratamentos térmicos, ou através de novas técnicas de conservação dos produtos cárneos (FSIS, 2008; FSIS, 2010).

2.5.2.1 - Presença de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos transformados fermentados e secos

A *Listeria monocytogenes*, um bacilo curto, gram-positivo, não esporulado, anaeróbio facultativo e móvel por meio de flagelos, dependendo da temperatura, tem algumas particularidades que a distinguem de outras bactérias mais frequentemente associadas a infecções de origem alimentar. A mais importante é o facto de conseguir crescer a temperaturas compreendidas entre 1°C e 45°C, tendo uma temperatura óptima de crescimento de 30-37°C (Robinson *et al.*, 1999, Farber & Peterkin, 1991; Thévenot *et al.*, 2006; Aldsworth *et al.*, 2009). Contudo, há estudos que provam que esta bactéria cresce a 0°C, apresentando, assim, capacidade de proliferar a temperaturas de refrigeração (Mantilla *et al.*, 2007; Nufer *et al.*, 2007).

A temperatura é um factor de extrema importância, uma vez que a *Listeria monocytogenes*, dado o seu carácter psicotrófico, pode crescer e multiplicar-se em refrigeração e sobreviver na congelação. Assim se o produto apresenta, numa fase inicial, baixa contaminação de *Listeria monocytogenes*, numa fase final ele pode conter valores elevados de contaminação (Thévenot *et al.*, 2006).

Há diversas espécies de Listéria, mas apenas duas são patogénicas: a *Listeria ivanovii* e a *Listeria monocytogenes*, sendo esta última a que se encontra associada à maioria dos casos de listeriose humana (Orsi *et al.*, 2011).

As espécies não patogénicas, *L. innocua* e *L. welshimeri*, são de interesse acrescido em microbiologia, pois a sua presença indica a possibilidade de coexistência de *Listeria monocytogenes* (Encimas *et al.*, 1999).

A *Listeria monocytogenes*, dado o seu carácter ubíquo no meio ambiente, pode estar presente na água, no solo, na vegetação em decomposição, nos esgotos e, mesmo, na silagem (Adams & Moss, 2000; Wells- Bennik *et al.*, 2008; Quintavalla, 2010).

Sendo hospedeira do homem, esta bactéria é responsável pela listeriose, uma doença invasiva que afecta essencialmente as grávidas, as crianças com menos de 4 anos, os idosos (com 58,5% de todos os casos reportados) e as pessoas com sistema imunitário fragilizado e cuja sintomatologia é do tipo gastrointestinal (Yousef & Carlstrom, 2006; Quintavalla, 2010). Nas grávidas, a infecção pode provocar sintomas que se confundem com os de uma síndrome gripal, mas a contaminação do feto com *Listeria monocytogenes* pode resultar num aborto. Nos adultos com sistema imunitário fragilizado e nos recém-nascidos, as manifestações clínicas são a septicémia e a meningite (Collins & Lynes, 2004; Veiga, 2008; Raengpradub *et al.*, 2008; Orsi *et al.*, 2011). O período de incubação, que decorre entre o consumo do alimento contaminado e o aparecimento dos sintomas de

listeriose é de 4 a 21 dias, sendo assim difícil associar um caso de listeriose ao consumo de determinado alimento (Lacasse, 1995; Forsythe & Hayes, 1998; Veiga, 2008).

O grau de afectação da listeriose num indivíduo depende de uma série de factores, incluindo a virulência da estirpe, a dose ingerida da carne contaminada (não deve ser superior a 10^2 ufc/g), segundo o Regulamento europeu nº 1441/2007), o estado de saúde do hospedeiro e as características da matriz alimentar (Thévenot *et al.*, 2005 e 2006).

Curiosamente, a incidência de listeriose tem vindo a aumentar na Europa desde 2000, com os casos confirmados a crescerem significativamente a partir de 2005, atingindo o pico em 2009. A Dinamarca é o país que regista actualmente mais surtos de listeriose, embora em Portugal a probabilidade de aparecimento desta bactéria durante o processamento de produtos prontos a consumir seja de 19,2%, valor considerado elevado (EFSA, 2011).

Em 2009, foi reportado um total de 1645 casos de listeriose humana na Europa (mais de 19% do que em 2008), sendo a taxa de incidência de 0,4 casos por 100 mil habitantes (EFSA, 2011).

Embora não sendo uma doença frequente, ela merece preocupação por parte dos governos e das agências de segurança alimentar da Europa, devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade nas populações de risco (EFSA, 2011), pois trata-se de uma doença de fácil propagação, tendo como canais de transmissão o contacto homem/animal e homem/homem, para além da ingestão do alimento contaminado. O objectivo é reduzir a ocorrência de *Listeria monocytogenes* nos alimentos (Orsi *et al.*, 2011), crus ou confeccionados, bem como no ambiente fabril, onde pode sobreviver e multiplicar-se durante o período de armazenamento dos produtos.

Estudos efectuados revelam que a *Listeria monocytogenes* está sobretudo presente em produtos cárneos, lácteos, hortofrutícolas e pescado e que o seu desenvolvimento, bem como de outros microrganismos, num produto cárneo fermentado depende da sua capacidade em superar condições adversas encontradas durante o seu fabrico e conservação, como a temperatura, o pH, a aw, o teor de sal e a disponibilidade em nutrientes (EFSA, 2006; Warriner *et al.*, 2009). O Regulamento CE 1441/2007 define que os produtos com $\text{pH} \leq 4,4$ e $\text{aw} \leq 0,92$ ou alimentos com $\text{pH} \leq 5,0$ e $\text{aw} \leq 0,94$ não permitem o crescimento de *Listeria monocytogenes*, enquanto a concentração de sal deve ser superior a 10% para evitar a proliferação deste microrganismo (Adams & Moss, 2000; CE, 2007).

Thévenot *et al.*, (2005) observaram um decréscimo regular de *Listeria monocytogenes* durante a maturação dos produtos de salsicharia, graças a uma baixa aw, baixo pH e alto conteúdo em sal.

Outros autores, como Encimas *et al.* (1999), confirmaram que a taxa de redução de *Listeria monocytogenes* ocorre, principalmente, nas etapas de secagem e maturação, verificando que a fermentação isoladamente tem pouca influência na redução do patogénico. É de notar

que, durante a fase de secagem dos produtos de salsicharia, a capacidade de retenção de água diminui, a aw desce para valores inferiores a 0,90 e, como tal, o crescimento microbiano é inibido (Thévenot, *et al*, 2006).

Em suma, o crescimento de *Listeria monocytogenes* nos produtos cárneos transformados e secos depende da combinação de um conjunto de factores como teor de sal, pH, aw, desidratação, condições de higiene do ambiente fabril, armazenamento do produto (Lacasse, 1995; ICMSF, 1996).

2.6 - Técnicas de conservação aplicadas em produtos cárneos transformados e secos

Os consumidores do século XXI são cada vez mais exigentes na procura de alimentos sãos, ricos do ponto de vista nutritivo, livres de aditivos químicos, reguladores e com um sabor natural e um aroma específico (Torrezan, 2003; Rubio *et al.*, 2006, Aymerich *et al.*, 2008; Garriga & Aymerich, 2009). Os produtos com estas características, minimamente processados, microbiologicamente seguros e com um longo período de vida útil são valorizados (Patterson, 2005).

Esta atitude dos consumidores pode ser explicada pelas crises alimentares verificadas nos últimos anos, (BSE, febre aftosa, gripe aviária, nitrofuranos, dioxinas e surtos de intoxicações alimentares, estes últimos resultam das más práticas realizadas por parte dos manipuladores de alimentos), e que levou a questionar muitas vezes a segurança dos alimentos.

A procura cada vez mais frequente de alimentos minimamente processados, face às mudanças nos hábitos alimentares, está relacionada com o desenvolvimento de técnicas de conservação mais eficazes.

Uma vez que se tratam de alimentos com valor acrescentado e de elevada qualidade nutritiva e sensorial que se consomem frescos, a sua procura impulsiona o desenvolvimento de novas tecnologias de conservação (Herrero *et al.*, 2006).

Até ao momento, os métodos mais comuns de conservação alimentar têm sido mediados por acção do calor como são os casos da pasteurização, esterilização, fumagem e desidratação, o que destrói ou controla o crescimento de microrganismos indesejáveis, se presentes. No entanto, os alimentos que são sujeitos a altas temperaturas podem sofrer mudanças inadequadas nas suas características organolépticas, como consequência da inactivação enzimática, afectando negativamente as suas propriedades sensoriais e o valor nutritivo dos produtos, nomeadamente dos cárneos (Sangronis *et al.*, 1997; Torrezan, 2003). Uma das principais vantagens dos métodos de conservação não térmica, em comparação com os tradicionais, é que possibilitam a inactivação de microrganismos indesejáveis, como dos patogénicos (*E.coli*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, etc.), e de enzimas, sendo

utilizadas no processamento a temperaturas mais baixas do que nos métodos térmicos. Todo este processo ocorre sem que ocorram mudanças significativas na textura, cor, sabor, viscosidade e funcionalidade do produto alimentar, conservando este as suas propriedades nutricionais (Han, 2007).

Os tratamentos não térmicos mais utilizados na conservação de alimentos são: as altas pressões, a irradiação, os campos eléctricos de alta intensidade, os campos magnéticos e a microfiltração, sendo os dois primeiros os mais adequados para a conservação de produtos cárneos, pois utilizam temperaturas mais baixas do que as dos métodos de conservação térmica (Sangronis *et al.*, 1997; Hugas & Monfort., 2002; Rubio *et al.*, 2006; Min & Zhang, 2007). No entanto, na Europa, as limitações existentes à implementação da irradiação como técnica de conservação, torna a tecnologia de altas pressões a mais utilizada nas indústrias de produtos cárneos.

O processo de Altas Pressões Hidrostáticas tem o inconveniente de ainda ser caro, devido, principalmente, ao investimento inicial de capital, o que reduz a sua aplicação a produtos com valor acrescentado (Garriga *et al.*, 2003).

2.6.1 - Irradiação

A irradiação é uma tecnologia não térmica, antiga e aplicada na conservação de alimentos, utilizando a radiação gama, raios X, radiação ultravioleta e electrões acelerados. Nesta técnica, os tratamentos são classificados de acordo com a dose absorvida. Assim, a dose baixa (até 1 KGy) é utilizada para retardar processos biológicos de produtos hortofrutícolas (maturação e senescência), tal como para eliminar parasitas dos alimentos.

Para reduzir a carga microbiana, eliminar patogénicos dos alimentos e melhorar propriedades tecnológicas utiliza-se uma dose média até 10 KGy.

A dose mais elevada, superior a 10 KGY, é utilizada como esterilização comercial em combinação com outros tratamentos suaves (Herrero, *et al.*, 2006; Min & Zhang, 2007).

A irradiação foi promovida pela FAO (Food Agricultural Organization), no *Codex Alimentarius* em 2003, e bem aceite em 50 países, especialmente nos Estados Unidos da América, Egipto, China e países da América Latina.

Esta técnica tem como vantagem a conservação dos alimentos, favorecendo a inactivação microbiana e a manutenção das características químicas dos produtos (Zhou *et al.*, 2010).

2.6.2 - Campos eléctricos pulsantes de alta intensidade

A aplicação da tecnologia de campos eléctricos de alta intensidade (superior a 10 KV/cm) inibe bactérias vegetativas, embora as enzimas e os esporos não sofram qualquer alteração

e se corra o risco de prejudicar os produtos alimentares pela electrólise (Herrero *et al.*, 2006).

A aplicação desta técnica, assenta na passagem de uma corrente eléctrica entre dois eléctrodos, à temperatura ambiente ou de refrigeração e num curto espaço de tempo (1-10 ms), está restrita a produtos alimentares, isentos de microrganismos esporulados que são capazes de conduzir a corrente eléctrica, como o leite, ovos líquidos, sumos de frutas, concentrados e extractos de carne. Ela não é utilizada, ainda, à escala comercial, mas o baixo consumo de energia e as reduzidas temperaturas de processamento garantem a obtenção de produtos com elevadas características sensoriais e nutricionais (Fellows, 2000; Butz & Tauscher, 2002; Herrero *et al.*, 2006; Min & Zhang, 2007).

2.6.3 - Campos magnéticos oscilantes

Esta técnica consiste na conservação de um alimento em embalagens de plástico, numa frequência máxima de 500MHz, temperatura de 0-50°C e tempo de exposição de 25 µs-100 ms. Ela permite a destruição de células bacterianas vegetativas, mas as enzimas e os esporos não sofrem qualquer alteração e requer baixo consumo de energia, preservando as características nutricionais do produto. Por outro lado, o efeito antimicrobiano é incompleto (Fellows, 2000; Butz & Tauscher, 2002).

Sumos, marmeladas, soluções açucaradas, derivados de carne, produtos cozidos e embalados e prontos para consumo, são os alimentos utilizados com maior frequência nesta tecnologia.

2.6.4 - Ultra-sons

É uma técnica de extrema importância na inactivação microbiana e enzimática. As ondas ultra-sónicas provocam, de modo rápido, alterações na pressão e temperatura, causando um rompimento das células bacterianas, através do corte, redução da espessura da membrana celular, aquecimento localizado, produção de radicais livres e cavitação (criação de bolhas nos alimentos líquidos), que apresentam um efeito letal nos microrganismos (Fellows, 2000; Butz & Tauscher, 2002).

Os ultra-sons combinados com outras técnicas, como o calor ou produtos químicos, são utilizados para a destruição celular (Earnshaw *et al.*, 1995).

Para a conservação dos alimentos são mais eficazes as ondas ultra-sónicas de baixa frequência e de alta intensidade (10-1000 W/cm²).

No entanto, esta tecnologia poderá originar modificações indesejáveis na estrutura e textura dos produtos alimentares (Fellows, 2000).

Os ultra-sons são particularmente eficazes na esterilização de marmeladas e de ovos líquidos, e permitem o prolongamento da vida útil dos alimentos líquidos (Herrero *et al.*, 2006).

Não há muitos resultados sobre inactivação microbiana mediante a aplicação desta tecnologia, necessitando-se de mais estudos para comprovar a sua eficácia (Butz & Tauscher, 2002).

2.6.5 - Luz pulsante

Este método de conservação de alimentos envolve pulsos intensos de curta duração (200-300 ms) e um amplo espectro de luz branca com comprimento de onda ultravioleta de 200 nm até comprimentos de onda infravermelhos de 1000 nm (Fellows, 2000).

A aplicação de luz dá-se por descargas durante fracções de segundos, com intensidades de 0,01 a 50 j/cm², provocando inactivação microbiana (Herrero *et al.*, 2006; Butz & Tauscher, 2002).

A tecnologia de luz pulsante é aplicável a materiais de embalagem (Hugas *et al.*, 2002), produtos de panificação, hortofrutícolas, produtos cárneos e frutos do mar.

Esta técnica tem influência sobretudo na superfície do produto, sendo mais eficaz em alimentos que apresentam superfície lisa e contêm poucas fissuras, que poderiam proteger os microrganismos da luz (Fellows, 2000).

2.6.6 - Altas pressões hidrostáticas

Na última década, para minimizar alterações nos produtos alimentares tradicionalmente conservados, têm-se desenvolvido técnicas de tratamento alternativo na indústria alimentar, de que é exemplo o processamento de altas pressões e que consiste em submeter os alimentos a pressões hidrostáticas de 100-800 MPa (1000-8000 atm).

As principais vantagens deste método são o aumento da vida útil dos produtos e a melhoria da segurança dos alimentos por inactivação microbiana (podendo atingir reduções decimais de 5 logaritmos) (Torres & Velázquez, 2005; Aertsen *et al.*, 2009; Yordanov & Angelova, 2010; Rendueles *et al.*, 2011).

Para além de inactivarem bactérias vegetativas, as altas pressões hidrostáticas inactivam enzimas, garantindo a preservação de vitaminas, aminoácidos e outros compostos de baixo peso molecular, que não são afectados pelas altas pressões. Como resultado, as propriedades organolépticas e nutricionais mantêm-se intactas, isto é, ocorre a manutenção do sabor, cor, nutrientes e funcionalidade do alimento (Patterson, 2005; Rendueles *et al.*, 2011).

De acordo com o resultado de um conjunto de análises que mediram a importância dos mais variados produtos e factores de marketing sobre o interesse dos consumidores em alimentos processados pelas novas tecnologias, a de altas pressões hidrostáticas sobressai em relação às outras tecnologias não-térmicas (Garriga & Aymerich, 2009).

2.7 - Desenvolvimento histórico da tecnologia de altas pressões

O recurso ao processo de altas pressões ou Pascalização para conservação de alimentos remonta a 1884 (Jay *et al.*, 2005). No entanto, o seu estudo sistemático foi iniciado em 1899 por Bert Hite no leite, tendo-se conseguido aumentar o seu período de conservação um longo período de tempo, por redução da população microbiana após a aplicação de pressões de 670 MPa (6700 atm) durante uma hora à temperatura ambiente (Hoover *et al.*, 1989; Téllez-Luiz *et al.*, 2001, Jay *et al.*, 2005, Patterson, 2005).

Em 1914, ressurgiu o interesse pela investigação de altas pressões em processos aplicados à indústria. Hite tinha demonstrado a susceptibilidade dos microrganismos responsáveis pela deterioração das frutas à tecnologia de altas pressões, tendo verificado que esta técnica permitia o aumento do tempo de vida útil destes produtos, contrariamente ao verificado com os vegetais submetidos a alta pressão, devido a uma possível presença de microrganismos esporulados, muito resistentes a altas pressões (Patterson, 2005; Jay *et al.*, 2005). Já, então, as bactérias vegetativas podiam ser inactivadas a pressões de 400-600 MPa (4000- 6000 atm). No entanto, e dado o elevado custo dos equipamentos, esta técnica foi pouco expandida (Earnshaw *et al.*, 1995). Numa fase inicial, as altas pressões eram aplicadas essencialmente em estudos de âmbito mais físico e químico.

Só na década de 80 do século XX é que se aplicou pela primeira vez esta técnica no processamento industrial de alimentos. Concretamente, em 1982 nos Estados Unidos da América e em 1986 no Japão, onde foi criada a Sociedade Japonesa de Alta Pressão. Mais tarde, em 1992, a empresa japonesa Fujichiku Co. desenvolveu um processo de fabrico de fiambre pressurizado. Em 1995, sete empresas japonesas já comercializavam alimentos tratados mediante altas pressões (Nose *et al.*, 1992 citado por Cheftel & Culioli, 1997; Téllez-Luis *et al.*, 2001; Garriga *et al.*, 2002a; Rivalain *et al.*, 2010).

O primeiro equipamento para processar alimentos pressurizados foi desenhado pela empresa japonesa Mitsubishi Heavy Industries (Pothakamury *et al.*, 1995, citado por Sangronis *et al.*, 1997; Barbosa- Cánovas *et al.*, 1998). Outros fabricantes de equipamentos de altas pressões são: Kobe Steel Ltd., e Nippon Steel Ltd., no Japão, ABB Autoclave systems, na Suécia, ACB, NKKCorp e Autoclave engineers (Barbosa- Cánovas *et al.*, 1998; Palou *et al.*, 1999).

Na Europa foi a partir do congresso “La Grand Motte”, realizado em França em 1992, que se desenvolveram os primeiros grupos de investigação desta nova metodologia, cujo interesse aumentou de forma substancial em todo o mundo a partir de 2000 (Pereda *et al.*, 2004; Norton & Sun, 2008).

As indústrias europeias, japonesas e americanas investiram muito em investigação, com a finalidade de explorar as possibilidades e as limitações desta tecnologia no processamento de alimentos (Sangronis *et al.*, 1997).

O primeiro produto comercializado submetido a altas pressões (de 400-500 MPa) foi a geleia (de elevada acidez) e o fabricante foi a companhia Japonesa “Meidi-Ya Food Factory Co.” (Adams & Moss, 2000). Desde então, vários alimentos pressurizados foram colocados no mercado japonês, como geleias de morango, framboesa, maçã e kiwi, sumos de frutas, e produtos de baixa acidez (como produtos marinhos, molho e alimentos à base de arroz) (Sangronis *et al.*, 1997; Patterson, 1999).

Na Europa, a comercialização dos alimentos sujeitos a altas pressões tem de estar de acordo com o Regulamento CE nº 258/97, de 27 de Janeiro, que define como novo alimento o que tenha sido objecto de um processo de fabrico não utilizado correntemente e que não apresenta um risco para o consumidor.

Na Europa, os sumos de frutas foram os primeiros alimentos tratados a serem comercializados em França e posteriormente em Inglaterra, seguindo-se o presunto em Espanha. Nos Estados Unidos da América, o primeiro alimento pressurizado a ser comercializado foi a guacamole (Loey *et al.*, 2003).

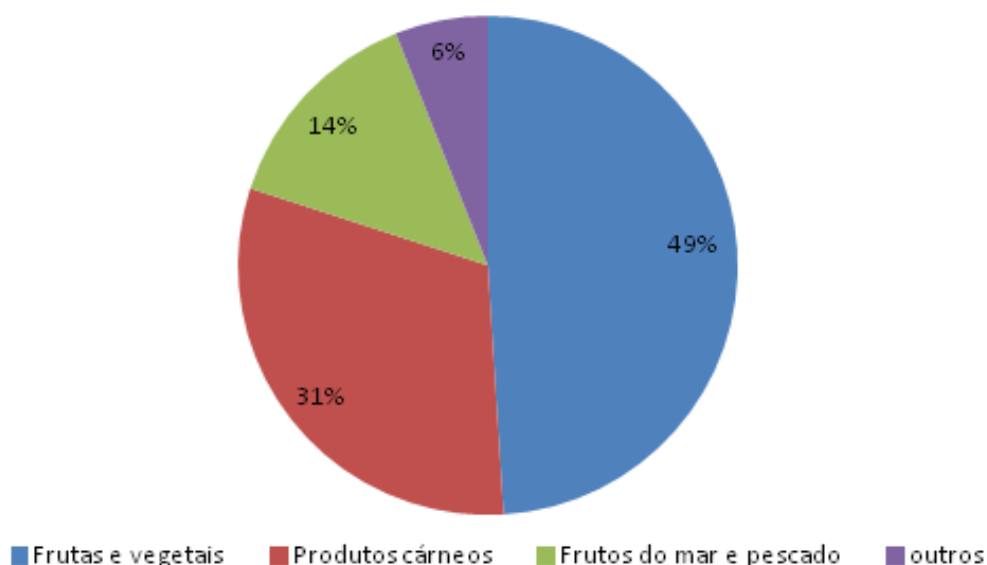
A aplicação comercial de altas pressões está a aumentar de forma exponencial em todo o mundo. Mais de 80% dos equipamentos presentes nas indústrias alimentares foram instalados a partir do ano 2000. Em 2008, cerca de 100 grandes unidades industriais utilizavam a técnica não térmica - altas pressões, com uma produção superior a 200000 toneladas de alimentos/ano (Balasubramaniam *et al.*, 2008; Jofré *et al.*, 2010).

Em 2009, cerca de 140 equipamentos de alta pressão foram instalados em 75 unidades fabris, tanto pequenas empresas como em grandes indústrias, verificando-se que cerca de 100 unidades fabris comercializaram produtos pressurizados, com uma produção de 250000 toneladas de alimentos/ano, em que a produção de produtos cárneos/ano foi de 90315 toneladas (Jung *et al.*, 2011).

Cerca de 55% do equipamento para altas pressões encontra-se nos E.U.A, Canadá e México, países onde o tratamento não térmico tem enorme aceitação. Os restantes 45% estão distribuídos da seguinte maneira: 25% em dez Estados da Europa, com destaque para a Espanha, com o maior número de equipamentos, 15% na Ásia (Japão, Coreia do Sul e China) e 5% na Austrália e Nova Zelândia. Até ao momento, não há indícios da existência de equipamentos de altas pressões no continente africano (Jung *et al.*, 2011).

Nas indústrias alimentares, a maioria dos equipamentos para conservação em alta pressão destina-se a produtos hortofrutícolas (49%) e a produtos cárneos (31%) (Figura 2).

Figura 2. Distribuição de equipamentos de altas pressões nos diferentes sectores da indústria alimentar (Jung *et al.*, 2011)



Apesar da técnica de altas pressões ser muito vantajosa, em Portugal, apenas a “Frubaça” (cooperativa de hortofruticultores) utilizava, em 2009, o método de conservação não-térmico, comercializando sumos de frutas pressurizados (Garriga & Aymerich, 2009).

Têm que ser feitos ainda muitos esforços para que se possam comercializar em Portugal com sucesso produtos cárneos sujeitos a altas pressões.

Embora esta técnica necessite de um investimento inicial elevado, ela é económica e tecnicamente viável, pois é caracterizada por uma poupança de energia, tendendo os custos de processamento a diminuir com o aumento da automatização do processo (Patterson, 1999; Patterson *et al.*, 2006; Aymerich *et al.*, 2008; Norton & Sun, 2008; Garriga & Aymerich, 2009; Zhou *et al.*, 2010; Farkas, 2011).

