



Estudo do prazo de validade em carne fresca de coelho

Mara Raquel Lino Pereira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar – Tecnologia dos Produtos Animais

Orientador: Professor Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira

Júri:

Presidente: Doutor Virgílio Borges Loureiro, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria João Ramos Fraqueza, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Teresa de Jesus Silva Matos, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2009

Agradecimentos

A realização do meu relatório do trabalho de mestrado só foi possível devido à colaboração de muitas pessoas a quem quero prestar o meu mais sincero obrigado:

Ao Professor Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, por me ter aceite como orientanda, pelo apoio que me prestou e pelo optimismo e entusiasmo com que conduziu o trabalho e por tudo o que me ensinou.

À Administração do Centro de Abate de Coelhos que me financiou o projecto e facultou as amostras de coelhos.

À Professora Doutora Maria João Fraqueza pela bibliografia que me disponibilizou.

À Eng.^a Ana Carla Silva e ao Eng.^o António Lourenço pelo apoio prestado no trabalho de laboratório.

Ao Dr. André Barata por ter identificado as leveduras presentes na carne de coelho.

À D. Helena e D. Manuela, e a todos os colegas pelo auxílio prestado na realização dos trabalhos laboratoriais.

A todos os meus amigos que me acompanharam e sempre me encorajaram ao longo desta fase de realização do meu trabalho, em especial à Sandra Luís

Finalmente, aos meus Pais, Irmã, Cunhado e Sobrinhas, pelo apoio, dedicação e amizade sempre presentes.

Resumo

Os indicadores microbiológicos mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios, *Pseudomonas*, bactérias lácticas, bolores e leveduras e *Enterobacteriaceae* foram avaliados em carcaças de coelho acondicionadas a granel (CG), embaladas (CE) e embaladas sob atmosfera modificada (CATM), armazenadas a 4 °C durante 8, 16 e 21 dias, respectivamente. Nas amostras iniciais, os grupos predominantes foram as *Pseudomonas* e as bactérias lácticas, seguindo-se os bolores e leveduras. O CG apresentou aumentos mais rápidos da flora microbiana, em especial dos psicrotróficos aeróbios. O efeito inibidor da atmosfera modificada foi observado através do aumento da fase lag de 4 para 8 dias, em relação aos mesófilos e às bactérias lácticas, ao passo que não foi observado crescimento em *Pseudomonas*. Para um limite máximo de contaminação de 6 log de UFC/ g, foram determinados prazos de validade para o CG, CE e CATM de 9, 11 e 17 dias, considerando uma contaminação inicial de 4 log UFC/g. O nível da contaminação inicial foi o principal factor limitante do prazo de validade dos produtos analisados. No *challenge test* efectuado verificou-se que apenas a *Listeria innocua* demonstrou capacidade para crescer em carne de coelho refrigerada, ao contrário do observado para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp.

Palavras – chave: Carne de coelho fresco, atmosfera modificada, deterioração microbiana, prazo de validade

Abstract

The microbial indicators aerobic mesophilic bacteria, aerobic psychrophilic bacteria, *Pseudomonas*, lactic acid bacteria, moulds and yeasts and *Enterobacteriaceae* were assessed in rabbit carcasses packed under bulk (CG), on air (CE) and modified atmosphere (CATM), stored at 4 °C over 8, 16 and 21 days, respectively. In initial samples the predominant groups were *Pseudomonas* and lactic acid bacteria, with a high component of moulds and yeasts. CG had a high growth of microbial flora (3 – 4 days), in special of aerobic psychrophilic. The inhibitor effect of modified atmosphere packaging was observed through increase of lag stage from 4 to 8 days, in relation of aerobic mesophilic and lactic acid bacteria, while it wasn't observed growth of *Pseudomonas*.

To a limit of 6 log CFU/g, which limits shelf-life to CG, CE and CATM of 9, 11 and 17 days, when initial contamination was 4 log CFU/g. The shelf-life of analysed products was limited by the initial contamination. In challenge test realized it was observed that only *Listeria innocua* demonstrated capacity to growth in refrigerated rabbit meat, in contrast with that observed with *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp.

Keywords: Rabbit meat, modified atmosphere, microbial spoilage, shelf-life

Abstract

With the grow of rabbit meat consumption and the absence of food safety and quality legislation of rabbit meat, it was necessary to make a study about microorganisms presents in this food to make possible to determine its shelf-life.

Rabbit meat can be contaminated during slaughter which has a significant effect on the bacterial status of carcasses. The contamination can occur with the bleeding, through contact skin of animals, feet and intestinal contents of animal, floor, equipments and personnel.