Graças aos avanços tecnológicos nos equipamentos, a aplicação industrial estende-se para uma gama de pressões de 100-800 MPa, dependendo do objectivo pretendido (Rendueles *et al.*, 2011).

Os equipamentos disponíveis na indústria alimentar operam, actualmente, a pressões elevadas, permitindo tempos de processamento a intervalos de 1-3 minutos e uma redução significativa dos custos de produção (Velázquez *et al.*, 2005).

Os equipamentos mais baratos são aqueles que têm um diâmetro interno menor que 15 cm e suportam pressões até 400 MPa (Ting, 2011).

2.8 - Princípios gerais

São dois os princípios subjacentes ao efeito de altas pressões: o de Le Chatelier e a Lei de Pascal, também conhecida como Lei de Arrhenius.

De acordo com o princípio de Le Chatelier, as reacções que envolvem a diminuição de volume, como mudanças na configuração molecular, reacções e reactividade química, são favorecidas pela pressão, enquanto os processos que envolvem aumento de volume são inibidos pela pressão. Deste modo, a aplicação da pressão num sistema em equilíbrio, irá evoluir no sentido de redução de volume, minimizando o efeito da pressão. Ou seja, qualquer fenómeno que é acompanhado por uma diminuição de volume é favorecido com o acréscimo da pressão e vice-versa (Earnshaw *et al.*, 1995; Cheftel & Culioli., 1997; Smelt, 1998; Patterson, 1999; Herrero *et al.*, 2006; Patterson *et al.*, 2006; Aymerich *et al.*, 2008).

Espera-se, também, que a temperatura tenha um efeito antagónico, uma vez que um aumento da temperatura resulta num acréscimo de volume (Smelt, 1998).

Segundo a Lei de Arrhenius, a pressão é transmitida instantânea e uniformemente a todo o produto, não dependendo da forma nem do volume deste. Assim, esta tecnologia pode ser aplicada directamente a alimentos líquidos ou a qualquer produto embalado submerso num fluido de pressurização (de baixa compressibilidade). O processamento a alta pressão aplicada na indústria alimentar baseia-se assim num parâmetro de índole termodinâmico (Demazeau & Rivalain, 2011) e é conhecida por pressão isostática.

O mecanismo de altas pressões tem a capacidade de destruir microrganismos indesejáveis (incluindo os patogénicos) nos alimentos, de forma a aumentar a sua vida útil, dando primazia à segurança, mas deixa intactos as vitaminas e os compostos de baixo peso molecular (Smelt, 1998; Garriga *et al.*, 2003; Norton & Sun, 2008).

A maior vantagem desta tecnologia é permitir que os alimentos sejam tratados à temperatura ambiente e conservarem os parâmetros de qualidade do produto original (Garriga *et al.*, 2002).

2.8.1 - Equipamentos de altas pressões

Cailletet (1880,1891) e Amagat (1878, 1888 e 1893) desenvolveram os primeiros equipamentos de altas pressões, mas para a indústria de materiais.

O sistema tradicional de pressão compreende um vaso de pressão, um fluido transmissor (normalmente, água) e uma ou mais bombas para gerar pressão (Patterson, 2005; Patterson *et al.*, 2006).

A pressão aplicada aos géneros alimentícios pode ser superior a 400 MPa (4000 atm), com tempo de aplicação de 5-20 minutos, sendo o agente de pressurização a água potável com

pequena percentagem de óleo, que é utilizado como lubrificante e anticorrosivo (Sangronis *et al.*, 1997).

Os equipamentos para o processamento de alimentos de altas pressões funcionam de forma descontínua (capacidade de 10-500 litros/h) ou semicontínua (1-4 toneladas/h de capacidade), utilizando-se para alimentos sólidos ou líquidos (desde que embalados) e líquidos não embalados, respectivamente (Yuste *et al.*, 2002 citado por Min & Zhang, 2007; Herrero *et al.*, 2006).

No processamento descontínuo, o alimento é pressurizado por cargas. Neste sistema, o risco de contaminação dos produtos alimentares com o fluido de pressurização ou com partículas provenientes dos equipamentos é mínimo, originando produtos pressurizados com elevada qualidade nutritiva e sensorial. Num sistema deste tipo, podem ser processados inúmeros produtos sem que haja possíveis recontaminações destes e do fluido de pressurização.

Os líquidos, ao contrário dos produtos sólidos, são tratados em sistemas semicontínuos, onde podem coexistir várias câmaras que trabalham em sequência, com o mesmo gerador de pressão (Herrero *et al.*, 2006).

Actualmente, a maioria dos equipamentos que se encontra no mercado mundial é descontínuo, pois os sistemas contínuos têm um preço de operação mais elevado.

Os equipamentos descontínuos são formados por uma câmara de pressurização (cilíndrica de aço de elevada resistência), um gerador de pressão (normalmente um sistema de bombeamento constituído por uma bomba hidráulica e um sistema multiplicador de pressão) e um sistema de controlo da temperatura.

No tratamento por altas pressões hidrostáticas o alimento pode sofrer um aumento de temperatura, como consequência do aquecimento adiabático de 3°C por cada 100 MPa, constatando-se que quanto maior é o teor de gordura do alimento, maior é o aquecimento adiabático (Aymerich *et al.*, 2008; Norton & Sun, 2008).

Contudo, verifica-se, por vezes, que diferentes equipamentos e meios de pressurização resultam em diferenças de actuação na flora microbiana dos alimentos e seu posterior desenvolvimento durante o armazenamento, sendo necessário o estabelecimento de protocolos de validação da eficácia do tratamento antes da utilização do equipamento (Hugas *et al.*, 2002).

2.8.1.1 - Descrição do processo

No sistema descontínuo, os alimentos, que vão ser tratados por altas pressões, são embalados em recipientes estéreis e flexíveis de plástico (tolerância até 15% às reduções de volume), para resistirem às forças de compressão e permitirem que o alimento

pressurizado mantenha a sua integridade física, os quais são colocados no interior da câmara de pressurização. As embalagens têm um papel importante na viabilidade do processamento não térmico, pois aumentam a durabilidade dos alimentos (Min & Zhang, 2007), permitindo não só a transmissão de pressão adequada aos alimentos, como uma boa capacidade de selagem (Norton & Sun, 2008). Após a libertação da pressão, as embalagens, normalmente de polietileno e polipropileno, recuperam o volume inicial (Caner *et al.*, 2004 citado por Han, 2007; Min & Zhang, 2007).

Uma vez carregada com os produtos alimentares a serem pressurizados, a câmara é fechada. De seguida, o sistema de bombagem substituirá o ar da câmara pelo fluido de pressurização, normalmente água, até ficar completamente cheia, aplicando-se então uma pressão até ao nível que se pretende, ou seja, é exercida uma pressão que comprime a água ao redor do alimento, diminuindo o volume deste (Sangronis *et al.*, 1997).

Uma vez alcançada a pressão pretendida, uma válvula que cerra o circuito permite a manutenção da pressão sobre o produto sem que seja necessário aporte energético adicional. Como as propriedades físico-químicas da água são diferentes consoante a pressão aplicada, à temperatura ambiente (22°C) o volume da água diminui 4%, 12% e 15% por aplicações de pressões de 100MPa, 400MPa e 600MPa, respectivamente (Cheftel & Culioli, 1997). O facto de o volume ser pouco comprimido torna o processo pouco perigoso, sempre que se usa água como meio de pressurização (Sangronis *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 2006).

Findo o período de processamento, a câmara é descomprimida, através da abertura da válvula permitindo que a água utilizada para a compressão se expanda e volte à pressão atmosférica. O alimento tratado está então pronto para ser expedido e o equipamento está preparado para o começo de um novo ciclo (Sangronis *et al.*, 1997; Chawla *et al.*, 2011).

No sistema descontínuo, há uma prevenção de contaminação cruzada, uma vez que os alimentos são embalados e carregados no interior do vaso, sem ser necessária uma limpeza prévia entre as execuções, estando o alimento sujeito a pressão durante um determinado tempo, que é variável, dependendo do tipo de alimento e a da temperatura de processamento (Téllez-Luiz *et al.*, 2001).

Nos sistemas semicontínuos utilizados para tratar alimentos líquidos não embalados, a pressão é exercida directamente no produto através de um pistão móvel, que é utilizado para aumentar a compressão. Após este processo, o produto é embalado assepticamente (Herrero *et al.*, 2006; Chawla *et al.*, 2011).

2.8.1.2 - Sistemas de pressurização

São três os sistemas de pressurização (Sangronis *et al.*, 1997; Téllez-Luiz *et al.*, 2001):

- Sistema de Pressão Isostática a Frio (PIF) - É uma técnica, inicialmente empregue nas indústrias de metais, cerâmica e plásticos, e que se processa à temperatura ambiente, a pressões na ordem de 50-600 MPa (500-6000 atm), oscilando o tempo de tratamento entre 1-30 minutos. Neste sistema, os materiais em pó são colocados num molde elastómero e submetidos, posteriormente, a altas pressões hidrostáticas. A capacidade da câmara de pressurização pode variar de alguns cm³ a mais de 1 m³. Actualmente, esta técnica é empregue na indústria alimentar.

O processamento de alimentos requer tempos de tratamentos de 5 a 20 minutos com pressões não inferiores a 400 MPa e não superiores a 900 MPa (Téllez-Luiz, *et al.*, 2001).

- Sistema de Pressão isostática a temperatura média - É um processo em que são aplicadas altas pressões combinadas com temperaturas que podem ir de 20 °C a 200°C. Esta tecnologia utiliza-se em situações em que têm lugar reacções químicas durante a pressurização.
- Sistema de Pressão Isostática a Quente (PIQ) - É um processo em que são aplicadas pressões na ordem de 100- 400 MPa (1000- 4000 atm), em combinação com temperaturas de 2200°C, ou mais altas, num período de tempo de 6-12 horas. O meio de pressurização é um gás (hélio, argón) ou ar (Bárboza-Cánovas *et al.*, 1998). Esta técnica é caracterizada por o produto ser uniformemente pressurizado e aquecido, sendo muito utilizada nas indústrias de metais e de cerâmica.

2.8.1.3. Produção e aplicação da pressão

A alta pressão pode ser produzida por métodos distintos: compressão directa, compressão indirecta ou aquecimento do meio de pressurização (Sangronis *et al.*, 1997; Téllez-Luis *et al.*, 2001).

Na compressão directa, a alta pressão é gerada pela pressão do meio através do extremo do pistão (com um diâmetro pequeno), permitindo uma compressão muito rápida. No entanto, existem limitações na câmara de alta pressão, entre o pistão e a superfície interna do vaso, o que restringe o uso deste método a laboratórios.

No método de compressão indirecta, é necessária a aplicação de um intensificador de alta pressão para bombear o meio pressurizante do reservatório, até à câmara de pressurização, alcançando a pressão desejada. Este é o método mais utilizado à escala industrial, baseando-se na expansão do meio de pressurização quando se aplica uma determinada temperatura, originando um aumento da pressão.

No aquecimento do meio de pressurização, uma aplicação de temperatura permite uma expansão do meio de pressurização, produzindo-se um aumento de pressão. Este efeito é vantajoso quando se combinam altas pressões com temperaturas elevadas. No entanto, esta metodologia requer um controlo muito preciso da temperatura dentro do volume da câmara de pressurização (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998).

2.8.2 – Factores que influenciam a eficácia da aplicação de altas pressões hidrostáticas e seus efeitos nos alimentos

A eficácia do tratamento por altas pressões é influenciada por factores intrínsecos e extrínsecos, como a pressão aplicada e a taxa de despressurização, o tempo de tratamento e a temperatura. Além disso, factores como o efeito da pressão na água, o aquecimento adiabático, a dissipação do calor, a composição do alimento e o estado físico dos microrganismos a serem inactivados têm também efeito na produção de alimentos seguros e de qualidade (Rendueles *et al.*, 2011). O processamento de alta pressão compreende uma combinação de três factores (Pressão×Temperatura×Tempo), sendo denominado um sistema tridimensional, em detrimento dos tratamentos térmicos que apenas são função da Temperatura×Tempo (sistema bidimensional).

Actualmente, a aplicação comercial mais utilizada na indústria alimentar compreende uma combinação de pressões entre 400-600 MPa, temperaturas de 5-90°C durante 10-30 minutos (Mozhaev & Col, 1994, citado por Garriga *et al.*, 2002a).

A eficácia da inactivação microbiana, pela aplicação das altas pressões depende de uma série de factores, como:

- Tempo, temperatura de processamento e pressão aplicada;
- Tipo de microrganismos e características das estirpes (dado que as bactérias gram-positivas são mais resistentes do que as bactérias gram-negativas);
- Morfologia da célula bacteriana (os cocos são mais resistentes à pressão do que os bacilos);
- Estádio de crescimento dos microrganismos (os microrganismos na fase estacionária são mais resistentes ao efeito da pressão do que as bactérias que se encontram numa fase exponencial do seu crescimento); (Cheftel & Culioli, 1997; Pereda *et al.*, 2004; Aymerich *et al.*, 2008).
- Matriz alimentar: quanto mais nutritivo é o alimento, maior é a capacidade de sobrevivência dos microrganismos às altas pressões, pelo que, os produtos cárneos transformados, sendo ricos do ponto de vista nutritivo, apresentam um efeito protector. Mas não deve ser aplicada uma pressão superior a 400 MPa na carne, visto que a partir desse valor a textura e a cor são afectadas (Hoover *et al.*, 1989; Cheftel & Culiobi, 1997; Téllez-Luíz, *et al.*, 2001; Lopéz-

Caballero *et al.*, 2002; Garriga *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2002 citado por Torrezan, 2003; Aymerich *et al.*, 2008; Simpson & Gilmour, 1997 citado por Bover-Cid *et al.*, 2011).

- Associação da tecnologia de altas pressões com outros tratamentos físico-químicos (ultravioleta, ionização, radiação) (Demazeau & Rivalain, 2011).

O processamento de altas pressões (a temperaturas baixas ou moderadas) causa a destruição e inativação de células microbianas vegetativas, conservando as características nutricionais (vitaminas e nutrientes dos alimentos) e sensoriais (cor, odor e sabor) dos produtos alimentares, sem a necessidade de recorrer a tratamentos térmicos (Patterson, 1999; Patterson, 2005; Aymerich *et al.*, 2008; Garriga & Aymerich, 2009; Bover-Cid *et al.*, 2010; Yordanov & Angelova, 2010; Demazeau & Rivalain, 2011).

Mediante a aplicação de altas pressões hidrostáticas, as ligações covalentes dos componentes químicos, que têm baixa compressibilidade, mantêm-se inalteradas e não são quebradas, dentro de intervalos de pressão estipulados, verificando-se que a estrutura primária das proteínas, hidratos de carbono e moléculas de baixo peso molecular nos alimentos (responsáveis pela manutenção das características sensoriais e nutricionais) permanecem intactas. A maioria das vitaminas e aminoácidos não é modificada nos alimentos frescos.

As ligações de hidrogénio, responsáveis pela manutenção da estrutura helicoidal das proteínas são fragilizadas pela acção da pressão, como resultado da diminuição do volume (Hoover *et al.*, 1989; Cheftel & Culioli, 1997; Patterson *et al.*, 2006; Rendueles *et al.*, 2011), podendo originar a desnaturação das proteínas, sendo as moléculas de elevado peso molecular sensíveis à pressão, como é o caso das proteínas e hidratos de carbono, resultando em alterações nas suas funções (Hoover *et al.*, 1989; Butz & Tauscher, 2002; Loey *et al.*, 2003; Norton & Sun, 2008).

Como consequência da ruptura das ligações de hidrogénio, responsável pelo enrolamento da cadeia peptídica, a estrutura secundária das proteínas é modificada a pressões de 300-700 MPa (3000-7000 atm) e a estrutura terciária deste composto sofre mudanças acima dos 200 MPa (2000 atm), enquanto a estrutura quaternária é mantida pelas interacções hidrofóbicas entre os componentes, sendo muito sensível à pressão e normalmente dissociada a pressões inferiores a 150 MPa (Hoover *et al.*, 1989; Hendrickx *et al.*, 1998; Murchie *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2007; Yordanov & Angelova, 2010; Ribeiro *et al.*, 2010; Rendueles *et al.*, 2011).

2.8.2.1 - Efeito sobre os microrganismos

A membrana dos microrganismos é composta por uma bicamada, uma externa ou hidrófila (formada por ácidos gordos) e uma interna ou hidrofóbica (formada por glicerol). A pressão

exercida sobre a célula microbiana causa redução do volume, afectando a permeabilidade da membrana e originando danos ou morte celular (Patterson *et al.*, 2006).

A pressão não inibe ou destrói uma função celular específica mas interfere numa combinação de processos, que são reversíveis a baixas pressões (< 200MPa) mas irreversíveis a altas pressões (> 300MPa). Assim, a morte celular resulta de múltiplos danos que ocorrem no interior da célula, como a destabilização estrutural e a integridade funcional da membrana citoplasmática, a desnaturação das proteínas e a inibição de mecanismos genéticos (Hugas *et al.*, 2002; Wells- Bennik *et al.*, 2008).

A membrana celular é o componente da célula mais afectado pelas altas pressões (Hugas *et al.*, 2002; Patterson, 2005; Aymerich *et al.*, 2008). A sua fluidez tem grande importância na inactivação por pressão, verificando-se que, quanto mais rígida é a membrana, maior é a resistência à pressão (Téllez-Luis *et al.*, 2001; Wells- Bennik *et al.*, 2008).

Por outro lado, a tecnologia de altas pressões provoca alterações do funcionamento de enzimas responsáveis pelo crescimento de microrganismos, diferenciando as enzimas na sua capacidade de suportar a pressão (Pereda *et al.*, 2004; Patterson, 2005; Rendueles *et al.*, 2011). O resultado é a estabilização da qualidade do alimento, em especial no que respeita ao sabor e odor.

No entanto, um tratamento de alta pressão nem sempre inactiva completamente os microrganismos presentes no substrato, podendo alterar uma proporção de bactérias, que podem ser recuperadas após o tratamento (Patterson, 2005). A solução é o recurso a agentes antimicrobianos, como ácidos orgânicos, lisozinas, lactoperoxidasas ou bacteriocinas, após o tratamento a alta pressão (Wells-Bennik *et al.*, 2008).

2.8.2.1.1 – Factores intrínsecos relacionados com o alimento que influenciam a eficácia das altas pressões sobre os microrganismos

A barotolerância dos microrganismos presentes num determinado alimento depende do pH, da *a_w* e da presença de outros constituintes (sal e açúcar).

O pH dos alimentos é um dos factores que afecta o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos, considerando que todas as bactérias têm um pH óptimo, favorável ao seu crescimento (Norton & Sun, 2008).

O tratamento por altas pressões é caracterizado por alterar o pH do meio, diminuindo-o, uma vez que favorece a ionização de ácidos orgânicos (agentes inibidores do crescimento microbiano) presentes na forma dissociada (Smelt, 1998; Téllez-Luis *et al.*, 2001; Moerman *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2008; Bover-Cid *et al.*, 2010).

O pH do meio não só garante a inativação da flora microbiana durante o tratamento com altas pressões, como inibe o crescimento das células danificadas pela pressão (Smelt, 1998; Patterson, 2005).

Em geral, verifica-se que um pH ácido aumenta a sensibilidade dos microrganismos às altas pressões. Contudo, há que ter em conta que bolores e leveduras são resistentes a baixo pH e dificilmente são inativados pela pressão a pH <4,0 (Smelt, 1998; Pereda *et al.*, 2004).

Altas pressões combinadas com um baixo pH permitem a diminuição da viabilidade de células pressurizadas de muitos patogénicos, como a *Listeria monocytogenes*. A modificação do pH deve ser determinada para cada processo e para cada tipo de alimento (Ritz *et al.*, 2000; Jofré *et al.*, 2010).

A água no estado líquido é essencial para o crescimento de todos os organismos vivos, verificando-se que aquela que está disponível para o crescimento microbiano é expressa em aw (Norton & Sun, 2008).

A redução da aw tem um efeito baroprotector sobre os microrganismos, ou seja, baixos valores de aw conferem protecção das células microbianas contra a tecnologia de altas pressões (Patterson, 1999; Garriga *et al.*, 2004; Patterson *et al.*, 2006; Aymerich *et al.*, 2008; Yordanov & Angelova, 2010; Demazeau & Rivalain, 2011). Defende-se que uma aw reduzida provoca uma atrofia celular e um espessamento da membrana celular, reduzindo o tamanho da célula com consequente aumento da tolerância (Wells-Bennik, *et al.*, 2008). Assim, valores inferiores a 0,90 conferem um efeito baroprotector independentemente dos solutos (sacarose, glucose ou NaCl) que são utilizados para reduzir a aw do produto (Rendueles *et al.*, 2011).

Hugas *et al.*, (2002); Marcos *et al.*, (2005); Rubio *et al.* (2007a); Ruiz-Capillas *et al.*, (2007); Hayman *et al.* (2008); Porto-Fett *et al.*, (2010); Ananou *et al.*, (2010); e Hereu *et al.*, (2011), nos seus estudos, verificaram o efeito baroprotector da aw dos microrganismos submetidos a altas pressões.

Por outro lado, microrganismos danificados por pressão são geralmente mais sensíveis a baixa aw e a sua recuperação pode ser inibida por esta (Smelt, 1998; Norton & Sun, 2008).

A composição do substrato influencia a resposta dos microrganismos à pressão a que estão sujeitos, adoptando comportamentos distintos em diferentes alimentos (Patterson *et al.*, 2006).

Alimentos ricos em hidratos de carbono, proteínas e lípidos têm um efeito protector na inactivação bacteriana, aumentando a resistência microbiana à pressão (Patterson, 2005; Garriga & Aymerich, 2009; Rendueles *et al.*, 2011).

A carne é um alimento rico do ponto de vista nutritivo, permitindo, assim, o aumento da resistência dos microrganismos quando é aplicada a técnica de altas pressões hidrostáticas

(Hoover *et al.*, 1989; Aymerich *et al.*, 2008). A presença de alguns substratos permite uma recuperação mais rápida de células lesadas por alta pressão (Rendueles *et al.*, 2011).

Molina-Hoppner *et al.* (2001) e Hereu *et al.* (2011) constataram que, para além do teor de gordura, o conteúdo em sal do produto tem um efeito baroprotector, preservando a integridade da membrana celular.

2.8.2.1.2 - Factores relacionadas com os microrganismos

Relativamente ao tipo de microrganismos verifica-se que as bactérias gram-positivas são mais resistentes à pressão em comparação com as bactérias gram-negativas, fungos e leveduras. Os esporos são os mais resistentes pois apenas são inactivados a pressões superiores a 1000 MPa. Os vírus são muito heterogéneos e a sua resistência à pressão varia consideravelmente, sendo os poliovirus os mais resistentes (Garriga *et al.*, 2002a; Garriga *et al.*, 2003; Garriga *et al.*, 2005; Fonberg-Broczel *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2007a; Marcos *et al.*, 2007; Latorre-Moratalla, 2007; Diez *et al.*, 2008; Wells-Bennik *et al.*, 2008; Escriu & Mor-Mur, 2009; Ananou *et al.*, 2010 e Clariana *et al.*, 2011).

A sensibilidade aos agentes externos, como por exemplo as altas pressões, por parte das bactérias gram-negativas pode ser explicada pela complexidade da membrana celular destes organismos, tornando-os mais susceptíveis a mudanças ambientais causadas pela pressão (Murchie *et al.*, 2005; Aymerich *et al.*, 2008). As diferenças na composição química e nas propriedades estruturais da membrana celular dos microrganismos determinam as diferenças na resistência a altas pressões (Rendueles *et al.*, 2011). A pressão, também afecta outros constituintes da célula, como mitocôndrias e o citoplasma (Smelt, 1998).

O tratamento de altas pressões previne o crescimento de *Enterobacteriaceae* (*Salmonella* spp e *Escherichia coli*), dado estas serem gram-negativas (Garriga & Aymerich, 2009).

Os organismos com maior grau de organização e complexidade estrutural são mais sensíveis à acção das altas pressões. Assim, os procariotas são normalmente mais resistentes à pressão que estruturas eucariotas. As leveduras estão entre os organismos mais sensíveis e os esporos entre os mais resistentes (Patterson, 1999).

Os microrganismos psicrótróficos, que crescem a baixas temperaturas e contêm elevados níveis de ácidos gordos polinsaturados, são normalmente mais resistentes à pressão, confirmando que o fluido da membrana, rico em ácidos gordos insaturados, é responsável pela resistência a efeitos letais da tecnologia de altas pressões (Rendueles *et al.*, 2011).

A flora microbiana endógena dos alimentos é, também, mais resistente à pressão do que os microrganismos utilizados como *starters* (Cheftel & Culioli, 1997; López-Caballero, 2002; Hall *et al.*, 2002 citado por Torrezan; 2003).

Quase todos os microrganismos podem crescer até valores de 20-30 MPa. Os que sobrevivem a pressões mais altas (40-50 MPa) são denominados de barófilos, sendo os barófilos incapazes de crescer a pressões de 30-40 MPa, e os que crescem num intervalo 1-50 MPa são euribáticos. Os microrganismos barodúricos sobrevivem a pressões de 50-200 MPa, mas não podem crescer.

As altas pressões produzem danos sub-letais nas células microbianas que após um período de adaptação podem-se recuperar e multiplicar de novo no alimento, o que tem importância na eficácia do tratamento (Pereda *et al.*, 2004; Cheftel & Culioli, 1997).

2.8.2.1.3 - Factores relacionados com o processo tecnológico

Regra geral, maiores temperatura de processamento, tempo e pressão mais elevados, significam maior número de microrganismos inactivados. Normalmente, a inactivação de bactérias por efeito da pressão segue uma cinética de primeira ordem, embora em alguns casos se observem desvios de reacções, transformando-se numa de segunda ordem (Sangronis *et al.*, 1997). Tal depende, sobretudo, da temperatura a que se dá o processo.

A taxa de inactivação microbiana, com o tratamento de altas pressões, realizada à temperatura ambiente, pode ser menor do que no processo que ocorre a temperaturas maiores ou menores que 20°C (Patterson *et al.*, 2006; Rendueles *et al.*, 2011). No entanto, há quem indique que a resistência à pressão dos microrganismos é maior a temperaturas de pressurização de 15°C-30°C, diminuindo significativamente a temperaturas mais baixas ou mais altas (Wells-Bunnitz *et al.*, 2008).

O aumento da inactivação microbiana a temperaturas de refrigeração, ocorre com um decréscimo da resistência à pressão em células vegetativas a baixas temperaturas (<5°C), devido a mudanças na estrutura da membrana plasmática, rupturas das ligações hidrofóbicas e cristalização dos fosfolípidos (Palou *et al.*, 1999; Rendueles *et al.*, 2011). Por outro lado, o emprego de temperaturas muito elevadas (40°C-60°C) aumenta a inactivação de microrganismos patogénicos, mas pode provocar modificações indesejáveis nas propriedades organolépticas dos produtos (Palou *et al.*, 1999; Patterson, 2005).

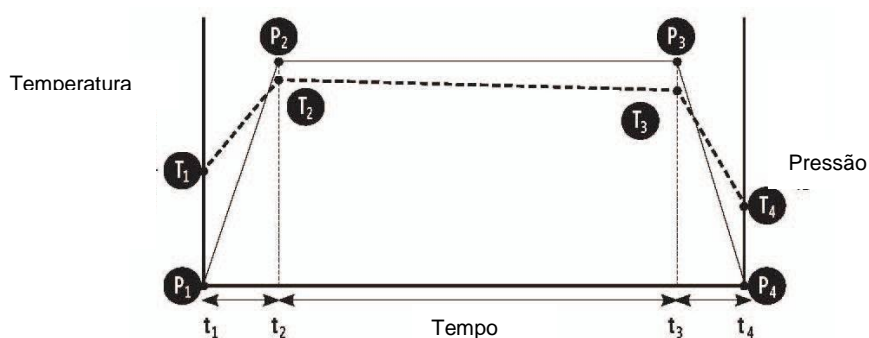
Temperaturas de congelamento (-20°C) em tratamentos com pressões de 100 a 400 MPa, durante 20 minutos aumentam a inactivação microbiana, face a produtos pressurizados a 20°C, confirmando a eficácia da tecnologia de altas pressões na inactivação bacteriana quando as temperaturas são negativas (Palou *et al.*, 1999; Demazeau & Rivalain, 2010).

A nível industrial, é difícil o controlo da temperatura de processamento. Os alimentos são colocados em grandes câmaras, podendo sofrer aquecimento adiabático como consequência da compressão, com aumento de 3°C da água por cada 100 MPa. Por outro

lado, a gordura aumenta 8-9°C e as proteínas e hidratos de carbono um valor intermédio por cada 100 MPa (Balasubramaniam *et al.*, 2008).

De acordo com a Figura 3, é possível observar o efeito da pressão e da temperatura durante o processamento de altas pressões. A temperatura do alimento (T1-T2) aumenta como resultado da compressão física (P1-P2), enquanto, a temperatura do produto (T2-T3) durante a acção da pressão (P2-P3), é independente da taxa de compressão, verificando-se que as trocas de calor entre o produto e o ambiente que o rodeia são insignificantes. Visto tratar-se de um sistema adiabático, o produto retoma, após a descompressão (P3-P4), a temperatura inicial. Mas, na prática, a temperatura final do produto (T4) é ligeiramente inferior à inicial (T1), como resultado das perdas de calor que ocorrem durante a fase de compressão (Balasubramaniam *et al.*, 2008; Yordanov & Angelova, 2010). O que se pretende é que as variações de temperatura sejam minimizadas por meio de trocas térmicas entre a água, o produto alimentar e o equipamento (Cheftel & Culioli, 1997).

Figura 3: Evolução da Temperatura e Pressão durante o processamento de altas pressões (Balasubramaniam *et al.*, 2008; Yordanov & Angelova, 2010; Nguyen & Balasubramaniam, 2011). T1-Temperatura inicial do alimento. T2-Temperatura do alimento após pressurização. T3-Temperatura do alimento após um determinado período de pressurização. T4-Temperatura final do alimento, após descompressão do equipamento. P1-Pressão inicial. P2-Pressão após compressão. P3-Pressão do alimento antes da descompressão. P4-Pressão após despressurização



Para que o processo seja otimizado, os ciclos de pressurização\despressurização devem ser efectuados num curto espaço de tempo (< 10 minutos), uma vez que este se reflecte no rendimento (Nguyen & Balasubramaniam, 2011).

Existe um limite abaixo do qual não há inactivação microbiana pela pressão, verificando-se que a destruição da flora microbiana aumenta com a intensidade da pressão, mas não necessariamente com o aumento do tempo. Assim, para cada microrganismo há um limite de pressão a partir do qual o aumento do tempo de exposição não causa alterações

microbianas. Existe, também, um nível de pressão, para o qual um aumento do tempo de tratamento provoca reduções significativas na contagem microbiana (Palou *et al.*, 1999; Patterson *et al.*, 2006).

Assim, verifica-se que, para alcançar um determinado objectivo de inactivação, é preferível aumentar a intensidade da pressão e reduzir o mais possível o tempo de tratamento (Bover-Cid *et al.*, 2010).

2.8.2.2 - Efeito sobre os componentes dos alimentos

A desnaturação das proteínas pela pressão é um fenómeno complexo que depende da estrutura da proteína, do intervalo de pressão, da temperatura, do pH e da composição do solvente (Marques *et al.*, 2007; Eisenmenger *et al.*, 2009). As estruturas oligoméricas são dissociadas a pressões relativamente baixas (200 MPa), sendo as proteínas rapidamente desnaturadas a pressões compreendidas entre 400-600 MPa (Palou *et al.*, 1999; Jay *et al.*, 2005; Han, 2007).

A baixas pressões, as proteínas são desnaturadas a temperaturas mais reduzidas, enquanto que com altas pressões a desnaturação proteica não aumenta com a temperatura.

A tecnologia de altas pressões permite a activação ou a inactivação enzimática, dependendo das proteínas (Marques *et al.*, 2007; Eisenmenger *et al.*, 2009), podendo a inactivação enzimática ser atribuída a uma alteração na estrutura intermolecular ou a mudanças na conformação da enzima (Palou *et al.*, 1999).

Baixas pressões (100 MPa) permitem a activação de algumas enzimas monoméricas (Hendrickx *et al.*, 1998). Por outro lado, altas pressões induzem, geralmente, a inactivação de enzimas, que pode ser reversível a pressões de 100-300 MPa, dependendo do grau de distorção da molécula. Com pressões superiores a 300 MPa, a reactivação das enzimas diminui, como consequência das alterações moleculares. Deste modo, devido à inactividade das enzimas a pressões elevadas, a tecnologia de altas pressões não é utilizada para aumentar o rendimento dos processos biocatalíticos (Palou *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2008).

Tanto a activação como a inactivação enzimática têm uma forte influência na qualidade dos produtos alimentares (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

O estado físico dos lípidos, juntamente com as proteínas das membranas celulares, desempenha um papel fulcral na actividade das enzimas, havendo evidências de que a pressão tende a diminuir o contacto entre as enzimas associadas e a superfície da membrana, como consequência de mudanças do estado físico dos lípidos que controlam a actividade enzimática (Palou *et al.*, 1999; Regueiro *et al.*, 2008).

2.8.2.3 - Efeito sobre as características sensoriais dos produtos alimentares

Carlez *et al.* (1995) observaram que a cor característica do produto cárneo seco é resistente à tecnologia de altas pressões, o mesmo não acontece com a carne fresca que sofre alterações na cor, como resultado da oxidação da oximioglobina em metamioglobina (Cheftel & Culioli, 1997).

Em produtos cárneos cozidos, não se observa a desnaturação das proteínas por alta pressão, uma vez que estas foram desnaturadas numa fase anterior (Mor-Mur & Yuste, 2003).

Nieto *et al.* (2004), Marcos *et al.* (2005) e Clariana *et al.* (2011) verificaram que as amostras de presunto ibérico curado seco (produto que também faz parte da dieta dos consumidores portugueses) submetidas a pressões de 400 MPa durante 15 minutos, de 200-300 MPa durante 15-30 minutos, ou de 600 MPa durante 6 minutos, apresentaram maior nível de luminosidade e uma diminuição da intensidade da cor em comparação com as amostras controlo.

No entanto, Cava *et al.* (2009) não encontraram diferenças na luminosidade de produtos cárneos fermentados secos submetidos a altas pressões.

O tratamento de altas pressões tem forte influência na textura dos alimentos, uma vez que permite melhorar as propriedades reológicas e funcionais dos produtos em comparação com aqueles submetidos a métodos convencionais, que utilizam o calor como método de conservação (Sangronis *et al.*, 1997).

Nos produtos cárneos, as proteínas miofibrilhares são as responsáveis pelas diferenças nas características de textura após o tratamento sob altas pressões. Por esta tecnologia não gerar forças de corte, a carne não sofre alterações na textura (Garriga & Aymerich, 2009; Yordanov & Angelova, 2010).

O efeito da alta pressão sobre a oxidação lipídica é de extrema importância, uma vez que é a principal causa de deterioração da qualidade de produtos cárneos, sobretudo para os que apresentam uma proporção significativa de ácidos gordos insaturados, afectando o sabor e o valor nutricional dos mesmos (Cheftel & Culioli, 1997). Porém, há que ter em conta que existe uma relação directa entre a oxidação lipídica e os pigmentos dos produtos cárneos, pelo que a oxidação lipídica mais intensa origina um produto com menor estabilidade na cor da carne (Regueiro *et al.*, 2008).

Fuentes *et al.* (2010) e Clariana *et al.* (2011) encontraram forte estabilidade lipídica em amostras de produtos cárneos secos tratadas a 600 MPa. O mesmo sucedeu com Campus *et al.* (2008) ao analisarem amostras tratadas a 300-400 MPa, armazenadas à temperatura de refrigeração durante 45 dias. Nieto *et al.* (2004) não observaram diferenças significativas

nos valores de oxidação lipídica entre amostras tratadas a 400 MPa, durante 15 minutos, e não tratadas.

Cava *et al.* (2009) mostraram que, depois do tratamento do presunto ibérico curado seco com altas pressões (200/300 MPa e 15/30 minutos), a oxidação lipídica das amostras aumentou mas depois de um período de armazenamento, os valores de oxidação lipídica foram similares tanto nas amostras tratadas como nas não tratadas.

Regueiros *et al.* (2008) constataram que a composição de ácidos gordos na carne não sofre alterações pela acção da pressão, não apresentando grande influência sobre a oxidação lipídica.

2.9 - Aplicação de tratamentos combinados

A tecnologia de altas pressões, por si só, poderá não ser um processo suficientemente seguro. Assim, é necessária a aplicação de determinadas condicionantes ao crescimento microbiano, possível através da combinação do método de altas pressões com diferentes processos ou factores antimicrobianos (Patterson, 1999; Garriga & Aymerich, 2009).

A aplicação do método de altas pressões e de obstáculos adicionais (como a utilização de bactérias ácido lácticas ou os compostos produzidos por estas: as bacteriocinas) exercem um papel fundamental na conservação dos enchidos fermentados e secos, uma vez que funcionam como barreiras físico-químicas no controlo de microrganismos patogénicos, assegurando a qualidade destes produtos (Hugas *et al.*, 2002; Jay *et al.*, 2005; Garriga & Aymerich, 2009; Ananou *et al.*, 2010).

As bacteriocinas são polipéptidos ribossomais produzidos pelas bactérias, capazes de matar ou inibir o crescimento de bactérias indesejáveis. Além disso, são péptidos antimicrobianos estáveis ao calor e facilmente degradados por enzimas proteolíticas no trato intestinal dos humanos (Hugas, 1998). Apesar de terem sido testadas várias bacteriocinas, a nisina é a única a ser utilizada como aditivo alimentar (embora não seja aplicada em produtos cárneos) pois é eficaz contra o crescimento de patogénicos gram-positivos, garantindo, assim, a obtenção de produtos estáveis e seguros (Zhu *et al.*, 2005; Aymerich *et al.*, 2008).

Para além das bacteriocinas, outros factores limitativos do crescimento microbiano são um baixo valor de pH, pois aumenta a sensibilidade das bactérias à acção das altas pressões (Pereda *et al.*, 2004; Patterson, 2005; Norton & Sun, 2008); a adição de ácidos carboxílicos para a conservação dos alimentos (Rendueles *et al.*, 2011); e as embalagens activas, que possuem a capacidade de controlar o crescimento de agentes patogénicos em alimentos prontos a consumir, aumentando o tempo de vida útil e melhorando a segurança do alimento ou as propriedades sensoriais do mesmo (Jofré *et al.*, 2008; Aymerich *et al.*, 2008; Garriga & Aymerich, 2009). A combinação da embalagem activa com a tecnologia de alta pressão

pode ser considerada como uma técnica alternativa para o aumento da eficácia dos compostos antimicrobianos, cuja actividade poderá ser reduzida pela interacção com a matriz alimentar (Garriga & Aymerich, 2009).

Por seu lado, a pressurização favorece a ionização dos ácidos orgânicos, que são considerados agentes inibidores do crescimento bacteriano na sua forma não dissociada (Smelt, 1998; Pereda *et al.*, 2004). Diez *et al.* (2008) constataram que a combinação de ácidos orgânicos com a tecnologia de alta pressão inibe a activação microbiana, permitindo a manutenção das características organolépticas dos enchidos fermentados e secos (morcela de Burgos) por um longo período de tempo.

Pode-se, então, concluir que elevados efeitos sinérgicos antimicrobianos são alcançados pela conjugação da tecnologia de alta pressão com o calor, baixo pH, dióxido de carbono, ácidos orgânicos, bacteriocinas como as nisinas, embalagem a vácuo e armazenamento refrigerado (Palou *et al.*, 1999; Garriga & Aymerich, 2009).

2.10 - Aplicação de altas pressões nos produtos cárneos fermentados e secos

A matriz da carne é um substrato rico do ponto de vista nutritivo, sendo constituído principalmente por água, proteína, gordura, oligonutrientes e vitaminas (sobretudo as do grupo B), criando um ambiente favorável para a proliferação de microrganismos de origem alimentar (Hugas *et al.*, 2002).

Os produtos cárneos transformados e secos, prontos para o consumo, podem representar um risco para a saúde humana, uma vez que os agentes patogénicos podem crescer ou simplesmente sobreviver no substrato como resultado de uma possível contaminação cruzada que surge após as etapas de processamento, devido às manipulações a que são sujeitos. Contudo, um tratamento adicional de higiene, após processamento com as altas pressões, é eficaz na destruição deste tipo de microrganismos, garantindo a inocuidade do alimento (Garriga & Aymerich, 2009).

Garriga *et al.* (2004) avaliaram o tratamento de altas pressões (600 MPa, 6 minutos, 31°C) no presunto curado fatiado e embalado a vácuo, observando que este tratamento impediu o crescimento de microrganismos indesejáveis, como as *Enterobacteriaceae* (*Salmonella*) e *Listeria monocytogenes*.

Rubio *et al.* (2007) constataram que a carne curada seca “Cecina de Leon” sujeita a um tratamento de 500 MPa durante 5 minutos a 18°C, mantinha as propriedades sensoriais após a pressurização e durante o período de armazenamento a temperaturas de refrigeração.

Na última situação, observou-se ainda um aumento da dureza e intensidade do odor e do sabor. Campus *et al.* (2008) chegaram à mesma conclusão mas com lombo de porco curado e seco.

Hereu *et al.* (2011) constataram que a aplicação de pressões de 600 MPa durante 5 minutos a 15°C em presunto curado seco garantiu a redução de *Listeria monocytogenes*.

Garriga *et al.* (2003) analisaram o tratamento em produtos de salsicharia fermentados e secos (fuet e chouriço) no início da fase de maturação (300 MPa, durante 10 minutos, a 17°C) e no fim do processo (400 MPa, durante 10 minutos a 17°C), constatando que a tecnologia é mais eficaz no fim da maturação, uma vez que é possível a manutenção de características sensoriais do produto e a inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis, como *Salmonella* spp. Contudo, não é totalmente eficaz no controlo de *Listeria monocytogenes*.

Latore-Moratalla *et al.* (2007) observaram estabilidade na cor destes produtos quando submetidos à pressão de 200 MPa, dado haver destruição de *Enterobacteriaceae* nos produtos de salsicharia após pressurizados.

Ruiz-Capillas *et al.* (2007) verificaram que os níveis de aminas biogénicas (putrescina, cadaverina e tiramina) eram reduzidos no chouriço espanhol fermentado seco, quando submetido à acção da pressão a 350 MPa durante 15 minutos a 20°C.

A tecnologia de altas pressões tem, assim, elevado potencial de aplicação nos produtos cárneos, como método de conservação, sendo utilizada não só para melhoria da higiene do produto, mas também para aumentar a sua durabilidade, minimizando-se alterações nas propriedades sensoriais do mesmo (Garriga & Aymerich, 2009).

3 - Aplicação da tecnologia de alta pressão na conservação de um produto cárneo em Portugal

3.1 - Justificação e objectivos do trabalho

Os produtos cárneos fermentados, largamente consumidos nos países do Mediterrâneo, como Portugal, são fontes de microrganismos patogénicos, representando potenciais perigos para a saúde do consumidor. Está comprovado que é difícil controlar o crescimento de determinados agentes patogénicos, como a *Salmonella* spp, o *St.aureus* e a *Listeria monocytogenes*, que podem estar presentes no ambiente fabril e transmitirem-se aos alimentos processados, sendo causadores de doenças (Feiner, 2006; Fraqueza & Barreto, 2010).

Esta constatação tem levado à investigação de novas tecnologias que permitam eliminar ou pelo menos reduzir significativamente a possibilidade de desenvolvimento nos alimentos de bactérias nocivas à saúde. Entre elas, destaca-se a de altas pressões, uma técnica

promissora e muito atractiva do ponto de vista comercial, uma vez que melhora a segurança microbiológica dos produtos cárneos fermentados, permitindo o aumento da vida útil destes sem alterar as suas características organolépticas (Patterson, 2006; Aymerich *et al.*, 2008; Garriga & Aymerich, 2009; Rendueles *et al.*, 2011).

Este estudo tem como objectivo avaliar a eficácia do método de altas pressões sobre os microrganismos presentes em produtos de salsicharia fermentados e secos, concretamente no chouriço, numa fase intermédia do seu processamento, visando a diminuição dos microrganismos de deterioração e patogénicos de origem alimentar, em função da pressão, temperatura e tempo de processamento, por forma a garantir a melhoria da qualidade higiénico-sanitária destes produtos (Rendueles *et al.*, 2011).

3.2 - Materiais e Métodos

3.2.1 - Primeira experiência: aplicação de alta pressão em chouriço-modelo inoculado com *St xylosus* ATCC8166

3.2.1.1 - Estirpe bacteriana de referência utilizada

No primeiro ensaio de aplicação de alta pressão (HP) utilizou-se a estirpe de *Staphylococcus xylosus* ATCC8166 como iniciadora da fermentação do chouriço. Esta estirpe encontrava-se conservada em criotubos de caldo Brain Heart Infusion (BHI agar, Scharlau Chemie S.A, Barcelona, Espanha) com 1,5% glicerol (Merck, Alemanha), a -80°C. A sua revivificação foi conseguida através do duplo cultivo no meio BHI com um período de incubação de 24 horas a 37°C em aerobiose.

3.2.1.2 - Preparação da suspensão de *Staphylococcus xylosus* ATCC 8166 e inoculação do enchido-modelo

A cultura de *Staphylococcus xylosus* ATCC 8166 foi cultivada a 37°C durante 24-48 horas no meio BHI.

Uma concentração de bactérias foi conseguida mediante a centrifugação do caldo BHI após incubação, a 8000 rotações durante 10 minutos, a uma temperatura de 20°C. Para isso, utilizou-se a centrífugadora Rotina 35 R-Hettich Zentrifugen.

Após esta etapa, foi aproveitado apenas o *pellet* da estirpe de *Staphylococcus xylosus* ATCC 8166, que foi disperso em 100 ml de água potável. Para uma boa homogeneização usou-se o vórtex (Janke & Kunkel, Ika_Labortechnik, VF2).

A água inoculada com *Staphylococcus xylosus* foi utilizada como ingrediente no fabrico dos enchidos-modelo, veiculando na totalidade 10^{11} bactérias/100 ml de água, o que correspondeu a 10^8 ufc por grama de carne na mistura.

3.2.1.3 - Processo de fabrico e condições de altas pressões

Neste ensaio e para o fabrico do enchido-modelo, foi utilizada carne de suíno (entremeada) como matéria-prima principal, adquirida num estabelecimento de venda ao público, num dia de trabalho e originária da mesma peça. As aparas de carne destinadas à produção do enchido-modelo obedeceram à razão carne/gordura de cerca de 70%/30%.

As aparas de carne a utilizar (na proporção de 86,6% do total do preparado) foram primeiro reduzidas a fragmentos de pequenas dimensões, mediante corte manual com facas esterilizadas e adequadas para o efeito. Após a miga, foram adicionados os seguintes ingredientes: sal refinado (1,5%), massa de pimentão (2,0%), massa de alho (0,5%), vinho branco (4,8%) e água potável (4,8%).

A água utilizada no fabrico dos enchidos, inoculada com a estirpe de *Staphylococcus xylosum* ATCC 8166, foi adicionada ao preparado da carne juntamente com os restantes ingredientes, que de seguida foram transferidos para uma cuba misturadora (Hobart, modelo A-200, Inglaterra) para se obter uma massa homogénea.

Depois deste processo, a massa de carne foi colocada à temperatura de refrigeração (2-4°C), onde se deu a maturação por um período de 24 horas. Concluída esta fase, procedeu-se ao enchimento em tripa fresca de porco, devidamente higienizada e preparada para o efeito numa enchedora (Talsa, modelo H 15, E.U.A).

Para descontaminação das tripas utilizou-se um tratamento acidificante com vinagre, limão, laranja e alho, sendo mantidas a 0°C. Após 24 horas, as tripas foram lavadas com água potável fria. Há que ter em conta que a temperatura elevada da água pode levar a um crescimento microbiano excessivo (Fraqueza, & Patarata, 2006).

Prontos os enchidos, procedeu-se à sua embalagem a vácuo, efectuado na embaladora (Tecnotrip, modelo EVT-7, Espanha), em sacos de alta barreira flexível para que pudessem ser submetidos à acção das altas pressões.

Do preparado da carne com a estirpe de *Staphylococcus xylosum* ATCC8166, foram seleccionadas 24 amostras, mas apenas 20 (na forma de enchidos) foram sujeitas ao estudo de altas pressões.

Os produtos de salsicharia fermentados, após serem embalados em sacos de alta barreira, foram submetidos à acção mecânica da pressão isostática, num intervalo de 50-250 MPa, com temperaturas controladas de 1-30°C, durante 30 minutos. Terminada esta etapa, as amostras foram mantidas a temperaturas de congelação (-26°C). Após este processo, foram realizadas análises microbiológicas (contagem de aeróbios totais a 30°C, *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido lácticas, *Staphylococcus* coagulase negativos e *Listeria monocytogenes*) em 20 amostras tratadas, considerando as restantes como controlo.

Para controlar ou inactivar microrganismos de deterioração e patogénicos foram utilizadas pressões inferiores a 250 MPa, que evitam a desnaturação proteica e enzimática.

As determinações analíticas foram realizadas em duplicado, permitindo a confirmação dos resultados obtidos.

Saliente-se que foram analisados, do ponto de vista microbiológico, a carne fresca (n=2), a tripa natural de porco (n=2), o preparado de carne não inoculado sujeito a fermentação espontânea (n=2), e os enchidos fermentados não submetidos à acção das altas pressões (n=2).