This study was performed with three types of presentation of rabbit meat to final consumer: bulk (CG), packaging (CE) and modified atmosphere packaging (CATM), stored at 4 °C, over 8, 16 and 21 days respectively. During storage we study aerobic mesophilic bacteria, aerobic psychrophilic bacteria, lactic acid bacteria, moulds and yeasts, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas*. In rabbit packaging with modified atmosphere were tested two types of films with different thickness, 35 µm and 45 µm, and it was verified that film with 45 µm of thickness lead to one product safety for more time.

The counts of microbiological indicators showed a high initial variability, with a range of values of 2 or more logarithmic cycles for the counts of aerobic mesophilic, aerobic psychrophilic, *Pseudomonas*, moulds and yeasts and *Enterobacteriaceae*. The exception was the count of lactic acid bacteria, which ranged 1,5 log CFU/g. The counts of *Enterobacteriaceae* show a high variability but weren't found in 6 from 12 analysed samples.

We observed that the predominant groups were *Pseudomonas* and lactic acid bacteria, with a high component of moulds and yeasts. The initial contamination of carcasses was related with the initial contamination of rabbits and with manipulation during slaughter, this factor is fundamental to determinate shelf-life.

By testing realized all kinds of packaging, we showed growing of aerobic mesophilic, aerobic psychrophilic, *Pseudomonas* and lactic acid bacteria. The moulds and yeasts kept stable values of counts, below 5 log CFU/g, and *Enterobacteriaceae* demonstrated a trend to grow, though not always had been detected.

CG had a high growth of microbial flora (3 – 4 days), in special of aerobic psychrophilic bacteria. The inhibitor effect of modified atmosphere packaging was observed through increase of lag stage from 4 to 8 days, in relation of aerobic mesophilic and lactic acid bacteria, while it wasn't observed growth of *Pseudomonas*. All microbial indicators showed a similar growth and increment in the different packaging, in CG the aerobic psychrophilic show a rate higher than other packagings.

The shelf-life was determined to admit as limit 6 log CFU/g, in function of growth rate of assessed microorganisms and in function of the initial contamination. If the initial

contamination was 4 log CFU/g the shelf-life to CG, CE and CATM was, respectively, 9, 11 and 17 days. But if the initial contamination was 5 log CFU/g the shelf-life to CG, CE and CATM was, respectively, 6, 7 and 12 days, respectively. The shelf-life of analysed products was limited by the initial contamination, the microorganism that limited the shelf-life of CG was aerobic psychrophilic, to CE was *Pseudomonas* and to CATM was lactic acid bacteria. In pH determination it was possible to verified that this parameter show small variation during the tests, between $6,01 \pm 0,06$ and $6,36 \pm 0,20$.

During challenge test we inoculated *E. coli*, *Salmonella*, *St. aureus* and *Listeria innocua*, and we saw that the only pathogenic that grew in refrigerated rabbit meat was *Listeria innocua*.

In industrial context this work enable understand which improvements are necessary to implement in slaughterhouse. Selection of rabbit suppliers with better quality to obtain lower initial contamination levels is required.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Produção de carne de coelho.....	1
1.2 Características de qualidade da carne de coelho.....	2
1.3 A conservação da carne.....	4
1.3.1 Refrigeração.....	5
1.3.2 Embalagem sob atmosfera modificada.....	6
1.3.2.1 Gases utilizados.....	7
1.3.2.2 Materiais de embalagem.....	8
1.4 Microrganismos presentes nas carnes verdes.....	9
1.4.1 Bactérias lácticas ácidas.....	9
1.4.2 Bolores e leveduras.....	10
1.4.3 <i>Enterobacteriaceae</i>	11
1.4.4 <i>Pseudomonas</i>	12
1.4.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.4.6 <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.4.7 <i>Escherichia coli</i>	15
1.4.8 <i>Salmonella</i> spp.....	16
1.5 Avaliação do prazo de validade.....	17
1.5.1 Técnicas de determinação do prazo de validade	19
1.5.1.1 Determinação directa.....	19
1.5.1.2 Determinação indirecta e previsão do prazo de validade.....	20
1.5.1.2.1 <i>Accelerated shelf-life testing</i> (ASLT).....	20
1.5.1.2.2 Modelos preditivos.....	20
1.5.2 <i>Challenge test</i> microbiológico.....	20
2. Enquadramento e objectivos.....	22
3. Materiais e métodos.....	23