3.2.2 - Segunda experiência: aplicação de alta pressão em chouriço-modelo inoculado com *Listeria monocytogenes* 4aCECT934

3.2.2.1 - Estirpe bacteriana de referência utilizada

Neste ensaio, utilizou-se uma estirpe de *Listeria monocytogenes* 4a CECT934, conservada a -80° em BHI (Brain Heart Infusion; Scharlau, Espanha) com glicerol e que foi revivificada através da sua repicagem, com um período de incubação de 24 horas a 37°C em aerobiose.

3.2.2.2 - Preparação da cultura de *Listeria monocytogenes* 4a CECT934 para inoculação

A partir de uma cultura de *Listeria monocytogenes*, após período de incubação de 24 h, foram efectuadas diluições seriadas, com o fim de se obter uma absorbância de 0,200, medida num espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Inglaterra), equivalente a 10⁸ ufc por ml, aferida por contagem em sementeira à superfície em placa de ALOA (Agar Listeria Ottavini Agosti, AES Laboratoire, França), após 24 horas de incubação a 30°C.

3.2.2.3 - Processo de fabrico e condições de altas pressões

O processo de fabrico dos enchidos-modelo nesta segunda experiência foi em quase tudo semelhante ao realizado para o primeiro ensaio, com excepção do momento em que foi feita a inoculação com o agente patogénico *Listeria monocytogenes* 4aCECT934 e das condições a que os produtos de salsicharia fermentados foram submetidos durante o tratamento de altas pressões isostáticas.

Visto tratar-se de um patogénico, a inoculação de *Listeria monocytogenes* 4aCECT934 foi efectuada após o enchimento, directamente na amostra, com as máximas condições de assépsia, sendo o volume de inoculação dependente do peso de cada amostra.

Da suspensão inicial de *Listeria monocytogenes* 4aCECT934 preparada de acordo com o descrito no ponto 3.2.2.2 foi inoculado 1 ml (com cerca de 10^8 bactérias por ml) nas amostras de enchido-modelo, cada uma com um peso médio de 60g: o objectivo foi obter uma contaminação aproximadamente de 10^6 ufc de *Listeria monocytogenes* por grama de produto (enchido modelo).

Prontos os enchidos, procedeu-se à sua embalagem a vácuo em sacos de alta barreira flexível para que pudessem ser submetidos à acção das altas pressões.

Os enchidos-modelo, uma vez inoculados com a estirpe *Listeria monocytogenes* 4a CECT934 e embalados, foram submetidos à pressão isostática de 50-250 MPa, a temperatura fixa controlada de 15°C, durante intervalos de 5 a 60 minutos.

Todas as amostras foram mantidas à temperatura de 4°C durante o processamento e congeladas a -26°C.

Após este procedimento, foram realizadas análises microbiológicas: contagem de aeróbios totais a 30°C, *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido lácticas, *Staphylococcus* coagulase negativos e *Listeria monocytogenes* em 20 amostras tratadas, utilizando como controlo 2 amostras inoculadas sem tratamento.

Neste ensaio, o intervalo de pressão aplicada, bem como as determinações analíticas foram idênticos aos da primeira experiência.

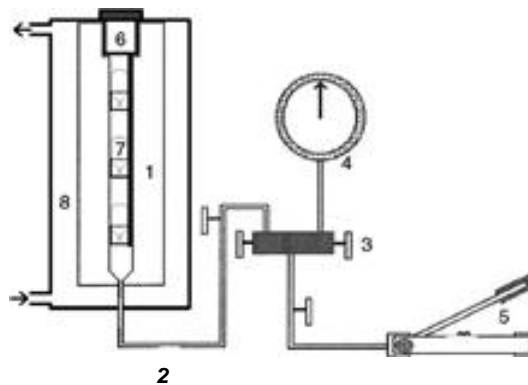
3.2.3 - Equipamento de altas pressões e modo de execução

Ambos os ensaios de alta pressão foram realizados em vaso de alta pressão de aço inoxidável, com capacidade para 300 ml, envolvido por uma manga de termostatização por banho de água circulante (JULABO Hc/ F18) (Figura 4). Antes de cada ensaio, o sistema foi mantido à temperatura de trabalho durante um tempo mínimo de 30 minutos de modo a garantir uma variação de temperatura de termostatização inferior a 0,5°C.

O fluido de pressurização utilizado foi o óleo hidráulico (ENERPAC HF95Y) e a pressão desejada foi alcançada com uma bomba manual de 400 MPa (ENERPAC, modelo P228), controlada por um manómetro (Budenberg Gauge Co limited) (Vila-Real *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010).

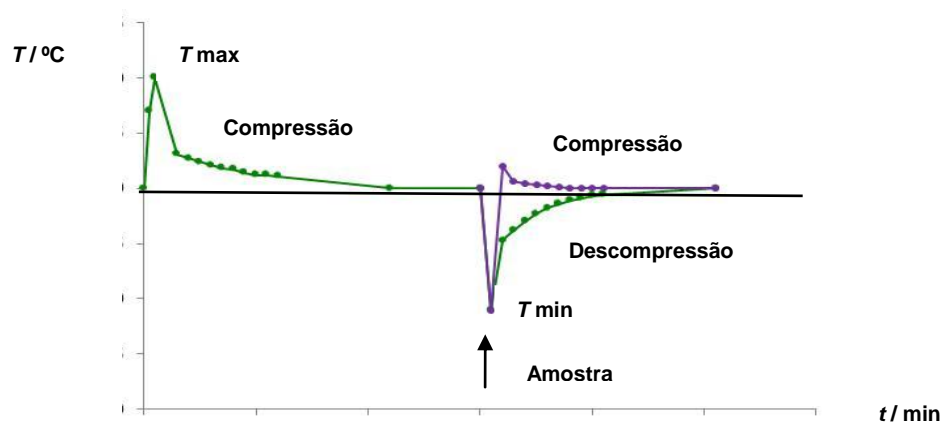
Em cada ensaio, foram colocadas duas amostras em simultâneo no vaso de alta pressão, parcialmente cheio de óleo hidráulico. Após a selagem do vaso, a pressão foi aumentada de forma constante em intervalos de 1-3 minutos até atingir a pressão pretendida (Vila-Real *et al.*, 2007; Pedro *et al.*, 2007).

Figura 4 - Equipamento de Altas Pressões. Vaso (1), Tubo de aço (2), Válvula (3), Manómetro (4), Bomba manual (5), Entrada do vaso (6), Amostras (7), Banho térmico (8) (adaptado de Vila-Real *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2007)



As mudanças de temperatura no interior do equipamento de altas pressões, durante os ciclos de compressão e descompressão podem ser observados na Figura 5. Em todos os binómios pressão \times temperatura testados, as variações de temperatura apresentaram perfis anti-simétricos para a compressão e descompressão (Ver Figura 5 (*)). Deve-se, assim, introduzir a amostra no interior do equipamento de alta pressão imediatamente depois de um ciclo de compressão/descompressão (*), para evitar o sobreaquecimento, o que poderia provocar a desnaturação enzimática.

Figura 5- Perfil de variação de temperatura no interior do vaso de pressão durante um ciclo de pressão e descompressão.



3.2.4 - Análises microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas para a flora tecnológica, patogénica e de deterioração estiveram de acordo com os métodos propostos pelas normas ISO (*International Organization for Standardisation*).

3.2.4.1 - Preparação da amostra para contagem dos microrganismos

Com o recurso a bisturi e pinças, foram recolhidas de forma asséptica 10 g do enchido-modelo, sendo esta colocada num saco estéril (Lab-Blender 400) com filtro e com 90 ml de um soluto diluidor Triptona sal¹ (Scharlau Chemie, Barcelona). Posteriormente, a amostra foi homogeneizada durante 1-3 minutos, num homogeneizador com pás (Stomacher Lab-Blender 400). Após esse período, o conteúdo obtido no saco estéril correspondeu à suspensão mãe (diluição 1:10, isto é 10^{-1}). Foi preparado, então, um conjunto de tubos de ensaio, cada um contendo 9 ml de um soluto diluidor (triptona sal), previamente esterilizado a 121°C durante 15 minutos (ISO 6887-1:1999). No primeiro tubo foi vertido 1 ml da suspensão 10^{-1} e homogeneizado no vortéx (Janke & Kunkel, Ika_labortechnik, Portugal), dando origem à diluição 10^{-2} . O procedimento foi repetido até se obter o número de diluições desejadas (ISO 6887-2:2003).

3.2.4.2 - Contagem de aeróbios totais a 30°C

A partir da série de diluições decimais, semeou-se por incorporação, em placas de petri esterilizadas e identificadas, 1 ml de inóculo das diluições escolhidas. Adicionaram-se depois cerca de 15 ml do meio TGA (Tryptone Glucose Agar, Scharlau Chemie S.A, Barcelona, Espanha), fundido a 121°C e arrefecido em banho-maria (Concessus, S.A) a uma temperatura de $45^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. O inóculo foi homogeneizado no meio de cultura, por movimentos circulares. Após solidificação do meio (+/- 15 minutos), as placas de petri foram incubadas a 30°C durante 48 horas. No final, contaram-se todas as colónias, expressando o resultado em ufc/g de produto, sendo depois convertido em log ufc/g, de acordo com a fórmula expressa na NP 4405:2002.

1 - Triptona Sal: para cada 1000 ml de água, é necessário 1g de triptona e 8,5 g de cloreto de sódio, a um pH 7,0

3.2.4.3 - Contagem de bactérias ácido lácticas

O cultivo de BAL foi conseguido a partir de diluições seriadas em triptona sal e posterior sementeira por superfície de 0,1 ml do inoculo em placas de petri, previamente identificadas, que continham o meio selectivo MRS (Man Rogosa Sharpe Agar, Scharlau Chemie S.A, Barcelona, Espanha), com acetato de tálio e trifeniltetrazólio.

A incubação fez-se a 30°C durante 48 horas em condições de anaerobiose (mediada pela junção de saquetas, Ref 96124, Genbox anaer, bioMérieux S.A, França). No final, contaram-se todas as colónias vermelhas ou rosadas presentes em cada uma das placas de duas diluições sucessivas (ISO 15214:1998), expressando-se o resultado em ufc/g de produto, sendo depois convertido em log ufc/g.

3.2.4.4 - Contagem de *Enterobacteriaceae*

A partir da série de diluições decimais, semeou-se 1 ml de inóculo das diluições escolhidas em placas de petri esterilizadas e identificadas, a cada uma das quais adicionaram-se cerca de 15 ml do meio selectivo VRBD (Violet Red Bile Glucose Agar, Scharlau Chemie S.A, Barcelona, Espanha). Para homogeneização do inóculo no meio de cultura realizaram-se movimentos circulares. Após a solidificação do meio, as placas de petri foram incubadas a 37°C durante 24 horas e no final contaram-se todas colónias características (de coloração vermelho-púrpura com ou sem halo de precipitação) (ISO: 21528-2:2004), expressando-se o resultado em ufc/g de produto, que depois convertido em log ufc/g.

3.2.4.5 - Contagem de *Staphylococcus coagulase negativos*

O cultivo de *Staphylococcus* coagulase negativos foi conseguido a partir de diluições seriadas em triptona sal e posterior sementeira à superfície de 0,1 ml do inóculo em placas petri com o meio selectivo MSA (Manitol Salt Agar, Scharlau, Barcelona, Espanha) com gema de ovo sem telúrito, previamente solidificado após ter sido fundido a 121°C e arrefecido em banho-maria (Concessus, S.A) a uma temperatura de 45^o±2°C.

A incubação, após sementeira, fez-se a 30°C durante 48 horas. No final, contaram-se todas as colónias, expressando-se o resultado em ufc/g de produto, sendo depois convertido em log ufc/g.

Os *Staphylococcus* poderão apresentar colónias amarelas (redução do manitol), enquanto aqueles que não reduzem o manitol apresentam colónias rosas.

3.2.4.6 - Contagem de *Listeria monocytogenes*

A partir das diluições seriadas efectuou-se sementeira por superfície de 0,1 ml de inóculo em placas petri com o meio selectivo ALOA (Agar *Listeria* Ottaviani Agostini, AES laboratoire, França).

Após a incubação a 30°C durante 24 horas, procedeu-se à contagem de colónias características de *Listeria monocytogenes*, de cor azulada e com um halo opaco (ISO 11290-2: 2002), expressando-se o resultado em ufc/g de produto, sendo depois convertido em log ufc/g.

Para confirmação de colónias suspeitas foi efectuada a repicagem de colónias características (azuis com halo opaco) para o meio TSA (Tryptic Soy Agar, Scharlau Chemie S.A, Barcelona, Espanha). Após 24 horas de incubação a 30°C observou-se a cultura na lupa em transiluminação oblíqua a 45° (lei de Henry), verificando-se a suspensão de *Listeria monocytogenes*. Foram efectuados testes bioquímicos convencionais que permitiram confirmar a identidade da *Listeria monocytogenes*, utilizando-se neste caso o sistema padronizado API Listéria (Biomerieux- BM 10300), cumprindo os requisitos do fabricante, de acordo com a ISO 11290-2:1998.

.

3.2.5 - Análises Físico-químicas

3.2.5.1 - Determinação do pH

Antes da medição do pH das amostras, o potenciómetro foi calibrado, utilizando-se duas soluções-tampão de pH conhecido (pH 4 e pH 7). Depois desta fase, o eléctrodo foi lavado com água destilada e introduzido na amostra previamente reduzida e homogeneizada com a picadora (Moulinex La). O homogeneizado resultante foi colocado num frasco de pequenas dimensões e foi efectuada a leitura do pH através de um potenciómetro (Hanna Instruments, Woonsocket, USA).

Uma vez obtido um valor constante de pH, o resultado foi lido directamente no visor do aparelho com uma aproximação de 0,01 unidades. No fim, lavou-se o eléctrodo com água destilada, colocando umas gotas da solução de cloreto de potássio na tampa para o proteger do ambiente envolvente (NP 3441:2008).

O resultado final resultou da medição em triplicado tendo sido efectuado a partir dos valores obtidos em média.

3.2.5.2 – Determinação da actividade da água (aw)

O equipamento utilizado para medição da aw foi o Rotronic Hygroskop DT (Nova York, USA). O aparelho foi previamente calibrado com uma ampola de calibração 0,5% de HR (Rotronic, EA00-SCS) e depois com uma ampola a 80% (Rotronic, EA80-SCS), confirmando-se, posteriormente, com uma ampola a 50% (Rotronic, EA50-SCS) de HR. Quando o higrómetro atingiu a temperatura estável de $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, foi colocada a amostra homogeneizada no copo de poliestireno (PS14), aguardando-se que a leitura estabilizasse. Procedeu-se então, à leitura da HR e da temperatura, para obter o valor correspondente da aw do produto, pois esta está relacionada com a HR ($H.R = aw \times 100$) (Benezet *et al.*, 2010).

3.2.6 – Design experimental e análise estatística dos resultados

Neste estudo foi aplicada a metodologia das superfícies de resposta (RSM-*Response Surface Design*), com o fim de qualificar a redução da flora microbiana deteriorativa e patogénica dos enchidos-modelo fermentados em função de determinadas variáveis independentes testadas: pressão, temperatura e tempo. Isso é possível, uma vez que a metodologia RSM permite testar, simultaneamente, vários parâmetros e com um número mínimo de ensaios, de acordo com o *design* experimental adoptado.

O RSM consiste num conjunto de métodos matemáticos e estatísticos que avalia a interacção entre um grupo de factores experimentais controlados e a sua relação com a resposta obtida. É uma abordagem não convencional que tem sido utilizada com sucesso na optimização de vários processos como a fermentação, as reacções enzimáticas e a conservação dos alimentos (Marques *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010). A aplicação desta metodologia permite diminuir significativamente o número de ensaios experimentais e de amostras testadas, reduzindo custos e tempo de execução, mantendo no entanto a significância estatística dos resultados obtidos nos intervalos de magnitude das variáveis independentes testadas.

O conjunto de respostas são ajustadas a uma equação polinomial $y = f(x_1, x_2, \dots, x_p) + \varepsilon$, onde y representa o número da amostra, x_i cada variável independente testada e ε o erro observado. Normalmente, a resposta é modelada por um polinómio de primeira ou segunda ordem, representando uma resposta bidimensional ($p+1$), a superfície de resposta. Os coeficientes destas equações são, em regra, desconhecidos e, sendo assim, são estimados a partir dos dados experimentais, recorrendo a métodos estatísticos. Nas equações de segunda ordem, os coeficientes dos termos quadráticos determinam a curvatura da superfície de resposta tridimensional.

Os resultados foram analisados através da utilização do software “ StatisticaTM”, versão 6, a partir de Statsoft, E.U.A.

Foram, assim, calculados os efeitos lineares e quadráticos de cada variável independente, assim como as suas possíveis interacções na flora microbiana dos enchidos-modelo fermentados. A significância destes valores foi avaliada por análise de variância. Para cada efeito calcularam-se, como medida de significância, os valores de p, que devem ser inferiores a 0,05, para impedir a rejeição de factores determinantes.

A partir dos resultados obtidos foram elaboradas representações bi e tridimensionais de superfície, ilustrando visualmente o efeito dessas variáveis de resposta. A qualidade do ajuste dos modelos aos resultados experimentais foi determinada por análise conjunta do coeficiente de correlação quadrático (R^2) e do coeficiente de correlação quadrático ajustado (R^2_{Adj}). Ambos medem a variação da variável dependente (contagem microbiana) que é explicada pelas variáveis independentes (pressão, temperatura e tempo). Quanto maior o valor de R^2 maior é a precisão da resposta prevista pelo modelo. O R^2 deve ser igual ou superior a 0,75.

O R^2 é afectado pela dimensão da amostra e pelo número de variáveis independentes (duas em cada ensaio - pressão e temperatura no primeiro e, pressão e tempo, no segundo). O R^2_{adj} corrige o valor de R^2 , pelo que se opta normalmente pelo primeiro destes coeficientes. Quanto maior o valor de R^2_{adj} melhor é o ajuste da resposta prevista pelo modelo. Neste trabalho considerou-se que um R^2_{adj} mínimo de 0,75 traduz um ajuste aceitável.

4 - Apresentação dos resultados

4.1 - Caracterização microbiológica das matérias-primas utilizadas no fabrico do enchido-modelo

A carne, matéria-prima inicial (aparas de carne e gordura) utilizada para o fabrico dos enchidos-modelo, apresentou valores na ordem dos 7,25 log ufc/g de microrganismos aeróbios totais a 30°C (Tabela 6). Estes teores encontraram-se superiores aos estipulados no Regulamento CE nº 1441/2007, eventualmente por ter sido adquirida num estabelecimento de venda directa ao público, e não num matadouro e, assim, sujeita a manipulações acrescidas com maior risco de contaminação bacteriana e quebras de refrigeração.

Tanto a flora tecnológica (BAL e SCN) como as *Enterobacteriaceae* registaram valores máximos aceitáveis do ponto de vista microbiológico de acordo com resultados obtidos em trabalhos apresentados por Garriga & Aymerich (2007) e Feiner (2006).

A tripa natural de porco, dada a sua origem e modo de preparação, tem uma carga bacteriana elevada. Glenat (1969) encontrou na tripa fresca níveis de contaminação de *Enterobacteriaceae* de $6,4 \times 10^4$ ufc/g, valores superiores aos determinados neste estudo. Os valores de BAL e microrganismos aeróbios totais a 30°C na tripa fresca de suíno (Tabela 6) utilizada no fabrico dos enchidos-modelo foram inferiores aos obtidos por Glenat (1969) citado por Fraqueza (1992).

Tabela 6 - Matérias-primas: Média e desvio-padrão para resultados de análises microbiológicas (log ufc/g)

Parâmetros microbiológicos analisados	Carne (n=2) Média±D.Padrão	Tripa (n=2) Média ± D.Padrão
BAL (log ufc/g)	5,69 ±0,06	5,08 ±0,21
SCN (log ufc/g)	5,07 ±0,12	5,52 ±0,16
<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/g)	4,36 ±0,19	3,36 ±0,03
A.T a 30°C (log ufc/g)	7,25 ±0,17	7,74 ±0,12

4.2 - Efeito da aplicação de alta pressão e da temperatura de processamento em enchidos-modelo inoculado com *St xylosus* ATCC8166 (primeiro ensaio)

Na Tabela 7 apresentam-se as cargas microbianas do preparado de carne após 24 horas de maturação e dos enchidos-modelo inoculados com *St.xylosus* ATCC8166 sem e com tratamento de pressurização, utilizando neste último caso como variáveis a pressão e a temperatura de processamento. Os valores de pressão e temperatura testados correspondem aos valores previstos pelo modelo estatístico adoptado (Ver 3.2.6) de acordo com os intervalos de magnitude das variáveis independentes testadas (Ver 3.2.2.3).

Comparando os valores de *Enterobacteriaceae* e das BAL do preparado da carne após 24 horas de maturação, e antes do enchimento ($4,92 \pm 0,78$ log ufc/g e $5,70 \pm 0,07$ log ufc/g, respectivamente) e dos enchidos-modelo não submetidos à acção da alta pressão hidrostática ($4,06 \pm 0,56$ para as *Enterobacteriaceae* e $5,61 \pm 0,23$ para as BAL) verificou-se que não houve variações significativas ($p > 0,05$), concluindo-se que a fase de enchimento não teve um efeito negativo sobre a contaminação do chouriço-modelo.

O aumento significativo ($p < 0,05$) das contagens de SCN (na ordem dos 2 log ufc/g) nos enchidos-modelo inoculados com *Staphylococcus xylosus* ATCC8166, quando comparados com o preparado de carne inoculado, reflecte o facto desta estirpe ter sido utilizada como *starter* e introduzida momentos antes da maturação de 24 horas.

Tabela 7 - Caracterização microbiológica do enchido-modelo antes e após inoculação com *St.xylosus* ATCC8166 e submetidos a pressões isostáticas (50-250 MPa) a temperatura controlada (1-30°C) durante 30 minutos (Média e desvio-padrão)

Amostra	P/MPa	T/°C	SCN Log(ufc/g)	BAL Log(ufc/g)	Ent. Log(ufc/g)	A.T a 30°C Log(ufc/g)	L. <i>monocytogens</i> Log(ufc/g)
Prep. antes Enchimentoa (n=2) a)	1	4,0**	6,4 ±0,72	5,7±0,07	4,9±0,78	8,2±0,75	<1
Enchido-modelo- c b) (n=2)	1	4,0**	8,3±0,56	5,6±0,23	4,1±0,56	7,9±0,04	<1
Enchido-modelo sujeito a altas pressões (n=2)	67	15,0	7,7±0,17	5,5±0,00	3,5±0,22	7,7±0,07	<1
	91	6,0	7,7±0,23	5,8±0,11	3,6±0,07	7,7±0,09	<1
	91	24,0	7,5±0,07	5,5±0,43	3,4±0,10	7,7±0,03	<1
	150	2,3	7,6±0,02	5,5±0,21	1,28	7,7±0,04	<1
	150	15,0	7,4±0,10	5,6±0,17	2,6±0,48	7,7±0,07	<1
	150	15,0	7,4±0,03	5,9±0,00	2,7±0,38	7,8±0,01	<1
	150	27,7	7,4±0,05	5,8±0,10	2,5±0,32	7,7±0,05	<1
	209	6,0	7,5±0,11	5,5±0,09	0,93	7,6±0,15	<1
	209	24,0	7,1±0,04	5,4±0,10	0,90	7,5±0,04	<1
	233	15,0	7,2±0,10	5,7±0,04	0,82	7,5±0,04	<1

a)Prep. antes enchimento- Preparado de carne inoculado após período de maturação de 24 horas;

b)Enchido-modelo-c - Enchido-modelo inoculado com *St.xylosus* ATCC8166, não pressurizado;

** Temperatura de refrigeração

Comparando os valores de contagens microbiológicas das amostras não submetidas a tratamento, com as amostras submetidas, verificou-se que a população de BAL e de microrganismos aeróbios totais a 30°C não sofreram variações estatisticamente significativas ($p>0,05$) para qualquer binómio pressão x temperatura testado. Por sua vez, para os SCN e a população das *Enterobacteriaceae* observou-se uma redução significativa ($p<0,05$) para pressões superiores a 150 MPa, no entanto, enquanto essa redução para as *Enterobacteriaceae* chega a ser superior a 3,5 log para as pressões mais elevadas, para os SCN nunca é superior a 1,2 log.

Os dados obtidos para os diferentes ensaios realizados foram então analisados de acordo com a metodologia estatística RSM e na Tabela 8 apresentam-se os efeitos (coeficientes de regressão - termos lineares e quadráticos) e os respectivos níveis de significância (p) da Temperatura (T), da pressão (P) e da interação pressão x temperatura, relativamente à contagem microbiana dos enchidos-modelo inoculados com *St. xylosum* ATCC8166 (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeitos da pressão e da temperatura de processamento na flora microbiana dos enchidos-modelo fermentados e inoculados com *Staphylococcus xylosum* ATCC8166, mediante a análise dos níveis de significância correspondentes (p) e dos valores dos coeficientes (R^2 e R^2_{adj}).

Factor	Contagem microbiana dos enchidos-modelo inoculados com <i>St.xylosum</i> ATCC8166							
	SCN		BAL		Ent.		A.T a 30°C	
		(p)		(p)		(p)		(p)
Temperatura (termo linear)	-0,0125	0,0217*	0	0,9441	0,0484	0,6022	0,0073	0,2398
Temperatura (termo quadrático)	0,0004	0,4151	0	0,5774	-0,0017	0,1682	-0,0002	0,4813
Pressão (termo linear)	-0,0004	0,0039**	0	0,7818	-0,0008	0,0001***	0,0004	0,0174*
Pressão (termo quadrático)	5,9552	0,6196	0	0,3299	-2,7146	0,3082	-1,7382	0,0673
Pressão x Temperatura	-8,1262	0,3514	0	0,7829	3,6817	0,8312	-2,0716	0,6914
R^2	0,8601		0,0694		0,9644		0,7317	
R^2_{Adj}	0,7001		0		0,9208		0,4552	

*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Da análise da Tabela 8, constatou-se que o termo linear da pressão apresentou um nível de significância baixo na contagem de SCN, *Enterobacteriaceae* e microrganismos aeróbios totais a 30°C, respectivamente, p<0,01, p<0,001 e p<0,05, enquanto que o termo linear da temperatura foi significativo na contagem de SCN (p<0,05).

Por seu lado, os valores de R^2 expressos na Tabela 8 para as *Enterobacteriaceae* (ambos superiores a 0,90), indicam um muito bom ajuste dos modelos aos resultados experimentais. O valor de R^2_{adj} igual a 0,9209 indica que 92,1% das variações podem ser explicadas pelo modelo ajustado.

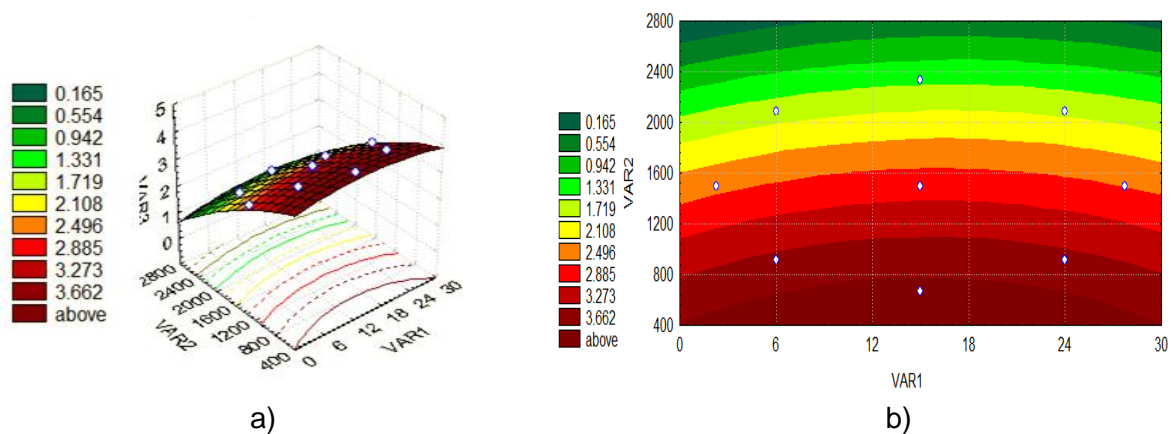
Relativamente às BAL, não foi possível ajustar os resultados experimentais ao modelo, uma vez que o R^2_{adj} foi nulo.

Para o ajuste do modelo polinomial quadrático e obtenção dos múltiplos coeficientes de regressão necessários para reduzir a carga microbiana foi utilizada o método dos mínimos quadrados.

Considerando o conjunto de resultados estatísticos obtidos, verificou-se que a temperatura de processamento não influenciou significativamente os resultados, enquanto que a pressão demonstrou ser eficaz na diminuição da carga microbiana das *Enterobacteriaceae*.

Face aos resultados obtidos, mostrou-se a relação entre a resposta e as variáveis independentes nas representações de superfície de resposta para as *Enterobacteriaceae*. A relação entre variáveis dependentes e independentes é ilustrada pelas Figuras 6 a e 6 b, respectivamente de representação tridimensional (por uma superfície convexa) e representação bidimensional.

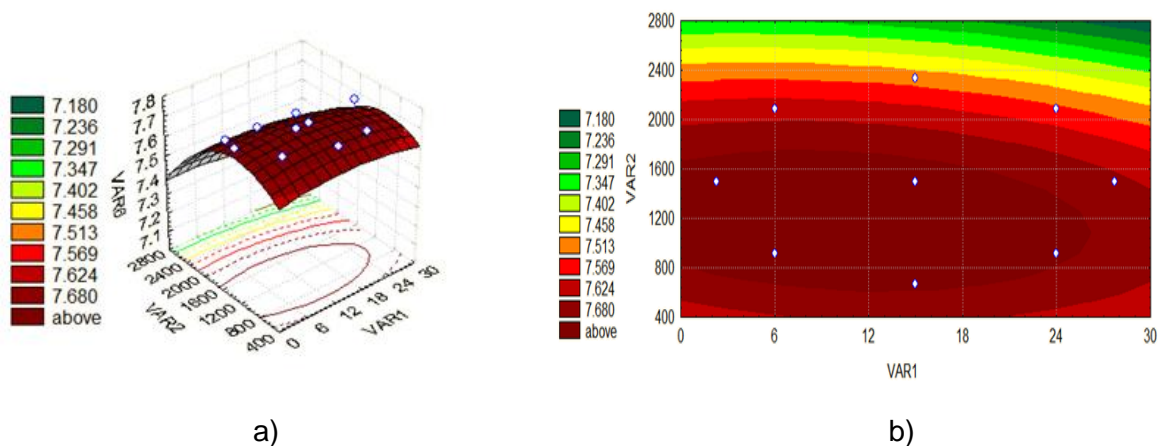
Figura 6 - Análise de superfície de resposta no impacto binomial da temperatura (VAR1) e da pressão (VAR2) sobre a população de *Enterobacteriaceae* (VAR3) dos enchidos-modelo inoculados com *St.xylosus* ATCC8166



Os restantes microrganismos, tais como os A.T a 30°C, não sofreram variabilidade com as variáveis em estudo (pressão e temperatura de processamento). A título ilustrativo, na Figura 7 (a e b) mostram-se as superfícies de resposta obtidas.

Como se verificou que a temperatura de processamento não teve qualquer influência na redução da contagem microbiana, optou-se por se realizar um segundo ensaio utilizando como variáveis apenas a pressão e o tempo.

Figura 7 - Análise de superfície de resposta no impacto binomial da temperatura (VAR1) e da pressão (VAR2) sobre a população de AT a 30°C (VAR6) dos enchidos-modelo inoculados com *St.xylosus* ATCC8166



4.3 - Aplicação de alta pressão em chouriço-modelo inoculado com *Listeria monocytogenes* 4 aCECT934 (segundo ensaio)

Na sequência dos resultados obtidos com o ensaio anterior (Ponto 4.2 deste trabalho) e no qual se verificou que a temperatura de processamento não influenciou significativamente os resultados, optou-se, no 2º ensaio, por estudar o efeito simultâneo do binómio pressão x tempo de processamento na flora microbiana dos chouriços-modelo.

Na Tabela 9 estão apresentadas as cargas microbianas do preparado de carne após maturação de 24 horas e dos enchidos-modelo inoculados com *L. monocytogenes* 4aCECT934 sem e com tratamento de pressurização. Os valores de pressão e tempo testados correspondem aos valores previstos pelo modelo estatístico adoptado (3.2.6), de acordo com os intervalos de magnitude das variáveis independentes consideradas (3.2.2.3). Comparando os valores de cargas microbianas dos preparados antes do enchimento entre os dois ensaios (Tabelas 7 e 9), verificou-se que ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da carga microbiana de todos os microrganismos testados, com excepção das BAL.

Contudo, como consequência da inoculação do agente patogénico *Listeria monocytogenes* 4aCECT934, após a fase de enchimento, directamente nos enchidos-modelo, observou-se uma contagem de $6,33 \pm 0,64$ log ufc/g deste microrganismo nos enchidos-modelo inoculados e não pressurizados.

Tabela 9: Caracterização microbiológica do enchido-modelo antes e após inoculação com *Listeria monocytogenes* 4aCECT934 e submetido a pressões isostáticas (50-250 MPa), a temperatura fixa de 15°C, durante intervalos de tempo de 5 a 60 minutos (média e desvio-padrão)

Amostra	P/MPa	t/min	SCN Log(ufc/g)	BAL Log(ufc/g)	Ent. Log(ufc/g)	A.T a 30°C Log(ufc/g)	L. <i>monocytogenes</i> Log(ufc/g)
Prep. antes Enchimento * (n=2) a)	1	0	4,47±0,04	6,03±0,02	4,50±0,63	7,74±0,02	<1
Enchido- modelo- c * (n=2)b)	1	0	4,30±0,28	6,40±0,12	4,00±0,58	7,25±0,52	6,33±0,64
Enchido- modelo sujeito a altas pressões (n=2)	67	30	4,59±0,28	6,40±0,04	4,00±0,06	6,89±0,06	6,18±0,06
	91	12	4,65±0,19	6,48±0,45	3,61±0,14	7,02±0,06	5,96±0,39
	91	48	4,64±0,47	6,33±0,23	4,22±0,15	6,80±0,28	5,81±0,10
	150	4,5	4,82±0,11	6,44±0,02	3,74±0,04	6,94±0,28	5,83±0,13
	150	30	4,60±0,24	6,28±0,06	2,82±0,81	6,72±0,17	6,01±0,24
	150	30	4,41±0,29	6,13±0,39	2,18±0,32	6,51±0,07	5,31±0,39
	150	55,5	4,67±0,15	6,32±0,12	2,59±0,09	7,20±0,70	6,07±0,16
	209	12	4,39±0,07	6,05±0,05	<1	7,04±0,65	5,78±0,02
	209	48	4,24±0,21	5,63±0,13	<1	6,90±0,79	5,63±0,11
233	30	4,25±0,32	5,58±0,15	<1	6,91±0,95	5,59±0,01	

a)Prep. antes enchimento- Preparado de carne não inoculado após período de maturação de 24 horas;

b)Enchido-modelo-c - Enchido-modelo inoculado com *Listeria monocytogenes* 4aCECT934, não pressurizado

Relativamente às amostras pressurizadas, a Tabela 9 mostra que, matendo a temperatura de processamento fixa a 15°C, a contagem de SCN não sofreu alterações significativas, apresentando reduções inferiores a 1 log ufc/g com o aumento da pressão. As BAL já sofreram reduções significativas ($p < 0,05$) na carga microbiana para pressões superiores a 200 MPa e tempo de actuação superior a 30 minutos; no entanto, esse decréscimo é inferior a 1 log ufc/g. Os microrganismos aeróbios totais a 30°C não apresentaram reduções significativas ($p > 0,05$), com o aumento da pressão aplicada nos enchidos-modelo.

Já com a temperatura de pressurização a 15°C, as *Enterobacteriaceae*, à semelhança do ensaio antecedente, são sensíveis ao tratamento de altas pressões nos enchidos inoculados

com *Listeria monocytogenes* 4aCECT934, diminuindo a sua contagem cerca de 4 logaritmos com o aumento da pressão (valores inferiores a 10 ufc/g, a pressões superiores a 200 MPa). Verifica-se, também, que o tempo de actuação influencia a redução microbiana.

A contagem de *Listeria monocytogenes* dos enchidos-modelo inoculados com este patogénico foi pouco influenciada pelo aumento da pressão aplicada. Com contagens de $6,18 \pm 0,06$, a pressões de 67 MPa e $5,59 \pm 0,01$ a pressões de 233 MPa, verificou-se que o tempo teve influência na redução deste microrganismo. Por fim, a contagem de *Listeria monocytogenes* dos enchidos-modelo inoculados com este patogénico foi pouco influenciada pelo aumento da pressão aplicada, com contagens de $5,59 \pm 0,01$ no binómio 233 MPa x 30 min.

Os dados obtidos para os diferentes ensaios realizados foram analisados de acordo com a metodologia estatística RSM e na Tabela 10 apresentam-se os efeitos (coeficientes de regressão – termos lineares e quadráticos) e os respectivos níveis de significância (p) do tempo (t), da pressão (P) e da interacção pressãoxtempo, relativamente à contagem microbiana dos enchidos-modelo inoculados com *Listeria monocytogenes* 4aCECT934.

Tabela 10 - Efeitos da pressão e do tempo na flora microbiana dos enchidos-modelo fermentados e inoculados com *Listeria monocytogenes* 4a CECT934, mediante a análise dos níveis de significância correspondentes (p) e dos valores dos coeficientes (R^2 e R^2_{adj})

Factor	Contagem microbiana dos enchidos-modelo inoculados com <i>L.monocytogenes</i> 4a CECT934									
	SCN		BAL		Ent.		L. monocytogenes		A.T a 30°C	
		(p)		(p)		(p)		(p)		(p)
t (linear)	-0,0101	0,3971	-0,0141	0,0296*	-0,0020	0,6263	-0,0209	0,9798	-0,0519	0,4221
t (Quad)	0,0003	0,0894	0,0003	0,0929	0,0003	0,7688	0,0003	0,4030	0,0008	0,0101*
P (linear)	0,0004	0,0059 **	0,0006	0,003** *	0,0019	0,0009 ***	-0,0008	0,1370	-0,0017	0,0540
P (Quad)	-1,6937	0,2029	-3,2629	0,0347*	-1,4434	0,1453	1,6882	0,6085	6,2831	0,0249*
P x t	- 0,000005	0,3379	-4,2373	0,3780	-0,00001	0,6751	1,9068	0,8794	2,5424	0,7537
R^2	0,7493		0,9157		0,8339		0,2017		0,7175	
R^2_{Adj}	0,5347		0,8351		0,6829		0		0,4818	

*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Na Tabela 10 estão apresentados os efeitos dos respectivos níveis de significância (p) do tempo (t) e da pressão (P) e da interacção pressãoxtempo, relativamente à contagem microbiana dos enchidos-modelo inoculados com *Listeria monocytogenes* 4aCECT934.

De acordo com os resultados estatísticos obtidos, verificou-se que, na análise bidimensional, a pressão influencia significativamente as contagens de SCN e de *Enterobacteriaceae* (respectivamente $p < 0,01$ e $p < 0,001$), o mesmo sucedendo para as BAL ($p < 0,001$). Este microrganismo apresentou também um termo quadrático da pressão de reduzida significância ($p < 0,05$) e um termo linear para o tempo inferior a $p < 0,05$. Estes resultados indicaram que quer o tempo quer a pressão aplicada induziram variações significativas na flora microbiana.

Também os valores altos de R^2 e de R^2_{adj} para as BAL (respectivamente 0,916 e 0,835) mostraram uma elevada correlação entre os resultados experimentais e teóricos previstos pelo modelo. No entanto, estes dados, apesar de em termos estatísticos serem efectivamente significativos, não se traduzem numa diminuição acentuada na população de BAL, o que reflecte a resistência destes microrganismos às pressões aplicadas. Este facto é tecnologicamente favorável.

No caso das *Enterobacteriaceae*, o valor de R^2_{adj} é inferior a 0,75, que é considerado ser o mínimo em termos de qualidade do ajuste. No entanto, é preciso ter em conta que o decréscimo do valor se deve ao facto de, nos ensaios a pressões superiores a 200 MPa, se ter obtido sempre a mesma resposta (< 1 log ufc/g), o que condicionou o resultado estatístico.

Como se verificou neste ensaio, para além da pressão aplicada nos enchidos-modelo, também o tempo de actuação influenciou a redução na contagem microbiana.

A relação entre variáveis dependentes e independentes surge na representação tridimensional como uma superfície convexa (Figura 8 a).

Na Figura 8, as contagens das *Enterobacteriaceae* nos enchidos-modelo atingem um valor mínimo com pressões superiores a 200 MPa, independentemente do tempo de processamento, o que confirma a susceptibilidade das *Enterobacteriaceae* à pressurização.

A *Listeria monocytogenes* 4aCECT934 foi o agente patogénico utilizado para o estudo do impacto binomial (Pressão x tempo), tendo-se verificado, tal como é visível na Figura 9, uma ligeira redução da carga microbiana com o aumento da pressão aplicada nos enchidos-modelo.

Através da análise da Figura 9, constata-se que o tempo de actuação também teve influência na redução do agente patogénico.

Figura 8 - Análise de superfície de resposta no impacto binomial da pressão (VAR1) e do tempo (VAR2) sobre a população de *Enterobacteriaceae* (VAR3) dos enchidos-modelo inoculados com *L.monocytogenes* 4aCECT934

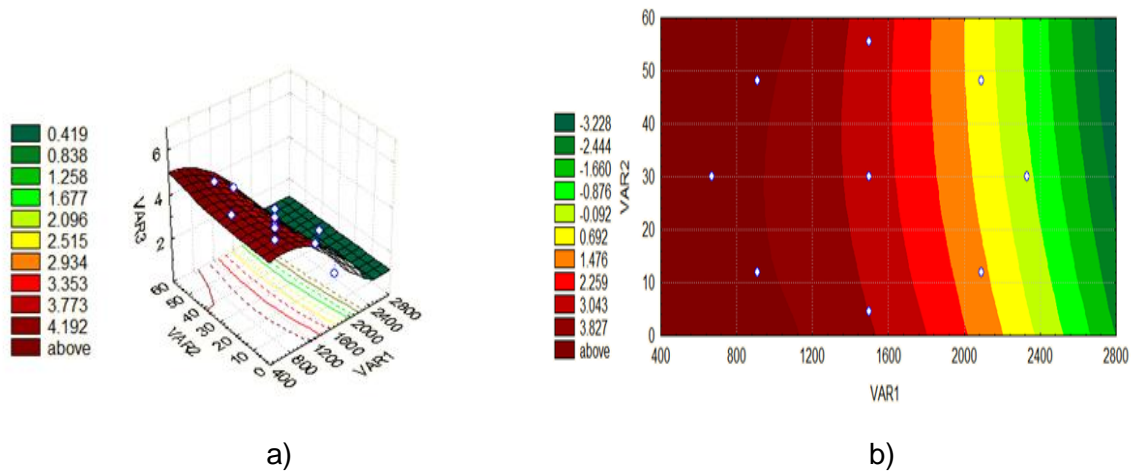
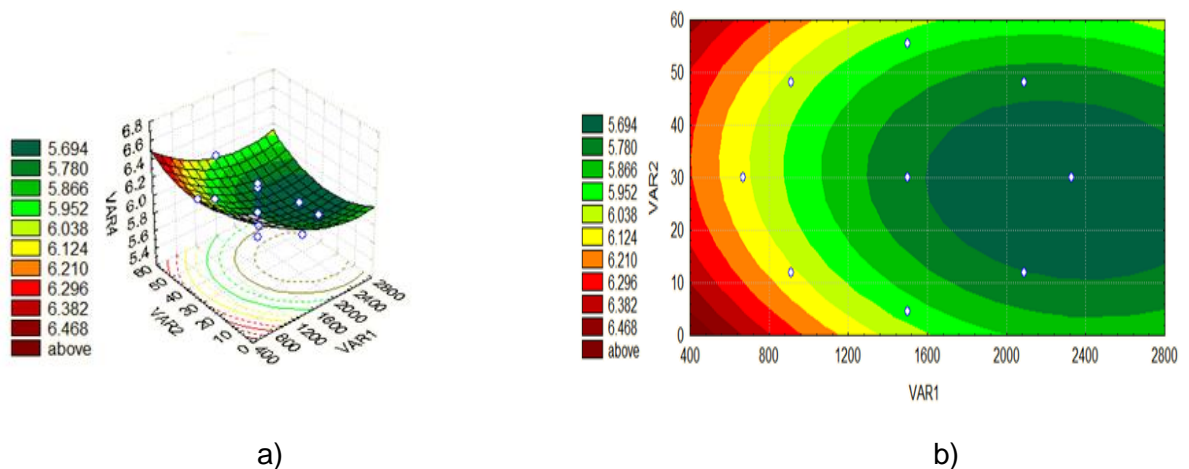
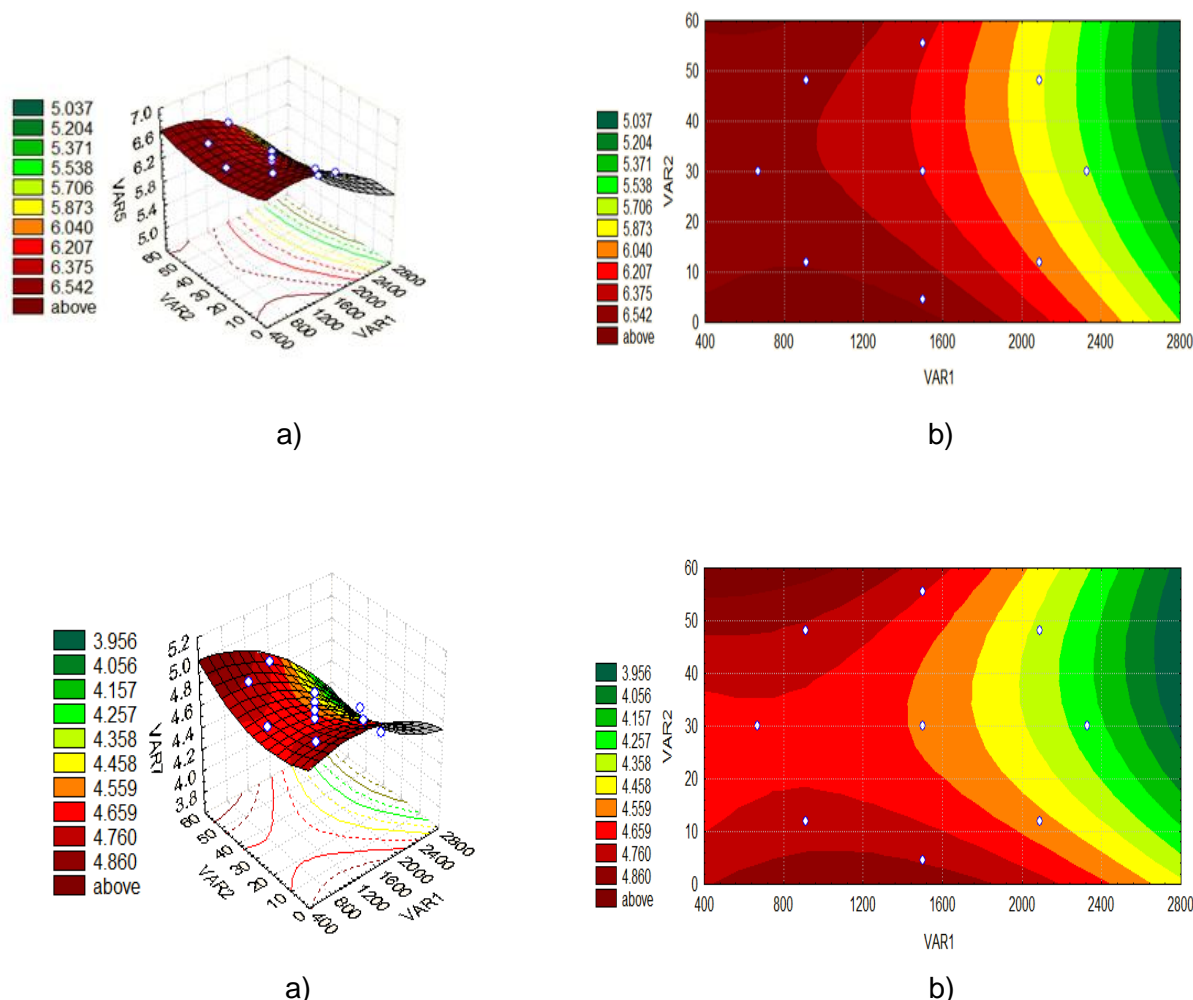


Figura 9 - Análise de superfície de resposta no impacto binomial da pressão (VAR1) e do tempo (VAR2) sobre a população de *Listeria monocytogenes* (VAR4) dos enchidos-modelo inoculados com *L. monocytogenes* 4aCECT934



A Figura 10 vem ilustrar que a flora tecnológica dos enchidos-modelo (BAL e SCN) diminui pouco com o aumento da pressão, contudo o tempo de actuação influencia a carga microbiana. Assim, a variável tempo tem efeito na redução da contagem microbiana, sobretudo das BAL.

Figura 10 - Análise de superfície de resposta no impacto binomial da pressão (VAR1) e do tempo (VAR2) sobre a flora tecnológica, BAL e SCN (VAR5 e VAR7), respectivamente, dos enchidos-modelo inoculados com *L.monocytogenes* 4aCECT934



4.4. - Influência das altas pressões nos parâmetros físico-químicos

A Tabela 11 descreve os efeitos da aplicação da alta pressão nos parâmetros de pH e aw dos enchidos-modelo inoculados com *Staphylococcus xylosus* ATCC 8166. Verificou-se que as variações do pH das amostras nunca foram superiores a 0,17; no entanto foram encontradas diferenças estatísticas induzidas pelos diferentes tratamentos, como resultado de desvios padrão muito baixos.