3.1 Colheita e embalagem das carcaças.....	23
3.2 Preparação da amostra.....	24
3.3 Análises químicas.....	26
3.3.1 Determinação de pH.....	26
3.4 Análises microbiológicas.....	26
3.4.1 Determinação de mesófilos e psicotróficos aeróbios.....	26
3.4.2 Determinação de bactérias lácticas.....	26
3.4.3 Determinação de bolores e leveduras.....	27
3.4.4 Determinação de <i>Enterobacteriaceae</i>	27
3.4.5 Determinação de <i>Pseudomonas</i>	28
3.5 Determinação do prazo de validade.....	28
3.6 <i>Challenge test</i>	29
3.6.1 Colheita de carcaças.....	29
3.6.2 Microrganismos e preparação do inóculo.....	29
3.6.3 Preparação da amostra.....	30
3.6.4 Análises microbiológicas.....	30
3.6.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.6.4.2 <i>Listeria innocua</i>	30
3.6.4.3 <i>Escherichia coli</i>	31
3.6.4.4 <i>Salmonella typhimurium</i>	31
3.7 Análises estatísticas.....	31
4. Resultados e discussão.....	32
4.1 Carga microbiana nas carcaças de coelho.....	32
4.2 Relação entre os indicadores microbiológicos.....	34
4.3 Evolução da flora microbiana ao longo do tempo de incubação.....	35
4.4 Determinação das taxas de crescimento e do incremento.....	38
4.5 Determinação do prazo de validade.....	39

4.6 Evolução do pH.....	42
4.7 <i>Challenge test</i>	42
4.8 Aplicação industrial dos estudos do prazo de validade.....	44
4.8.1 Determinação de especificações industriais.....	44
4.8.2 Verificação do nível de contaminação após o prazo de validade.....	45
4.9 Caracterização taxonómica.....	46
4.9.1 Leveduras.....	46
4.9.2 Bactérias.....	46
5. Conclusões.....	48
5.1 Trabalhos futuros.....	50
6. Bibliografia.....	51
7. Cibergrafia.....	57
Anexos.....	58
Anexo I – Características técnicas dos filmes utilizados nos ensaios – Toplex HB 35 e Toplex HB 45.....	58
Anexo II – Evolução das contagens microbiológicas para a carne de coelho fresco a granel, durante 8 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio \pm desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado)	59
Anexo III – Evolução das contagens microbiológicas para a carne de coelho fresco embalado, durante 16 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio \pm desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado)	60
Anexo IV – Evolução das contagens microbiológicas para a carne de coelho fresco embalado em atmosfera modificada, com o filme de alta barreira com 35 μ m de espessura,	

durante 21 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio \pm desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado).61

Anexo V – Evolução das contagens microbiológica para a carne de coelho fresco embalado em atmosfera modificada, com o filme de alta barreira com 35 μ m de espessura durante 21 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio \pm desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado)..... 62

Anexo VI – Evolução das contagens microbiológica para a carne de coelho fresco embalado em atmosfera modificada, com o filme de alta barreira com 45 μ m de espessura durante 21 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio \pm desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado) 63

Anexo VII – Identificação de bactérias pelas suas características morfológicas e reacções físico-químicas..... 64

Índice de tabelas

Tabela 1 – Aves e coelhos abatidos e aprovados para consumo segundo as espécies e categorias.....	1
Tabela 2 – Composição química e valor energético de carnes (para 100 g de fracção edível).....	3
Tabela 3 – Valores médios da composição em ácidos gordos (% total de ácidos gordos) e colesterol (mg/ 100 g de fracção edível) para diferentes carnes.....	3
Tabela 4 – Apresentação de algumas vantagens e desvantagens da utilização de embalagem sob atmosfera modificada.....	6
Tabela 5 – Permeabilidade e taxas de transmissão de oxigénio e vapor de água para materiais seleccionados para embalagem sob atmosfera modificada.....	9
Tabela 6 – Cronograma para a realização dos ensaios.....	24
Tabela 7 – Quantificação dos indicadores microbiológicos presentes nas carcaças de coelhos antes da embalagem (log UFC/g)	32
Tabela 8 – Resultados do teste Fisher LSD referentes ao dia zero, com todas as amostras ($p < 0,05$)	33
Tabela 9 – Correlações entre os diferentes indicadores microbiológicos.....	34
Tabela 10 – Fase lag (dias), taxa de crescimento (dias^{-1}) e incremento (dias) dos indicadores microbianos, mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios, <i>Pseudomonas</i> , bactérias lácticas e bolores e leveduras, em função do tipo de embalagem.....	38
Tabela 11 – Determinação do prazo de validade em coelho a granel em função dos indicadores microbiológicos com crescimento observado, mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios, considerando a fase lag de 4 dias e o incremento de 5,3 e 2,8 dias, respectivamente.....	40
Tabela 12 – Determinação do prazo de validade em coelho embalado em função dos indicadores microbiológicos com crescimento observado, mesófilos aeróbios, psicrotróficos	