Por outro lado, a aw não registou alterações com a pressão e com a temperatura a que os enchidos-modelo fermentados foram submetidos, independentemente das condições de pressão e temperaturas de processamento aplicadas.

Tabela 11 - pH e aw: médias e desvio padrão dos enchidos-modelo fermentados e inoculados com *Staphylococcus xylosum* ATCC8166

Amostras	Condições de pressão e temperatura aplicadas nos enchidos-modelo		pH	aw
Amostra 1* (n=2)	4°C*	1	5,51 ±0,00	0,93±0,00
Amostras 2* (n=2)	15,0**	67	5,51±0,06 ^{a,b,c}	0,93±0,01
	6,0**	91	5,53±0,08 ^{a,b,c,d}	0,93±0,01
	24,0**	91	5,45±0,01 ^a	0,92±0,00
	2,3**	150	5,50±0,01 ^b	0,93±0,00
	15,0**	150	5,55±0,01 ^c	0,93±0,00
	15,0**	150	5,52±0,05 ^{b,c}	0,93±0,01
	27,7**	150	5,52±0,07 ^{a,b,c}	0,93±0,01
	6,0**	209	5,62±0,05 ^d	0,92±0,01
	24,0**	209	5,51±0,03 ^{b,c}	0,93±0,01
	15,0**	233	5,57±0,01 ^{b,c,d}	0,92±0,01

Amostra 1 - enchidos-modelo inoculados com *St. xylosum* ATCC8166 não submetido à ação das altas pressões hidrostáticas; Amostra 2 - enchidos-modelo inoculados com *St. xylosum* ATCC8166 e submetidos à ação da pressão

*Temperatura de refrigeração

**Temperatura de processamento

(a,b,c,d)- diferentes letras dentro do mesmo grupo de valores referente a determinado parâmetro correspondem a médias significativamente diferentes.

5 - Discussão

Os produtos de salsicharia fermentados são propícios ao crescimento microbiano, devido aos seus constituintes, pelo que a carne e a gordura utilizadas no seu fabrico devem ser de elevada qualidade microbiológica para reduzir a carga microbiana no início da fermentação (a contagem microbiológica deve situar-se entre 10^2 - 10^4 ufc/g de carne) (Varman & Sutherland, 1998; Feiner, 2006).

Note-se que a carne pode veicular agentes patogénicos, constituindo estes perigos potenciais para a saúde dos consumidores, mas a ela estão principalmente associadas bactérias gram-negativas responsáveis pela sua decomposição. Uma das formas de prolongar a sua vida útil é impedir o desenvolvimento deste tipo de bactérias, através, por

exemplo, da aplicação de temperaturas de refrigeração no ambiente que rodeia o produto, diminuindo a sua aw, e da aplicação de tecnologias de conservação não-térmicas como a de altas pressões.

Do mesmo modo, o recurso a culturas *starters*, compostos maioritariamente por cocos gram-positivos, como os SCN e, entre estes, os *Staphylococcus xylosus*, utilizados neste estudo, revela-se importante para garantir as qualidades organolépticas do produto acabado (Hugas & Roca., 1997a), tendo algumas estirpes BAL capacidade para inibir agentes patogénicos.

Os trabalhos desenvolvidos por Morot-Bizot *et al.* (2003) e por Martín *et al.* (2006 e 2007) mostram que os *Staphylococcus xylosus* são a espécie de *Micrococcaceae* predominante nos enchidos fermentados e desempenham um papel importante nas suas características sensoriais, estando envolvidos na qualidade dos produtos fermentados. Também Hugas & Roca (1997a) referem a importância da utilização destas espécies como *starters*, uma vez que garantem a formação da cor durante a maturação dos produtos de salsicharia e contribuem para o desenvolvimento do aroma.

No presente estudo, utilizaram-se enchidos-modelo fermentados, de carne de porco, de pequeno calibre (com peso médio de 66,8 g) e maturados a temperaturas de refrigeração.

Os enchidos-modelo foram elaborados a partir de uma base comum, composta por sal, massa de alho e de pimentão, tendo sido embalados a vácuo e pressurizados posteriormente. A maturação dos enchidos deu-se em condições adequadas de forma a obter-se um produto pouco ácido, característico dos enchidos dos países mediterrâneos, como Portugal.

Após a pressurização, os enchidos-modelo fermentados foram colocados na câmara de congelação (-18°C), uma vez que a estas temperaturas não é possível o crescimento microbiano, embora os microrganismos residuais possam persistir, sendo as bactérias gram-positivas mais resistentes às baixas temperaturas do que as gram-negativas (Adams & Moss, 2000).

Do estudo combinado da pressãoxtemperatura observou-se que a variável pressão, analisada de forma independente, contribuiu para a redução microbiana das amostras submetidas a pressões compreendidas entre 50-250 MPa, a uma temperatura controlada de 1 a 30°C, aplicada durante 30 minutos. No entanto a temperatura de processamento não afectou significativamente a diversidade microbiana das amostras pressurizadas.

À temperatura óptima de crescimento, a inactivação é menor do que a baixas ou altas temperaturas de crescimento, porque a fluidez da membrana pode ser danificada mais facilmente a temperaturas diferentes da ideal (Smelt, 1998; Hugas *et al.*, 2002).

No entanto, neste estudo, as amostras só não estiveram sob condições de refrigeração durante o processamento por alta pressão, pelo que o efeito da temperatura de processamento não foi significativo, tendo em conta os 30 minutos que durou cada ensaio.

Relativamente às contagens microbianas, observou-se, no presente trabalho, que a tecnologia de altas pressões, a temperaturas controladas de 1 a 30°C, permitiu reduzir o crescimento de *Enterobacteriaceae*, um indicador de contaminação fecal. Contudo, a flora tecnológica não foi afectada significativamente, pelo que o pH dos enchidos-modelo não foi influenciado. Os restantes grupos microbianos estudados sofreram alterações pouco significativas. Tal deve-se, eventualmente, ao facto das pressões consideradas para aplicar neste estudo não terem sido superiores a 250 MPa. Pela mesma razão, praticamente não terá ocorrido inactivação enzimática (Hendrick *et al.*, 1998; Eisenmenger *et al.*, 2009).

A mesma conclusão foi referenciada por Latorre-Moratalla *et al.* (2007) num estudo efectuado em produtos de salsicharia fermentados inoculados com duas estirpes de *L. sakei* e duas de *St. xylosus* submetidas a pressão de 200 MPa durante 10 minutos a 17°C, o que determinou a inibição do crescimento de *Enterobacteriaceae*. No entanto, Rubio *et al.* (2007) conseguiram graus de inactivação mais elevados num estudo com carnes curadas secas, verificando que uma pressão de 500 MPa durante 5 minutos a 18°C resultou não só na inactivação de *Enterobacteriaceae*, mas também na redução de BAL e de *Micrococcaceae*, tendo o sistema de pressurização exercido um efeito inibitório em todos os microrganismos. Também, Stollewerk *et al.* (2011) constataram que os enchidos fermentados ácidos inoculados com estirpes de *L. sakei* e *St. carnosus* e os enchidos fermentados pouco ácidos inoculados com *L. sakei* submetidos a uma pressão de 600 MPa durante 5 minutos a 13°C, apresentavam uma redução da microflora tecnológica. A mesma conclusão foi reportada por Ruiz-Capillas *et al.* (2007) que verificaram uma inactivação das *Enterobacteriaceae* e uma redução da microflora tecnológica quando os enchidos fermentados eram sujeitos a uma pressão de 350 MPa durante 15 minutos a 20°C.

Han *et al.* (2011) mostraram que no fiambre cozido fatiado e embalado a vácuo, quando submetido a pressões de 400 MPa e 600 MPa durante 10 minutos a 22°C, a flora tecnológica era reduzida e as *Enterobacteriaceae* não foram detectadas.

Diez *et al.* (2008) concluíram que na morcela de Burgos, quando sujeita a diferentes pressões (300, 500 e 600 MPa) durante 10 minutos a 20°C, havia uma redução significativa de *Enterobacteriaceae* e uma ligeira diminuição das BAL e microrganismos aeróbios totais (excepto nas pressões mais elevadas).

Também Marcos *et al.* (2007) mostraram, no seu estudo, que as BAL não eram afectadas com a pressão, pois os enchidos fermentados e secos inoculados com uma estirpe de *L. sakei* e outra de *St. xylosus*, quando pressurizados a 400 MPa durante 10 minutos a 17°C apresentavam uma redução significativa na contagem de *Enterobacteriaceae* e de SCN, mas não havendo grande alteração na contagem de BAL.

Garriga *et al.* (2002a e 2004) verificaram que no presunto curado seco submetido a uma pressão de 600 MPa durante 6 minutos a 31°C havia um atraso no crescimento microbiano

dos microrganismos aeróbios totais, e uma redução significativa de *Enterobacteriaceae*. As BAL, nestes estudos tiveram uma redução imediata de 4 logaritmos após o tratamento com altas pressões.

Garriga *et al.* (2005) concluíram ainda que os enchidos fermentados e secos quando inoculados com duas estirpes de *L.sakei* e duas de *St. xylosus* e sujeitos à pressão de 400 MPa, durante 10 minutos a 17°C sofriam uma inactivação das *Enterobacteriaceae* e a contagem da flora tecnológica não era afectada.

Estudos efectuados em produtos de salsicharia fermentados comprovam que as bactérias gram-negativas são mais sensíveis ao efeito das altas pressões do que as bactérias gram-positivas (Hoover *et al.*, 1989; Cheftel & Culioli, 1997; Smelt, 1998; Hugas *et al.*, 2002; Fomberg-Broczek *et al.*, 2005; Patterson, 2005; Garriga & Aymerich, 2009; Rivalaín *et al.*, 2010; Rendueles *et al.*, 2011).

A tolerância relativamente alta das bactérias gram-positivas contra factores limitativos (por exemplo, redução da aw, presença de temperaturas de refrigeração e pH baixo), garante uma taxa elevada de sobrevivência destes microrganismos, em comparação com as bactérias gram-negativas (Holzapfel, 1998).

O ácido láctico é considerado o principal responsável pela inactivação das bactérias gram-negativas nos enchidos fermentados e secos (Rubin & Vaughan, 1979 citado por Garriga *et al.*, 1996a), além da combinação dos factores intrínsecos (pH e aw) (Peres, 2000).

A diferença dos resultados apresentados por vários investigadores, na contagem dos microrganismos, pode ser devida ao facto das diversas estirpes da mesma espécie apresentarem diferentes graus de resistência à pressão (Smelt, 1998). Além disso, a natureza do substrato pode afectar a resposta dos microrganismos à pressão, pelo que, a capacidade das bactérias em sobreviver a tratamentos de altas pressões pode ser aumentada em meios nutricionalmente ricos como são os produtos de salsicharia fermentados que contêm constituintes (hidratos de carbono, proteínas e lípidos) e que exercem um efeito protector nos microrganismos, durante o tratamento de altas pressões, de onde resulta uma reduzida variabilidade da flora tecnológica (Garriga *et al.*, 2002; Aymerich *et al.*, 2008; Garriga & Aymerich, 2009). Tais constatações são referidas, também, por Hereu *et al.* (2011) ao analisarem um presunto seco curado e um enchido tradicional ibérico.

Deve também ser sublinhado que quando as células são submetidas a temperaturas de refrigeração antes da aplicação das altas pressões tornam-se mais resistentes à pressão (Hugas *et al.*, 2002), o que permite explicar os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que a matéria-prima que foi utilizada para o fabrico dos produtos de salsicharia encontrava-se armazenada a baixas temperaturas.

A alta pressão tem um efeito importante na combinação pressãoxtemperatura, verificando-se que a pressão, como técnica de conservação, minimiza a temperatura de tratamento, garantindo a qualidade nutricional e sensorial do produto, uma vez que as vitaminas, compostos do sabor e os fitoquímicos, não são afectados.

As aplicações de *starters* e da tecnologia de altas pressões nos enchidos constituem barreiras adicionais à fermentação, o que melhora substancialmente a segurança dos produtos ligeiramente fermentados. A mesma conclusão foi reportada por Garriga *et al.* (2005) e Stollewerk *et al.* (2011).

Uma vez que não se detectou *Listeria monocytogenes* nos enchidos-modelo inoculados com *Staphylococcus xylosum* ATCC8166, sujeitos a uma pressão isostática de 50-250 MPa, a temperatura controlada de 1 a 30°C, durante 30 minutos, introduziu-se uma estirpe deste agente patogénico em amostras que foram submetidas também à pressão isostática de 50-250 MPa, a uma temperatura fixa controlada de 15°C, durante um intervalo de 5 a 60 minutos, de forma a analisar o efeito da pressão e do tempo na redução deste microrganismo.

Este trabalho pretendia contribuir para um melhor conhecimento do efeito da tecnologia de altas pressões nos enchidos fermentados contaminados com flora patogénica, como a *Listeria monocytogenes*, inoculada em enchidos-modelo fermentados e maturados à temperatura de refrigeração.

Os ingredientes (como o sal) dos produtos de salsicharia fermentados, o embalamento a vácuo, o armazenamento refrigerado revelam-se insuficientes no controlo de *L.monocytogenes*, uma vez que este patogénico tem carácter ubíquo: capacidade em crescer numa larga gama de pH (4,6 a 9,5) nos substratos com baixo aw ($\leq 0,92$), tolerar altos níveis de sal (até 10%) crescer a temperaturas de refrigeração em condições de anaerobiose e sobreviver ao congelamento (Thévenot *et al.*, 2006; Mantilla *et al.*, 2007; FSIS, 2008;Wells- Bennitz *et al.*, 2008; Aldsworth *et al.*, 2009; Carpentier & Cerf, 2011). De acordo com Glass & Doyle (1989), a manutenção dos produtos a baixas temperaturas não impede o crescimento de *L. monocytogenes*, e Nurfer *et al.* (2007) verificaram que as estirpes de *Listeria monocytogenes* proliferam a temperaturas mais baixas quando comparadas com outras estirpes não patogénicas.

A *Listeria monocytogenes* é encontrada, regularmente, na carne crua, mas o seu potencial de crescimento é baixo durante a fermentação dos enchidos, sendo geralmente não detectável nos enchidos da Europa (Lucke, 1998; Lebert *et al.*, 2007).

Thévenot *et al.* (2005) e Stollewerk *et al.* (2011) concluíram que a contagem de *Listeria monocytogenes* nos produtos de salsicharia fermentados pressurizados diminui durante a secagem.

Neste estudo, relativamente às contagens microbianas, observou-se um decréscimo de *Enterobacteriaceae* e de *Staphylococcus* coagulase negativos nas amostras controlo (inoculadas com *Listeria monocytogenes* 4aCECT934 e sem tratamento) quando comparadas com o preparado de carne (antes da inoculação).

Comparando as amostras controlo com os enchidos modelo fermentados pressurizados, detectou-se um decréscimo ligeiro de BAL e mais acentuado de *Enterobacteriaceae* com o aumento da pressão. Nas amostras pressurizadas, o nível de *Enterobacteriaceae* diminuiu com o aumento da pressão, atingindo valores inferiores a 1 log ufc/g para pressões superiores a 200 MPa.

Comparando os valores dos parâmetros microbianos analisados dos preparados de carne (antes do enchimento) dos dois ensaios I e II (Tabelas 7 e 9) verificou-se que ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de todos os microrganismos testados, com excepção das BAL. Tal pode ser justificado por a matéria-prima utilizada no fabrico destes enchidos-modelo ter estado submetida a um longo período de congelação (cerca de 3 meses) e pela execução da tarefa de preparação ter sido menos morosa no segundo ensaio.

O congelamento é um método eficaz na manutenção das características iniciais da carne durante um longo período de armazenamento, minimizando as mudanças microbiológicas e químicas dos produtos cárneos fermentados e secos e prevenindo o crescimento de agentes patogénicos como a *Listeria monocytogenes*, que poderão estar presentes nos alimentos. Contudo, a carne congelada não pode ser considerada como um material inerte e o processo de congelação e as condições de armazenamento e de descongelação poderão induzir mudanças nos produtos e nos microrganismos contaminantes (Lawrie, 1998; Genot, 2002).

É de extrema importância a eliminação de *Enterobacteriaceae*, uma vez que as bactérias pertencentes a este grupo podem produzir aminas biogénicas (cadaverina, putrescina, histamina) que prejudicam a qualidade dos alimentos (Garriga & Aymerich, 2007).

Constatou-se, ainda, neste trabalho, que ocorreram variações significativas na contagem de BAL ($p < 0,05$) a pressões superiores a 200 MPa e tempo acima de 30 minutos, e que os SCN sofreram alterações ligeiras. Assim, pode concluir-se que, para garantir a inactivação de microrganismos indesejáveis, o ideal é aplicar pressões acima dos 200 MPa, a temperatura ambiente e durante 12 minutos pois, nestas condições, a contagem de BAL atinge os valores mínimos possíveis que facilitam o processo de fermentação dos produtos cárneos.

No presente estudo, o tempo de actuação influenciou significativamente a redução de BAL e de A.T a 30°C ($p < 0,05$) no termo linear e quadrático, respectivamente, sendo uma variável importante na inactivação microbiana. No entanto, a interacção pressãoxtempo não teve influência na redução microbiana.

Simpson & Gilmour. (1997) verificaram que estirpes de *Listeria monocytogenes* presentes em diversos alimentos pressurizados a 375 MPa diminuíam com o aumento do tempo de tratamento.

Ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo, Alpas *et al.* (2000) sugerem que a pressão e o tempo têm um efeito importante na redução de patógenos de origem alimentar.

Tholozan *et al.* (2000) conseguiram inativar a pressões superiores a 200 MPa, durante 10 minutos, uma suspensão de *Listeria monocytogenes*. No entanto numa matriz sólida, como o chouriço que se utilizou, isso não aconteceu. Diversos autores descrevem a inactivação de *Listeria monocytogenes* mas a pressões superiores às utilizadas no nosso estudo.

Marcos *et al.* (2005) observaram que os produtos de salsicharia fermentados inoculados com três estirpes de *Salmonella* spp e três de *Listeria monocytogenes* e submetidos a uma pressão de 300 MPa durante 10 minutos a 17°C antes da maturação, não apresentam um decréscimo de *Listeria monocytogenes* durante esta fase.

Ananou *et al.* (2010) verificaram que após inoculação de várias estirpes patogénicas em enchidos fermentados e secos pressurizados a 400 MPa, durante 10 minutos a 17°C a perda de viabilidade da *Listeria monocytogenes* foi ligeira.

Jofré *et al.* (2010) concluíram que a pressões de 400, 600 e 900 MPa a viabilidade do patógeno era afectada significativamente, tendo sido os seus níveis reduzidos para valores inferiores ao limite de detecção. Contudo, Ritz *et al.* (2000) demonstraram que a relação entre o aumento da pressão e a inactivação de *Listeria monocytogenes* não é linear.

Bover-Cid *et al.* (2010; 2011) observaram que no fiambre cozido inoculado com *Listeria monocytogenes* CTC1034 e submetido ao tratamento de altas pressões (347-852 MPa, durante 2,3-15,75 minutos, de 7,6°C a 24,4°C), a interacção pressão x tempo é significativa, verificando-se que o aumento da pressão e do tempo de tratamento resultam num aumento de inactivação microbiana, sendo o efeito da pressão maior quando o tempo de pressurização aumenta. Os mesmos autores observaram, ainda, que a sensibilidade da *Listeria monocytogenes* à pressão é maior que ao tempo de exposição, e que um tempo superior a 10 minutos não resulta numa diminuição significativa de *Listeria monocytogenes*.

Hereu *et al.* (2010) observaram que a aplicação de elevados níveis de pressão (600 MPa durante 5 minutos a 15°C) é considerada como um tratamento eficaz na inactivação de *Listeria monocytogenes*, inoculada em produtos cárneos fermentados e secos.

Belletti *et al.* (2011) verificaram que para o *foie gras* pressurizado e inoculado com estirpes patogénicas (*Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp) as condições de pressão e de tempo inibem de forma imediata o crescimento de *L.monocytogenes* e também de *Salmonella* spp.

Vercammen *et al.* (2011) mostraram que, no fiambre submetido a pressões de 100 a 700 MPa, a temperaturas de 5°C a 40°C durante 10 minutos, a maioria das bactérias era inactivada a 400 MPa, excepto para os agentes patogénicos (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *E.coli* O157:H7) e a inactivação microbiana registada aumentou com a temperatura.

Jofré *et al.* (2010) verificaram que a *Listeria monocytogenes* pode ser recuperada após a aplicação de pressão, concluindo que a combinação de altas pressões com outros obstáculos ao crescimento microbiano pode ser necessária para garantir a eficácia das tecnologias que visam a redução de microrganismos indesejáveis e o consequente aumento da vida útil dos produtos.

Um aumento da pressão induz um aumento da inactivação microbiana. Contudo, um aumento do tempo de tratamento não aumenta necessariamente o efeito letal. No entanto, a resposta microbiana a altas pressões depende do tipo de microrganismo, uma vez que cada organismo bacteriano tem um limiar ao nível de pressão. O efeito letal do processo tende a aumentar com o aumento da pressão mas não necessariamente com o aumento do tempo (Palou *et al.*, 1999; Patterson *et al.*, 2006).

Ritz *et al.* (2000) verificaram que numa suspensão de *Listeria monocytogenes* num meio de fosfato e de citrato de fosfato, os factores que mais influenciam a redução do patogénico após pressurização (de 200 a 600 MPa) são, além da pressão, o pH, tendo o tempo pouca influência na diminuição da carga microbiana.

A aplicação de alta pressão e de um longo tempo de pressurização não é nem económica nem comercialmente aceitável (Hoover *et al.*, 1989), visto o tempo de tratamento poder aumentar o custo do processo sem melhorar a eficiência de inactivação. Assim, o aumento da pressão, num curto espaço de tempo, aumenta a inactivação microbiana. Atenda-se, no entanto, que níveis elevados de pressão são responsáveis pela desnaturação proteica e por outras mudanças prejudiciais na qualidade dos enchidos fermentados pressurizados (Norton & Sun, 2008).

Estudos efectuados concluem que não é vantajoso para a inactivação microbiana a aplicação de baixas pressões (minimizando os efeitos adversos nas características sensoriais do produto) durante um longo período de tempo (Kalchayanand *et al.*, 1998; Alpas *et al.*, 2000).

A reduzida variabilidade das contagens dos microrganismos, nos enchidos-modelo fermentados pode também estar relacionada com o efeito protector da carne, uma vez que a gordura, proteínas, minerais e açúcares aumentam a resistência dos microrganismos à pressão (Patterson, 2006; Garriga & Aymerich, 2009; Rendueles *et al.*, 2011).

Hereu *et al.* (2011) verificaram que o elevado teor de gordura do presunto curado seco, com baixa aw, exerceu um efeito protector nos microrganismos patogénicos durante a tecnologia de altas pressões.

Tratamentos até 600 MPa estão actualmente a ser aplicados na indústria alimentar o que permite o aumento da segurança dos produtos de salsicharia fermentados.

No presente trabalho, verificou-se que o pH dos enchidos-modelo fermentados, inoculados com *St. xylosus* ATCC8166, teve alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$), no entanto não apresentou variações em termos absolutos, tendo-se obtido um valor de pH mínimo de 5,43 e máximo de 5,65, quando as amostras foram submetidas a pressões de 50-250 MPa, a temperaturas de 1 a 30°C e tempo de exposição de 30 minutos.

A aw não sofreu alterações significativas ($p > 0,05$) nas amostras pressurizadas, com valores de aw compreendidos entre 0,91 e 0,94.

Estes valores estão de acordo com os obtidos nos estudos de Marcos *et al.* (2007) e Marcos *et al.* (2005), tanto para os enchidos inoculados com culturas *starters* (*L. Sakei* e *St. xylosus*), pressurizados a 400 MPa, durante 10 minutos a 17°C e para os enchidos inoculados com flora patogénica a 300 MPa durante 10 minutos a 17°C, como para os enchidos fermentados e secos dos países do Mediterrâneo, com tempo de maturação normalmente inferior a 4 semanas. Em todos eles os valores de pH situam-se entre 5,2 e 5,8, devido à menor carga de BAL com menor produção de ácido láctico (Lund *et al.*, 2000; Vignolo *et al.*, 2010).

Os estudos desenvolvidos por Ruiz-Capillas *et al.* (2007), com pressões de 350 MPa durante 15 minutos a 2°C, e por Stollewerk *et al.* (2011), com pressões de 600 MPa, durante 5 minutos a 13°C, indicam valores de pH mais baixos (inferiores a 5,0).

Garriga *et al.* (2003) chegaram a valores de pH mais baixos do que os do presente estudo, com pressurizações de 300 MPa, durante 10 minutos a 17°C, tendo-se observado um aumento significativo desta variável no início do processo de maturação, a que se seguiram diminuições para valores inferiores a 5,5.

Já Marcos *et al.* (2007) e Latorre-Moratalla *et al.* (2007) concluíram que os enchidos inoculados com *starters* mostravam uma descida acentuada do valor de pH durante os primeiros dias de maturação, independentemente da pressurização.