aeróbios, <i>Pseudomonas</i> e bactérias lácticas, considerando a fase lag de 4 dias e o incremento de 5, 4,8, 3,9 e 4,3 dias, respectivamente.....	41
Tabela 13 – Determinação do prazo de validade em coelho embalado sob atmosfera modificada em função dos indicadores microbiológicos com crescimento observado, mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios e bactérias lácticas, considerando a fase lag de 8 dias e o incremento de 5,3, 6,3 e 4,5 dias, respectivamente.....	41
Tabela 14 – Nível inicial de contaminações iniciais, expressas em log UFC/g, determinadas no decorrer do ano 2008, e respectiva previsão do prazo de validade (em dias) atendendo à contaminação inicial de mesófilos a 30 °C (análises realizadas por laboratório independente).....	44
Tabela 15 – Resultados analíticos (em log UFC/g) no final do prazo de validade previsto para o coelho a granel, coelho embalado e coelho embalado sob atmosfera modificada....	45
Tabela 16 – Resultados analíticos (em log UFC/g) no final do prazo de validade previsto para o coelho a granel, coelho embalado e coelho embalado sob atmosfera modificada, com os valores médios e respectivos desvios padrão para os resultados analíticos (em log UFC/g), com 3 amostras diferentes.....	46
Tabela 17 – Resultados da identificação rápida de colónias de bactérias.....	47

Índice de figuras

Figura 1 – Meio VRBGA (à esquerda) e meio VRBGA com colónias de <i>Enterobacteriaceae</i> características (à direita)	12
Figura 2 – Meio glucose agar (à esquerda) e meio glucose agar após inoculação e incubação com <i>Pseudomonas</i> (à direita)	12
Figura 3 – Meio <i>Baird-Parker Agar</i> (à esquerda) e meio <i>Baird-Parker Agar</i> com colónias de <i>St. Aureus</i> pretas com formação de halos (à direita)	14
Figura 4 – Meio <i>Palcam Agar Base</i> (à esquerda) e meio <i>Palcam Agar Base</i> com colónias de <i>Listeria</i> pretas e com formação de halos (à direita)	15
Figura 5 – Meio <i>Chromocult PTX Agar</i> (à esquerda) e meio <i>Chromocult PTX Agar</i> com colónias de <i>E.coli</i> de coloração azulada (à direita)	16
Figura 6 – Meio <i>Brilliant Green Agar</i> (Edel and Kampeimacher) (à esquerda) e meio <i>Brilliant Green Agar</i> (Edel and Kampeimacher) com colónias de <i>Salmonella</i> de coloração rosada (à direita)	17
Figura 7 – Limitações ao prazo de validade baseadas no processo produtivo e características de formulação.....	18
Figura 8 – Diagrama simplificado do processo produtivo.....	23
Figura 9 – Preparação da suspensão – mãe (diluição 10^{-1})	25
Figura 10 – Preparação das diluições.....	26
Figura 11 – Relações entre as contagens dos indicadores microbiológicos (log UFC/g) determinadas em carcaças de coelhos antes da embalagem.....	34
Figura 12 – Evolução das contagens microbiológicas ao longo do tempo de incubação das amostras de coelho embaladas sob atmosfera modificada com filme de alta barreira com 35 μm de espessura (Mesófilos aeróbios; Psicrotróficos aeróbios; Bactérias lácticas; Bolores e leveduras; <i>Pseudomonas</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i>)	36

Figura 13 – Evolução da flora microbiana do coelho a granel (CG), embalado (CE) e embalado sob atmosfera modificada (CATM3) ao longo do tempo (A – Mesófilos aeróbios; B – <i>Pseudomonas</i> ; C – Bactérias lácticas; D – Psicrotróficos aeróbios)	37
Figura 14 – Alterações encontradas nas carcaças analisadas. a) Carcaça com odores e coloração estranhos; b) Formação de uma camada viscosa na superfície da carcaça; c) Rancificação das gorduras e d) fígado com coloração esverdeada.....	39
Figura 15 – Evolução da viabilidade das bactérias <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Listeria innocua</i> e mesófilos aeróbios após inoculação em carne de coelho, em duas experiências independentes, incubada em aerobiose a 8 °C.....	43