Os valores do pH e da aw mantiveram-se estáveis durante o armazenamento dos enchidos-modelo a baixas temperaturas.

No estudo desenvolvido por Ruiz-Capillas *et al.* (2007), o tratamento por altas pressões nas amostras com maturação rápida não produziu diferenças significativas nos níveis de pH durante o armazenamento.

Diez *et al.* (2008) verificaram que os valores de pH do enchido fermentado diminuía durante o armazenamento, embora de um modo mais lento no caso de um produto tratado a pressões mais elevadas (600 MPa).

Ao contrário, Ananou *et al.* (2010) verificaram que o pH dos produtos de salsicharia fermentados, era elevado no fim da maturação (5,92) aumentando para 6,5 durante o armazenamento (7°C) e após pressurização a 400 MPa.

O pH e a pressão podem actuar sinergicamente levando ao aumento da inactivação microbiana (Patterson, 2005).

Hereu *et al.* (2010) concluem que a aplicação de 600 MPa (durante 5 minutos a 15°C), em produtos cárneos secos com uma *aw* de 0,92, inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes*, confirmando que baixos valores de *aw* (<0,90) exercem um efeito baroprotector, reduzindo a inactivação bacteriana induzida por altas pressões (Patterson, 2005; Rendueles *et al.*, 2011).

Apesar de as *Enterobacteriaceae* tolerarem valores máximos de 0,95 para a *aw* e de 5,6 para o pH a temperaturas de 7°C, a sua carga é diminuída quando os enchidos modelo fermentados e secos são sujeitos a alta pressão (Benezet *et al.*, 2010).

Hoover *et al.* (1989) e Rendueles *et al.* (2011) referem que a tecnologia de altas pressões faz diminuir o pH, uma vez que favorece a ionização dos ácidos orgânicos que são inibidores dos microrganismos. As células vegetativas são sensíveis à acção da pressão e de baixo pH (Smelt, 1998).

Neste trabalho, o valor da *aw* dos enchidos-modelo (0,93) foi menor do que a *aw* adequada da carne fresca (0,97), à semelhança dos estudos realizados por Marcos *et al.* (2005), Latorre-Moratalla *et al.* (2007), Marcos *et al.* (2007), e Stollewerk *et al.* (2011) e decorrente da adição de sal. Contudo, afasta-se das *aw* normalmente encontradas, uma vez que não foi aplicada uma fase de fumagem e secagem (Marcos *et al.*, 2005; Latorre-Moratalla *et al.*, 2007; Marcos *et al.*, 2007; Ruiz-Capillas *et al.*, 2007 e Rubio *et al.*, 2007).

A *aw* final dos enchidos portugueses, franceses, espanhóis e italianos varia entre 0,83 e 0,93 (Lebert *et al.*, 2007).

Já os valores de *aw* foram idênticos em todos os enchidos-modelo, após a sua pressurização e durante o seu armazenamento, situando-se entre 0,92 e 0,93.

Os resultados obtidos, e de acordo com Latorre-Moratalla *et al.* (2007), indicam que a tecnologia de alta pressão parece não afectar a actividade fermentativa tanto da microflora espontânea como dos *starters* e o curso de acidificação é o mesmo nos enchidos pressurizados e não pressurizados.

O custo do processo de tratamento de altas pressões está relacionado com a pressão, tempo, manutenção e custos de operação. É economicamente viável a aplicação de baixos níveis de pressão, em conjugação com outras técnicas de processamento (temperaturas elevadas) para atingir o nível pretendido de inactivação microbiana (Tassou *et al.*, 2008).

6- Conclusões

A segurança e a qualidade são hoje requisitos de qualquer produto alimentar. Para os garantir, têm sido desenvolvidos novos processos de conservação, de que é exemplo o das altas pressões, que permite manter por muito mais tempo as características dos alimentos frescos, reduzindo ou eliminando microrganismos nefastos à saúde do consumidor.

Com este trabalho, pretendeu-se comprovar a veracidade prática desta afirmação, que depende, no entanto, da conjugação de diversos factores, como da pressão, temperatura e tempo a que são sujeitos os produtos, bem como da qualidade das matérias-primas e dos *starters* empregues, estes últimos considerados hoje já como um pré-requisito da indústria alimentar. Para o efeito, procedeu-se ao fabrico artesanal de enchidos fermentados (no caso concreto de chouriços), utilizando-se como matérias-primas carne e gordura de suíno, sal, água, massa de alho e de pimentão, em diferentes proporções. Na primeira experiência foi adicionado ao preparado de carne uma estirpe de *Staphylococcus xylosus* e na segunda experiência inoculou-se directamente no enchido-modelo uma estirpe de *Listeria monocytogenes*.

Na primeira experiência, os enchidos fermentados foram submetidos a altas pressões, depois de devidamente embalados em sacos de polietileno, a temperaturas variáveis de 1º a 30°C durante 30 minutos.

Do estudo combinado da pressão com a temperatura, observou-se que a temperatura de processamento, isoladamente, não teve efeito significativo na redução da flora microbiana. No entanto, a pressão mostrou ser um parâmetro de extrema importância, sendo eficiente na diminuição do crescimento de indicadores de contaminação fecal (*Enterobacteriaceae*), sobretudo a pressões superiores a 200 MPa. Os restantes microrganismos (flora tecnológica e microrganismos aeróbios totais a 30°C) avaliados demonstraram resistência à tecnologia de altas pressões.

No que respeita aos parâmetros físico-químicos analisados (pH e aw) nos enchidos-modelo inoculados com *Staphylococcus xylosus* ATCC 8166, verificou-se que a conjugação das variáveis pressão e temperatura provocou variações do pH, embora nunca superiores a 0,17. Por outro lado, a aw dos enchidos fermentados e tratados com altas pressões não registou alterações com a pressão e a temperatura de processamento a que as amostras foram submetidas.

Na segunda experiência, os enchidos fermentados foram sujeitos a altas pressões à temperatura fixa de 15°C durante 5 a 60 minutos. A análise do efeito combinado da pressão com o tempo de exposição à acção da pressão, revelou que o tempo de exposição, por si só, apenas afectou significativamente o crescimento de *Enterobacteriaceae*. À semelhança do primeiro ensaio, a pressão mostrou ser um factor muito importante, permitindo melhorar a

qualidade microbiológica dos produtos cárneos fermentados, pois assegurou a completa inativação de *Enterobacteriaceae* a pressões superiores a 200 MPa. Já a *Listeria monocytogenes* não sofreu alterações de vulto, na medida em que foram aplicadas pressões inferiores a 250 MPa.

De um modo geral, os resultados obtidos com os dois ensaios revelaram que a tecnologia de altas pressões reduz os microrganismos gram-negativos pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* presentes nos produtos cárneos fermentados, contribuindo para garantir o controlo de patogénicos, como a *Salmonella* ou de *E.coli* enteropatogénicas, nocivos à saúde do consumidor. Trata-se, assim, de uma técnica de sobeja importância e interesse na indústria alimentar, que peca, no entanto, por ser ainda demasiado dispendiosa. A realização de mais estudos que permitam comprovar as vantagens da sua utilização, surtirá, certamente, um interesse crescente por parte dos empresários da indústria alimentar para a sua aplicação. Chegará o dia em que a tecnologia de altas pressões será usual na conservação de produtos alimentares.

7- Bibliografía

- Aldsworth, T., Dodd, C.E.R., Waites, W. (2009). Food Microbiology. In Campbell-Platt, G., *International review of Food Science and Technology*. (pp. 115-162). Reino Unido: Willey-Blackwell.
- Alfaia, A.J.I., Mendonça, J.C., Valente, J.B., Ribeiro, M.H.L., Fraqueza, M.J. (2011). Differential High pressure induced inactivation of bacteria population in fermented products, *Revista Portuguesa de Farmácia*, vol. 6, pp.153-154.
- Adams, M.R., Moss, M.O. (2000). Fermented Microbial Foods. In Adams, M.R; Moss, M.O, *Food Microbiology*. (2th ed). (pp. 344-346). Reino Unido: Royal Society of Chemistry. University of Surrey.
- Aertsen, A., Meersman, F., Hendrickx, M.E.G., Vogel, R.F., Michielis, C.W. (2009). Biotechnology under high pressure: Applications and Implications, *Trends in Biotechnology*, vol.27, pp. 434-441.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Ray, B. (2000). Interactions of High Hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure - sensitive strains of food-borne pathogens, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 60, pp. 33-42.
- Ananou, S., Garriga, M., Jofré, A., Aymerich, T., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E. (2010). Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages, *Meat Science*, vol 84, pp. 594-600.
- Andrés, A., Barat, J.M., Grau, R., Fito, P. (2007). Principles of drying and smoking. In Toldrá, F., *Handbook of fermented meat and poultry*. (pp. 37-50). Reino Unido: Blackwell Pub.
- Aro Aro, J.M., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K-I. (2010). The effect of starter cultures on proteolytic changes and aminoacid content in fermented sausages, *Food Chemistry*, vol. 119, pp. 279- 285.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Hugas, M. (2003). Microbial quality and direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal low- Acid Sausages, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, pp. 4583-4594.
- Aymerich, T., Martín, B., Rovira, J., Garriga, M. (2004). Caracterización de bacterias de interés tecnológico en productos fermentados mediante técnicas moleculares, *Eurocarnes*, vol.131, pp. 1-4.
- Aymerich, T., Picouet, P.A., Monfort, J.M. (2008). Decontamination technologies for meat products, *Meat Science*, vol. 78, pp. 114-129.
- Baka, A.M., Papavergeou, E.J., Pragalaki, T., Bloukas, J.G., Kotzekidou, P. (2011). Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of greek fermented sausages, *Food Science and Technology*, vol. 44, pp. 54-61.
- Balasubramaniam, V.M., Farkas, D., Turkey, E. (2008). High-Pressure Processing, *Food Technology*, vol. 11, pp. 33-38.

- Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, R.U., Palou, E., Swanson, B.G. (1998). High hydrostatic Pressure - Food Processing In Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, R.U., Palou, E., Swanson, B.G, *NonThermal Preservation of Foods* (pp. 9-48). Nova York: Marcel Dekker.
- Belletti, N., Martínez, B., Aymerich, T., Garriga, M. (2011). Inibición de *Listeria monocytogenes* e Salmonella mediante alta presión hidrostática en un producto listo para el consumo com el bloc de foie gras, *Eurocarnes*, vol. 197, pp. 56-60.
- Blaiotta, G., Pennachia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., Parente, E. (2004). Diversity and Dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 97, pp 271-284.
- Bedia, M., Méndez, L., Bañón, S. (2011). Evaluation of different starter cultures (Staphylococci plus Lactic Acid Bacteria) in semi-ripened Salami stuffed in Swine gut, *Meat Science*, vol. 87, pp.381-386.
- Benezet, A., De la Osas, J.M., Botas, M., Pedregal, E., Pereda, P., Pérez Flórez, F., Pacho, O. (2010). Valor de pH y actividad agua (aw) en productos cárnicos comerciales, *Alimentaria*, vol. 419, pp. 109-124.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T. (2010). Inactivación de *Listeria monocytogenes* por altas presiones en jamón curado: desarrollo, validación y aplicación de un modelo predictivo, *Eurocarnes*, vol. 189, pp.60-68.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T. (2011). Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing, *Food Microbiology*, vol. 28, pp. 804-809.
- Butz, P., Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: Chemical aspects, *Food Research International*, vol. 35, pp. 279- 284.
- Campbell-Platt, G. (1995). Fermented meats - a World Prospective. In Campbell-Platt, G., *Fermented meats*, (pp. 39-52). Reino Unido: Blackie Academic & Professional.
- Campus, M., Flores, M., Martínez, A., Toldrá, F. (2008). Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin, *Meat Science*, vol. 80, pp. 1174-1181.
- Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises, *International Journal of Food Microbiology*, vol 145, pp. 1-8.
- Casaburi, A., Aristoy, C. M., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of *starter cultures*, *Meat Science*, vol. 76, pp. 295-307.
- Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D., Villani, F. (2008). Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits, *Food Microbiology*, vol. 25, pp. 335-347.
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., Ramírez, M.R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured

- iberian ham and loin during refrigerated storage, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 10, pp. 76-81.
- Chawla, R., Patil, G.R., Singh, A.K. (2011). High Hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review, *J. Food Sci Technology*, vol. 48, pp. 260-268.
 - Cheftel, J.D., Culioli, J. (1997). Effects of High Pressure on meat: A review, *Meat Science*, vol. 46, pp. 211-236.
 - Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., Díaz, I., Valero, A., García-Regueiro, J.A. (2011). Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry cured-ham, effects along the storage period. *Innovative food science and emerging technologies*, vol. 12, pp. 456-465.
 - Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., Cocolin, L. (2005). Characterization of naturally fermented sausages produced in North East of Italy, *Meat Science*, vol. 69, pp. 381-392.
 - Cocconcelli, P, S. (2007). Starter Cultures bacteria In Toldrá, F., *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 137-145). Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing Professional.
 - Cocconcelli, P.S., Fontana, C. (2010). Starter cultures for meat fermentation In Toldrá, F., *Handbook of meat processing*, (pp. 199-218). Iowa, E.U.A: Willey-Blackwell.
 - Collins, C.M., Lyne, P.M. (2004). Listeria and Brochotrix. In Collins, C.H., Lyne, P.M. (8th ed), *Microbiological Methods*, (pp. 365-367). Reino Unido: Arnold.
 - Coppola, Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G., Villani F. (2000). Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southerne Italian fermented sausage, *Meat Science*, vol. 56, pp. 321-329.
 - Decisão da Comissão de 5 de Novembro de 2010. JO L 292. Comissão Europeia. Bruxelas.
 - Decreto-Lei nº 363/1998, de 19 Novembro. Diário da Republica nº 268 – Série I-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Pescas.
 - Decreto-Lei nº 192/89, de 8 Junho. Diário da República nº 131- I Série. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação.
 - Decreto-Lei nº 350/2007, de 19 Outubro. Diário da República nº 202 – I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Pescas.
 - Demazeau, G., Rivalain, N. (2011). The development of High Hydrostatic pressure processes as an alternative to other pathogen reduction method, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 110, pp. 1359 - 1369.
 - Demeyer, D. (2006). Meat Fermentation: Principles and Applications. In Hui, T.H., *Handbook of food Science, Technology and Engeneering*, (pp. 1-8 (65)). Nova York: Taylor & Francis.

- Diez, A.M., Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J. (2008). Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage, *Food Microbiology*, vol. 25, pp. 154-161.
- Directiva do Conselho nº 77/99/CEE, de 21 de Dezembro de 1976. *JO L 26*. Comissão Europeia. Bruxelas
- Di Maria, S., Basso, A.L., Santoro, E., Grazia, L., Coppola, R. (2002). Monitoring of *Staphylococcus xylosus* DSM 20266 added as *starter* during fermentation and ripening of soppressata molisana, a typical Italian sausage, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, pp.158-164.
- Drosinos. E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional greek fermented sausage, *Meat Science*, vol. 69, pp. 307- 317.
- Earnshaw, R.G., Appleyard, J., Hurst, R.M. (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure, *International Journal of food microbiology*, vol. 28, pp. 197-219.
- EFSA (2006). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004, *EFSA journal 2006*, vol. 310, pp. 117-127.
- EFSA (2011). The European Union summary report on trends of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009, *EFSA journal 2011*, vol. 9, pp. 136-158.
- Eisenmenger, M., Reyes-De-Corcuera, J.I. (2009). High pressure enhancement of enzymes: A review, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 45, pp. 331-347.
- Elias, M., Fraqueza, M.J., Barreto, A. (2006). Caracterização do processo de fabrico do chouriço tradicional alentejano, *Revista Portuguesa de Zootecnia*, vol. 13, pp. 1-10.
- Elias, M., Santos, A. C., Raposo, B. (2007). Caracterização das matérias-primas subsidiárias usadas no fabrico de paio de porco alentejano, *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 30, pp. 424-438.
- Encinas, J.P., Sanz, J.J., López, M.L.G., Otero, A. (1999). Behaviour of *Listeria* spp. In naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage), *International Journal of Food Microbiology*, vol.46, pp. 167-171.
- Escriu, R., Mor-Mur, M. (2009). Role of quantity and quality of fat in meat models inoculated with *Listeria innocua* or *Salmonella Typhimurium* treated by high pressure and refrigerated stored, *Food Microbiology*, vol. 26, pp. 834-840.
- Farber, J.M., Peterkin, I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen, *Microbial Reviews*, vol. 55, pp. 476 - 511.
- Farkas, D.F. (2011). High - Pressure processing Pathways to commercialization. In Zhang, H.Q., Barbosa-Cánovas, G., Balasubramaniam, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D., Yuan, J.T.C., *Nonthermal processing technologies for food*, (pp. 28-35). Iowa, E.U.A: Wiley - Blackwell.

- Feiner, G. (2006). Raw fermented salami Meat products handbook. In Feiner, G., *Meat products Handbook Practical Science and Technologic*, (pp. 314-375). Reino Unido: Woodhead Publishing Limited.
- Fellows, P.J. (2000). Processado por meio de campos eléctricos, alta pressão hidrostática, luz ou ultra-som. In tradução de Oliveira, F.C., Ruberson, J.M., Nutzke, J.A., Silveira, R.C, (2th ed). *Tecnologia de processamento de alimentos*, (pp.221-237). São Paulo.:Artmed.
- Ferreira, L., Afonso, C., Vila-Real, H., Alfaia, A.J., Ribeiro, M.H.L. (2008). Evaluation of the effect of high pressure on naringin hydrolysis in grapefruit juice with naringinase immobilised in calcium alginate beads, *Food Technol. Bioltechnol*, vol. 46, pp. 146-150.
- Flores, J. (1997). Mediterranean vs Northern European meat products. Processing Technologies and main differences, *Food Chemistry*, vol. 59, pp. 505-510.
- Flores, M., Toldrá, F. (2011). Microbial enzymatic activities for improved fermented meats, *Food Science & Technology*, vol. 22, pp. 81-90.
- Fontana, C., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G. (2005). Monitoring the bacterial population Dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 103, pp. 131-142.
- Fonberg-Brockek, M., Windyga, B., Szczawinski, J., Szczawinska, M., Pietrzak, D., Prestamo, G. (2005). High Pressure for food safety, *Acta Biochimica Polonica*, vol. 52, pp. 721-724.
- Forsythe, S.J., Hayes, P.R. (1998). Food spoilage. In Forsythe, S.J., Hayes, P.R, *Food Hygiene, Microbiology and HACCP*, (3th ed, pp.86-103). E.U.A: Aspen Publications.
- Foundation, A.M.I. (1960). *The Science of Meat and Meat Products*. (2th ed).São Francisco: W.H Freeman.
- Fraqueza, M.J.R. (1992). Utilização e valorização das tripas de animais de abate nas indústrias de carne portuguesas. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em ciências e tecnologia de alimentos. Universidade Técnica de Lisboa.
- Fraqueza, M.J. (2003). La Charcuterie Traditionelle Portugaises. Les Salaisons Portugaise. *Compte-rendu du 7ème rencontres agroalimentaires du grand rodez "Les Salaisons du sud de L'Europe"*. Rodez., France: Comunicação Oral, 21 e 22 de Outubro.
- Fraqueza, M.J., Patarata, L. (2006). Recomendações Práticas de Higiene para enchidos tradicionais fermentados e secos. Guia Prático de aulas. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária.
- Fraqueza, M.J. (2007). Influência de factores intrínsecos e extrínsecos no desenvolvimento de microrganismos nos alimentos. In Aulas de Tecnologia Geral. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária.
- Fraqueza, M.J. (2008). Tecnologia dos productos cárneos: Ingredientes. In Aulas de Tecnologia Produtos Animais. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária.

- Fraqueza, M.J., Barreto, A.S. (2010), HACCP: Hazard analysis critical control point, In Toldrá F, *Handbook of fermented processing*, (pp. 519-546), Iowa, E.U.A: Wiley-Blackwell.
- FSIS (2002). FSIS Directive. Microbial sampling of ready-to-eat (RTE) products for the FSIS verification testing program. Acedido em Ag. 8, 2011, disponível em: <http://haccpalliance.org/sub/food-safety/fsisdirective102403.pdf>.
- FSIS (2008). Disposition/Food Safety: Overview of Food Microbiology. Acedido em Ag. 8, 2011, disponível em: http://www.fsis.usda.gov/PDF/PHVt-Food_Microbiology.pdf.
- FSIS (2010). FSIS comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and meat poultry deli meats. Acedido em Ag.8, 2011, Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/PDF/Comparative_RA_Lm_Report_May2010.pdf.
- FSRE (2005). Microbiology-Shelf-Stable dried Meats, *FSRE Shelf-Stable 5/11/05* pp.109-126.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M., Ventanas, S. (2010) Lipid and Protein Oxidation and sensory properties of vacuum - packaged dry - cured ham subjected to high hydrostatic pressure, *Meat Science*, vol. 85, pp.506-514.
- García-Lopéz, M.L., Prieto, M., Otero, A. (1998). The physiological attributes of gran negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products *In* Davies, A; Board, R, *The Microbiology of Meat and meat poultry*, (pp. 1-35), Reino Unido: Blackie Academic & Professional.
- García-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I., Rovira,J. (2000). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 54, pp. 189-195.
- Garriga, M., Marcer, M., Hugas, M. (1996). Microbiología de la carne fresca y productos cárnicos envasados, *Eurocarne*, vol. 49, pp. 1-4.
- Garriga, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M.T., Arnau, J., Monfort, J. M. (1996a). Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 32, pp. 173-183.
- Garriga, M., Julia, A., Hugas, M. (1998). Experiencias piloto para el control de patógenos en embutidos poco acidificados mediante la utilización de cultivos bioprotectores, *Eurocarnes*, vol. 69, pp. 1-5.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S; Monfort, J.M., Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage, *Food Microbiology*, vol. 19, pp. 509-518.
- Garriga, M., Aymerich, T., Hugas, M. (2002a). Tecnologías emergentes en la conservación de productos cárnicos: altas presiones hidrostáticas en jamón cocido loncheado, *Eurocarnes*, vol. 104, pp. 1- 6.
- Garriga, M., Marcos, B., Aymerich, T., Hugas, M. (2003). Prospectiva de aplicación de altas presiones para la minimización de riesgos asociados a *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en embutidos madurados en frío, *Eurocarnes*, vol. 12, pp. 1-6.

- Garriga, M., Grébol, N., Aymerich, M.T., Monfort, J.M., Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 5, pp. 451-457.
- Garriga, M., Marcos, B., Martín, B., Veciana-Nogués, T., Bover-Cid, S., Hugas, M., Aymerich, T. (2005). Starter Cultures and High-Pressure Processing to improve the Hygiene and Safety of Slightly Fermented Sausages, *Journal of Food Protection*, vol. 68, pp. 2341-2348.
- Garriga, M., Aymerich, T. (2007). The microbiology of fermentation and ripening In Toldrá, F., *Fermented meat and poultry*, (pp. 125-135). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.
- Garriga, M., Aymerich, T. (2009). Advanced Decontamination Technologies. High Hydrostatic Pressure on Meat Products In Toldrá, F., *Safety of Meat and Processed Meat Food Microbiology and Food Safety*, (pp. 183- 202). Nova York, E.U.A: Springer.
- Garriga, M., Martín, B., Aymerich, T. (2011). *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli* 0157:H7 en empresas productoras de carne picada y preparados de carne. Estudio preliminar, *Eurocarne*, vol. 196, pp. 62-66.
- Genot, C. (2002). Alteraciones en las carnes congeladas, *Eurocarne*, vol.112, pp.1-10.
- Glass, K.A., Doyle, M. (1989). Fate of *Listeria monocytogenes* in Processed meat Products during refrigerated storage, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 55, pp. 1565-1569.
- Han, J.H. (2007). Packaging for NonThermal processed Foods. In Han, J.H. *Packaging for Nonthermally processed foods*, (pp. 3-16). Reno Unido: Blackwell Publishing.
- Han, Y., Jiang, Y., Xu, X., Sun, X., Xu, B., Zhou, G. (2011). Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum - packed cooked ham, *Meat Science*, vol. 88, pp. 682- 688.
- Hansen, E.B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future, *International Journal of food microbiology*, vol. 78, pp. 119-131.
- Hart, F.L., Fisher, H. J. (1991). *Análisis Moderno de los Alimentos*. (2th ed). Editorial Acribía. Zaragoza. España.
- Hayman, M.M., Kouassin, G.K., Anantheswaran, R.C., Floros, A.J., Knabel, S.J. (2008). Effect of wáter activity on inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactate dehydrogenase during high pressure processing, *Int. J. Food Microbiology*, vol. 124, pp. 21-26.
- Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T. (2010). La teoría de obstáculos como estrategia para incrementar la seguridad alimentaria en jamón curado loncheado, *Eurocarne*, vol. 192; pag. 52-59.

- Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T. (2011). High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the food safety objectives for *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology*.
- Hernando, B. R. (2006). *Conservación de productos cárnicos crudos curados mediante envasado con atmósferas modificadas y altas presiones*. Tesis Doctoral. Burgos, España: Universidad de Burgos.
- Herrero, A.M., Romero de Avila, M.D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas, *Rev Med Universidad Navarra*, vol. 50, pp. 71-74.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality, *Trends in Food Science & Technology*, vol. 9, pp. 197-203.
- Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F., Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms, *Food Technology*, vol. 43, pp. 99- 107.
- Holzapfel, W.H. (1998). The gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In: Davies, A; Board, R. *The microbiological of meat and poultry*, (pp 35-74). Reino Unido: Blackie Academic & Professional.
- Holzapfel, W.H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small- scale fermentation in developing countries, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 75, pp. 197-212.
- Hugas, M., Roca, M. (1997a). Selección de cepas autóctonas de *Staphylococcus* spp. Como cultivos iniciadores en enbutidos cárnicos, *Eurocarnes*, vol.54, pp. 1-3.
- Hugas, M., Monfort, J. M. (1997). Bacterial Starter Cultures for meat fermentation, *Food Chemistry*, vol. 59, pp. 547-554.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic Lactic acid Bacteria for the preservation of meat and meat products, *Meat science*, vol. 49; pp. S139-S150.
- Hugas, M, Monfort, J.M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a novel technology, *Meat Science*, vol. 62, pp. 359-371.
- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C., Cocolin, L. (2006). Ecology and Dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages, *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 29, pp. 480-486.
- ICMSF (1996). *Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens ICMSF*. E.U.A.: Blackie Academic & Professional.
- ICMSF (2011). *Microorganisms in foods 8. Use of Data for Assessing Process Control and product acceptance*. E.U.A: Springer.
- Incze, K. (2007). European Products In Toldrá, F. *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 307-320). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.

- ISO 11290-2 (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes- Part 2- Enumeration method*. The International Organization for Standardization. Suíça.
- ISO 15214- (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal methods for de detection and enumeration of mesophilic lactic acid bacteria- Colony-count technique at 30°C*. The International Organization for Standardization. Suíça.
- ISO 6887-1 (1999). *Microbiology of food and animal feeding stuffs- preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*. The International Organization for Standardization. Suíça.
- ISO 6887-2 (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs- preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 2- Specific rules for the preparation of meat and meat products*.The International Organization for Standardization. Suíça.
- ISO 21528-2 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae- Colony- count method*. The International Organization for Standardization. Suíça.
- Jay, J.H., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005). Other Food Protection Methods. In Jay, J.H., Loessner, M.J., Golden, D.A, *Modern Food Tecnology*, (7th ed). (pp. 457-470). Califórnia, E.U.A: Food Science Texts Series.
- Jofré, A., Aymerich, T., Garriga, M. (2008). Assessment of the effectiveness of antimicrobial packaging combined with high pressure to control *Salmonella* spp in cooked ham. *Food Control*, vol. 19, pp. 634-638.
- Jofré, A., Aymerich, T., Bover-Cid, S., Garriga; M. (2010). Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteric* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa, *International Microbiology*, vol. 13, pp. 105-112.
- Josephsen, J., Jespersen, L. (2006). Fermented Food and Starter Cultures. In. Hui, Y.H. *Handbook of food Science, Technology and engineering* (pp.1 – 14(177)). Nova York: Taylor & Francis.
- Jung, S; Samson, C.T., de Lamballerie, M. (2011). High hydrostatic pressure food processing. In Proctor, A., *Alternatives to conventional food processing*, (pp. 254-296). E.U.A: RSC Publishing.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B. (1998). Factors influencing death and injury of food-borne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization, *Food Microbiology*, vol. 15, pp. 207-214.
- Koseki, S., Mizuno, Y., Yamamoto, K. (2007). Predictive modeling of the recovery of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked ham after high pressure processing, *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 119, pp. 300-307.
- Lacasse, D. (1995). Introdução à Microbiologia Alimentar. In *Toxi-infecções Alimentares* (pp. 389-460). Portugal: Instituto Piaget.

- Latorra - Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Aymerich, T., Marcos, B., Vidal-Carou, M.C., Garriga, M. (2007). Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture, *Meat Science*, vol. 75, pp.460-469.
- Lattore - Moratalla, M.L., Bover- Cid, S., Talon, R., Garriga, M., Zanardi, E., Ianerti, A., Fraqueza, M.J., Elias, M., Drosinos, E.H., Vidal-Carou, M.C. (2010). Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing, *Food Science and Technology*, vol. 43, pp. 20-25.
- Lawrie, R.A. (1998). *Ciencia de la Carne* (3th ed),. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Lebert, I., Leroy, S., Talon, R. (2007). Microorganisms in traditional fermented meats. In Toldrá, F., *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp.113-124). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Food Science & Technology*, vol. 15, pp. 67-78.
- Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 106, pp. 270-285.
- Loey, A.V., Smout, C., Hendrickx, M. (2003). High hydrostatic Pressure Technology In food preservation. In. Zeuthen, P., Bagh-Sorensen, L. *Food Preservation Technique*, (pp. 428-441). E.U.A: Food Science and Technology.
- López, M.C. (1999). Utilización de cultivos iniciadores en la elaboración de embutidos, *Eurocarnes*, vol. 80, pp. 35-45.
- López, M.C. (1999a). Productos Cárnicos Fermentados: Elaboracion y consumo, *Eurocarnes*, vol. 78, pp. 1-11.
- López-Caballero, M.E., Carballo, J., Solas, M.T., Colmenero, J. (2002). Responses of *pseudomonas fluorescens* to combined high pressures/temperature treatments, *Eur. Food Res Technol*, vol. 214, pp. 511-515.
- Lucke; F-K. (1998). Fermented sausages. In Wood, B, J.B, *Microbiology of fermented foods* (2th ed, pp.441-472). Reino Unido: Elsevier Applied Science Publishers.
- Lucke, F-K. (2000). Fermented Meat. In Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. *Microbiological safety and quality of foods*, (pp. 420-444). E.U.A: An Aspen Publishers.
- MacDonald, K., Sun, D.W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 52, pp. 1-27.
- Mantilla, S.P.S., Franco, R.M., Oliveira, L.A.T., Santos, E.B., Gouvêa, R. (2007). Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origen animal, *Revista da FZVA*, vol. 14, pp. 189-192.
- Marcos, B., Aymerich, T., Garriga, M. (2005).Evaluation of High pressure processing as an additional hurdle to control *Listeria monocytogenes* and *Salmonella entérica* in low-acid fermented sausages, *Journal of food Science*, vol. 70, pp. 339-344.

- Marcos, B., Aymerich, T., Guardia, M.D., Garriga, M. (2007). Assessment of High Hydrostatic Pressure and *starter* cultura on the quality properties of low acid fermented sausages, *Meat Science*, vol. 76, pp. 46-53.
- Marcos, B., Aymerich, T., Monfort, J.M., Garriga, M. (2008). High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham, *Food Microbiology*, vol. 25, pp. 177-182.
- Marques, J., Vila- Real, H.J., Alfaia, A.J., Ribeiro, M.H.L. (2007). Modelling of the high pressure- temperatura effects on naringin hydrolysis base don response surface methodology, *Food Chemistry*, vol. 105, pp. 504-510.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 107; pp. 148-158.
- Martín, A., Colí, B., Aranda, E., Benito, M.J., Córdoba, M.G. (2007). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from iberian dry-cured sausages, *Meat Science*, vol. 75, pp. 696-708.
- Mata, C; Ferreira, J., Fernández-Salgueiro, J., Gómez, R. (2001). Elaboración de Salsichones con cultivos iniciadores y bioconservadores. Características químicas y microbiológicas, *Eurocarnes*, vol. 97, pp. 1-9.
- Maurici, M.H. (1994). La Biotecnología en la industria cárnica. Investigación agraria en Cataluña, *Revista agropecuaria*, vol. 745, pp. 662-663.
- Mejia, C.M.A., Mollina, D.A.R. (2008). Microbiología de la Carne. Acedido em Ag. 10, 2011, disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/8717475/Cap-1-Microbiologla-de-La-Carne>
- Min, S., Zhang, Q.H. (2007). Packaging for High-pressure processing, irradiation and pulsed electric field processing. In Han, J.H. *Packaging for nonthermal Processing of Food*, (pp 67-83). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.
- Moerman, F., Mertens, B., Demey, L., Huyghebaert . (2001). Reduction of *Bacillus subtilis*, *Bacilus stearothermophilus* and *streptococcus faecalis* in meat batters by temoerature-high hydrostatic pressure pasteurization, *Meat Science*, vol. 59, pp. 115-125.
- Molina-Hoppener, A., Doster, W., Vogel, R.F., Ganzle, M.G. (2001). Protective effect of sucrose and sodium chloride los *lactococcus lactis* during sublethal and lethal High-pressure Treatments, *Applied and Environmental microbiology*, vol. 70, pp. 2013- 2020.
- Montel, M.C. (1999). Fermented Meat Products. In Robison, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (Eds), *Encyclopedia of food microbiology*, (pp 744-752). San Diego: Academic press,
- Moretti, V.A., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M.A., Panseri, S., Pirone, G., Gandini, G. (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical sicilian ripened in different conditions, *Meat Science*, vol. 66, pp. 845- 854.

- Morot-Bizot, S., Talon, R., Leroy-Setrin, S. (2003) Development of Specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosum* a species used in food fermentation, *Journal of microbiological methods*, vol. 55, pp. 279-286.
- Mor-Mur, M., Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: physical properties and sensory analysis, *Meat Science*, vol. 65, pp.1187-1191.
- Murchie, L.W., Cruz-Romero, M., Kerry, J.P., Linton, M., Patterson, M.F., Smiddy, M., Kelly, A.L. (2005). High pressure processing of Shellfish: A review of microbiological and other quality aspects, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 6, pp. 257-270.
- Nguyen, L.T., Balasubramaniam, V.M. (2011). Fundamentals of food processing using High pressure In Zhang, H.Q., Barbosa-Cánovas, G., Balasubramaniam, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D., Yuan, J.T.C., *Nonthermal processing technologie for food*, (pp 3-19). Iowa, E.U.A: Wiley. Blackwell.
- Nieto, A.I.A., Moller, J., Adamsen, C., Ruiz, J., Skibsted, L. (2004). Efecto de la aplicación de alta presión hidrostática (APH) sobre el color y estabilidad oxidativa de jamón ibérico loncheado y envasado en atmósfera modificada, *Eurocarne*, vol. 131, pp. 1-6.
- Niinivaara, F.P. (1991). Starter Cultures in the processing of Meat by Fermentation and Dehydration, *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, vol. 44, pp. 59-63.
- Niskanen, A., Nurmi, E. (1976). Effect of Starter cultura on Staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 31, pp. 11-20.
- Norton, T; Sun, D-W. (2008). Recent Advances in the Use of High pressure as an effective processing technique in the food industry, *Food Biopress technology*, vol. 1, pp. 2-34.
- NP 4405 (2002). *Norma Portuguesa para Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C*. Instituto Português da Qualidade.
- NP 3441(2008). *Carnes e productos cárneos. Medição do pH. Método de Referência*. Instituto Português da Qualidade.
- Nurfer, U., Stepham, R., Tasara, T. (2007). Growth characteristics of listeria monocytogenes, listeria welshimeri and listeria innocua strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7°C, *Food Microbiology*, vol. 24, pp. 444-451.
- Ockerman, H.W., Basu, L. (2007). Production and consumption of fermented meat products. In Toldrá, F, *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 9-15). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.
- Olivares, A., Navarro, J.L., Flores, M. (2011). Effect of fat content on aroma generation during processing of dry fermented sausages, *Meat Science*, vol. 87, pp. 264-273.
- Ordoñez, J.A., Hoz, L. (2007). Mediterranean Products In Toldrá, F. *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 333- 348). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.

- Orsi, R.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology and phenotypic characteristics, *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 301, pp. 79-96.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-cánocas, G., Swanson, B.G. (1999). High-pressure Treatment in Food preservation. In Rahaman, M.S. *Handbook of Food preservation* (pp. 533- 570). Nova York: Marcel Dekker.
- Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N., Litopoulou - Tzanetaki, E. (2002). Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented Sausage, *Food Microbiology*, vol.19, pp. 441-449.
- Paramithiotis, S., Drosinos, E.H., Sofos, J.N., Nychas, G.J.E. (2010). Fermentation: Microbiology and Biochemistry In Toldrá, F. *Handbook of meat processing*, (pp. 185-198). Ames, Iowa, E.U.A: Willey- Blackwell.
- Patterson, M. (1999). High Pressure Treatment of food In Robinson, R.K; Batt, C.A., Patel, P.D, *Encyclopedia of food microbiology*, (pp. 1059 - 1065). Reino Unido: Academic Press.
- Patterson, M.F. (2005). A review: Microbiology of Pressure – Treated foods, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 98, pp. 1400 - 1409.
- Patterson, M.F., Ledward, D.A., Rogers, N. (2006). High Pressure Processing. In Brennan, J.G, *Food Processing Handbook* , (pp. 173-196). Reino Unido: Willey.
- Pedro, H.A.L., Alfaia, A.J., Marques, J., Vila- Real, H.J., Calado, A., Ribeiro, M.H.L. (2007). Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high-pressure, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, pp. 442-446.
- Pereda, J.A.O., Cosano, G.Z., Navarro, A.B., Carballeira, A.O., López, B.G. (2004). La aplicación de altas presiones en la carne, *Revista del Comité*, pp. 36-71.
- Peres, F. (2000). Tecnologia dos productos cárneos. In Aulas Práticas de Tecnologia. Castelo Branco: Escola Superior Agrária.
- Petaja-Kanninen, E., Puolanne, E. (2007). Principles of meat fermentation. In Toldra, F, *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 31-36). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.
- Porto-Fett, A.C.S., Call, J.E., Shoyer, B.E., Hill, D.E., Pshebniski, C., Cocoma, G.J., Luchansky, J.B. (2010). Evaluation of fermentation drying and/or high pressure processing on viability of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp, and *trichinella spiralis* in raw pork and genoa salami, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 140, pp. 61-75.
- Quintavalla, S. (2010). Plant Cleaning and Sanitation. In Toldrá, F, *Handbook of meat Processing*, (pp. 287- 297). Iowa, E.U.A: Willey Blackwell.
- Raengpradub, S., Wiedmann, M., Boor, K, J. (2008). Comparative Analysis of the σ Dependent Stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions, *Applied Environmental Microbiology*, vol. 74, pp. 158-171.

- Rantsiou, K., Cocolin, L. (2006). New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 108, pp. 255-267.
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G., Cocconcelli, P.S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 84, pp. 1043-1049.
- Regulamento CE nº 258/97 de 27 Janeiro, *JO L 043*. Comissão Europeia. Bruxelas
- Regulamento CE nº 1441/2007 de 5 de Dezembro, *JO L 322*. Comissão Europeia. Bruxelas.
- Regueiro, J.A.G., Clariana, M., Diaz, I. (2008). Efecto del tratamiento com altas presiones en la composicion de ácidos grasos en jamon curado loncheado, *Eurocarnes*, vol. 163, pp. 1-4.
- Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alfonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of High Hydrostatic pressure processing: A review, *LWT, Food Science and Technology*, vol. 44, pp. 1251-1260.
- Ribeiro, A.M.R. (1978). Tecnologia de Transformação de Carnes. In *1º seminário da Indústria e Tecnologia de Carnes*. Lisboa: Escola Superior de Medicina Veterinária.
- Ribeiro, M.H.L., Afonso, C., Vila-Real, H.J., Alfaia, A.J., Ferreira, L. (2010). Contribution of response surface methodology to the modeling of naringin hydrolysis by naringinase Ca-alginate beads under high pressure, *LWT-Food Science and Technology*, vol. 43, pp. 482- 487.
- Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou M., Federighi, M. (2000). Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance, *Food Microbiology*, vol. 17, pp. 375-382.
- Rivalain, N., Roquain, J., Demazeau, G. (2010). Development of High Hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect biological structures and potential applications in Biotechnologies, *Biotechnology Advances*, vol. 28, pp. 659-672.
- Robinson, R., Batt, C.A., Patel, D.P. (1999). Listeria. In Batt, C.A, *Encyclopedia of Food Microbiology*, (pp. 1195-1198). Reino Unido: Academic Press.
- Roncalés, P. (2007) Additives. In Toldrá, F, *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 77-86). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing
- Rossi, F; Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G. (2001). Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 90, pp. 365-371.
- Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán, M.D., Rovira, J., Jaime, I. (2006). Efecto del tratamiento com Altas Presiones Hidrostáticas sobre la conservación de la “Cecina de León”, *Alimentaria*, vol. 372, pp. 122-123.

- Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán M.D., Rovira, J., Jaime, I. (2007). Effect of High pressure preservation on quality of dry cured beef “Cecina de Leon”, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 8, pp. 102- 110.
- Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán, M.D., Rovira, J., Jaime, I. (2007a). The effects of high pressure treatment and of storage periods on the quality of vacuum-packed “salchichón” made of raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 8, pp. 180-187.
- Ruiz-Capillas, C., Colmenero, J.F., Carrascosa, A.V., Muñoz, R. (2007). Biogenic amine production in Spanish dry- cured “chorizo” sausage treated with high- pressure and kept in chilled storage, *Meat Science*, vol. 77, pp. 365-371.
- Ruiz, J (2007). Ingredients. In Toldrá, F, *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 59-76). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.
- Sachéz-Molinero, F., Arnau, J. (2008). Effect of the inoculation of a starter culture and vacuum packaging (during resting stage) on the appearance and some microbiological and physicochemical parameters of dry-cured ham, *Meat Science*, vol. 79, pp. 29-38.
- Samelis, J., Metaxopoulos, A., Vlassi, M., Pappa, A. (1998). Stability and safety of traditional greek salami. A microbiological ecology study, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 44, pp. 69-82.
- Sangronis, E., Pothakamury, U., Ramos, A.M., Ibaraz, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1997). La Alta presión Hidrostática: Una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos, *Alimentaria*, vol. 33, pp. 33-43.
- Simpson, R.K., Gilmour, A. (1997). The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods, *Food Microbiology*, vol. 14, pp. 567-573.
- Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing, *Food Science & Technology*, vol. 9, pp.152-158.
- Stollewerk, K., Jofré, A., Comaposada, J., Ferrini, G., Garriga, M. (2011). Ensuring food safety by an innovative fermented sausage manufacturing system, *Food Control*, vol. 22, pp. 1984-1991.
- Sousa, M.C., Ribeiro, A.M.R. (1983). Chouriço de Carne Português: Tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica, *Industria Alimentar*, vol. 1, pp.14-23.
- Suzuki, A., Kim, K., Tanji, H., Nishiumi, T. (2006). Application on high hydrostatic pressure to meat and meat processing. In Nollet, L.M., Toldrá, F, *Advanced Technologies for Meat Processing*, (pp. 193- 218). Nova York: Taylor & Francis Group.
- Talon, R., Leroy, S. (2006). Latest Developments in meat bacterial starters. In Nollet, L.M.L., Toldrá, F, *Advanced Technologies for meat processing*, (pp. 401-413). Nova York: Taylor & Francis Group.
- Talon, R., Leroy, S., Lebert, I. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters, *Meat Science*, vol. 77, pp. 55-62.

- Talon, R., Leroy, S., Lebert, I., Giammarinaro, P., Chacornac, J-P., Latorre-Moratalla, M., Vidal - Carou, C., Zanardi, E., Conter, M., Leecque, A. (2008). Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter culture, *International journal of food microbiology*, vol. 126, pp. 227-234.
- Talon, R., Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations, *Meat Science*, vol. 89, pp. 303-309.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Samaras, F.J., Galiatsatou, P., Malidis, C.G. (2008). Temperature-assisted high hydrostatic pressure inactivation of *Staphylococcus aureus* in a ham model system: evaluation in selective and nonselective medium, *Journal of Applied Microbiology*, vol.104, pp. 1764-1773.
- Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Pérez-Lámela, C., Vázquez, M., Simal-Gándarra, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos, *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, vol.3, pp. 66-80.
- Thévenot, D., Delignette - Muller, M.L., Christieans, S., Vernozzy-Rozand, C. (2005). Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated french sausages. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 101, pp. 189-200.
- Thévenot, D., Dernburg, A., Vernozzy-Rozand, C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products, *Journal Applied Microbiology*, vol. 101, pp, 7-17.
- Tholozan, J.L., Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M., Tisser, J.P. (2000). Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, pp. 202-212.
- Ting, E. (2011). High-Pressure processing Equipment Fundamentals. In: Zhang, H.Q., Barbosa-Cánovas, G., Balasubramaniam, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D., Yuan, J.T.C, *Nonthermal processing technologies for food*, (pp.20-27). Ames, Iowa, E.U.A: Wiley - Blackwell.
- Toldrá, F. (2006). Meat Fermentation. In Hui, Y.H, *Handbook of Food Science, Technology and engineering*, (vol.4, pp. 1-9 (181)). Nova York: Taylor& Francis.
- Toldrá,F., Nip, W-K., Hui, Y.H (2007), Dry fermented sausages: An Overview. In Toldrá, F, *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 321-325). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.
- Torrezan, R. (2003). Uso da tecnologia de alta pressão para a inativação de microrganismos em produtos cárneos, *Curitiba*, vol. 21, pp. 249-266.
- Torres, J.A., Velázquez, G. (2005). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods, *Journal of Food Engineering*, vol. 67, pp. 95-112.
- Varman, A., Sutherland, J.P. (1998). Embutidos Fermentados. In Varman, A., Sutherland, J.P, *Carne y productos cárnicos: Tecnología Química Microbiología*, (2th ed, pp. 307- 345). Zaragoza, España: Editorial Acribia.

- Velazquéz, G; Vázquez, P; Vázquez, M; Torres, J.A (2005). Aplicaciones del procesado de alimentos por Alta Presión, *Ciencia Y tecnología Alimentaria*, vol. 4, pp.343-352.
- Veiga, A. (2008). *Listeria monocytogenes* em alheiras, *Segurança e Qualidade Alimentar*, vol. 4, pp. 11-13.
- Vercammen, A., Vanoirbeek, K.G.A., Lurquin, I., Steen, L., Geomaere, O; Szczepaniak, S., Paelinck, H., Hendrickx, M.E.G., Michiels, C.W. (2011). Shelf-life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives, *Innovative Food Science and emerging technologies*, vol. 12, pp.407-415.
- Verluyten, J., Leroy, F., Lus de Vuyst. (2004). Effects of different spices used in production of fermented sausages on growth of and Curvacin A Production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, pp. 4807- 4813.
- Vila - Real, H.J., Alfaia, A.J., Calado, A.R.T., Ribeiro, M.H.L. (2007). High pressure-temperature effects on enzymatic activity: naringin bioconservation, *Food Chemistry*, vol. 102, pp. 565-570.
- Vila-Real, H., Alfaia, A.J., Philips, R.S., Calado, A.R., Ribeiro, M.H.L. (2010). Pressure-enhanced activity and stability of α -L- rhamnosidase and β -D-glucosidase activities expressed by naringinase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol.65, pp. 102-109.
- Vignolo, G., Fontana, C., Fadda, S. (2010). Semidry and dry fermented sausages. In Toldrá, F, *Handbook of meat processing*, (pp.379-398). Iowa, E.U.A. Willey-Blackwell.
- Vlaemyneck, G., Lafarge, V., Scooter, S. (2000). Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, pp.430-441.
- Warriner, K., Namvar, A. (2009). What is the hysteria with Listeria?, *Trends in Food Science & Technology*, vol. 20, pp. 245-254.
- Wells-Bennik, M., Karatzas, K.A., Moezelaar, R., Abee, T. (2008). *Listeria monocytogenes* High hydrostatic Pressure. Resistance and Survival Strategies. In Michielis, C., Bartlett, D.M., Aertsen, A, *High-Pressure Microbiology*, (pp.101-115). Washigton, E.U.A: ASM Press.
- Wigley, R.C. (1999). Starter Cultures. In Robinson, R.K; Batt, C.A; Patel, P.D, *Encyclopedia of food microbiology*, (pp. 2084-2095). San Diego, E.U.A: Academic Press.
- Yordanov, D.G., Angelova, G.V. (2010). High pressure processing for foods preserving, *Biotechnol. & Biotechnol*, vol. 24, pp. 1940-1945.
- Yousef, A.E., Carlstrom, C. (2006). *Microbiología de los alimentos. Manual de Laboratorio*, (1th ed). Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Wu, Y.C., Chi, S.P. (2007). Casings. In Toldrá, F., *Handobook of fermented meat and poultry*, (pp. 101-110). Iowa, E.U.A: Blackwell Publishing.

- Zhou, G.H., Xu, X.L., Liu, Y. (2010). Preservation Technologies for fresh meat. A review, *Meat Science*; vol. 86, pp. 119-128.
- Zhu, M., Du, M., Cordray, J., Ahn, D.U. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* Contamination in Ready-to-eat Meat products, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, vol. 4, pp. 34-42.
- Zukál, E., Inczé, K, (2010). Drying. In Toldrá, F, *Handbook of meat processing*, (pp. 219-229). Iowa, E.U.A: Wiley- Blackwell.