Lista de abreviaturas

AN – Agar nutritivo

BPA – Baird-Parker Agar

CATM – Carne de coelho fresco embalado em atmosfera modificada

CE – Carne de coelho fresco embalado

CG – Carne de coelho fresco a granel

CRB – Chloramphenicol Rose Bengal agar base

GA – Glucose agar

MAP – *Modified Atmosphere packaging* – Embalagem em atmosfera modificada

MRS – Man, Rogosa and Sharpe

PBA – Pseudomonas base agar

PAB – Palcam Agar Base

PCA – Plate count agar

PTX – Chromocult PTX Agar

TS – Triptona sal

TSB – Tryptone soya broth

UFC – Unidades formadoras de colónias

VRBGA – Violet red bile glucose agar

1. Introdução

1.1. Produção de carne de coelho

A carne é desde há muito tempo um dos principais componentes da alimentação humana, tanto como alimento por si só como, também, por ser um dos principais constituintes de muitos outros produtos alimentares (Ledward, 2000).

A carne de animais domésticos e animais selvagens é um alimento muito apreciado pela maioria da população no Mundo e representa uma importante fonte de proteína de elevada qualidade (Simonsen *et al.*, 1988). Os animais com principal importância em termos económicos são bovinos, suínos, caprinos e aves (Adams e Moss, 2000). Contudo existem nichos de mercados para outras variedades de carne, de entre elas a carne de coelho.

O consumo da carne de coelho, tal como das outras carnes, tem sido influenciado pela história e pela evolução económica e social. A produção de carne de coelho é extremamente desenvolvida em alguns países do Mediterrâneo onde o seu consumo está associado a razões culturais, tradicionais e religiosas (Zotte, 2002), pelo que o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) representa uma importante fonte de carne (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006).

Estima-se que a produção da carne de coelho a nível mundial seja superior a 1.000.000 toneladas. O maior produtor é a China (440.000 ton), seguida de Itália (222.000 ton), Espanha (115.000 ton) e França (85.200 ton) (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2004). Em Portugal a produção de coelho representa, em valores médios, 7.200 toneladas. Na tabela 1 estão representados os valores em termos de número de cabeça de animais abatidos e toneladas de carne produzidas de coelhos e aves. Estes dados referem-se apenas a abates submetidos a inspeção sanitária.

Tabela 1 – Aves e coelhos abatidos e aprovados para consumo, segundo as espécies e categorias (adaptado de Anónimo, 2007).

Espécies e categorias	Anos					
	2005		2006		2007 ^(c)	
	c ^(a)	t ^(b)	c	t	c	t
Galináceos	164.815.653	206.592	158.537.916	201.214	172.780.949	222.802
Frangos de carne	159.727.868	198.290	154.192.372	193.411	167.677.428	213.138
Perus	3.913.697	36.899	3.793.523	37.417	3.973.737	39.713
Patos	3.100.455	6.800	3.075.889	7.649	3.198.449	8.368
Codornizes	9.322.363	1.117	8.188.432	981	10.217.423	1.229
Outras aves ^(d)	7.195	36	6.467	37	495	18
Coelhos	5.528.004	6.554	5.928.026	7.101	6.630.341	8.055

(a) Cabeça.

(b) Tonelada.

(c) Os dados relativos a 2007 representam valores provisórios.

(d) Inclui: avestruzes, pintadas, gansos, pombos, faisões e perdizes

De acordo com a tabela 1, o número de coelhos abatidos para consumo humano tem tido um aumento significativo de forma a dar resposta à procura do consumidor.

1.2. Características de qualidade da carne de coelho

A qualidade da carne em termos nutricionais e sensoriais é muito afectada pelo ambiente da produção primária, pelo método produtivo, pela alimentação, pelas condições antes e durante o abate, por factores genéticos, como peso e idade com que são enviados para abate (Miller, 2000, Cavani e Petracci, 2004 e Ramírez *et al.*, 2004) e pelos próprios factores tecnológicos (Zotte, 2002). Por vezes os consumidores acrescentam outros requisitos de qualidade relacionados com o bem-estar animal e o impacto da produção a nível ambiental (Becker, 2000).

Na produção primária o maior desafio é representado pelo controlo de doenças bacteriológicas (Eady *et al.*, 2007). O controlo destas doenças passa por uma rigorosa higiene do meio envolvente das explorações (Eady *et al.*, 2007). Na produção primária tem sido verificado qual o tipo de jaulas mais adequado para a produção intensiva de coelho (Morisse *et al.*, 1999). As jaulas metálicas têm sido estudadas para produtividades elevadas a mais baixo custo, para controlo mais eficaz de parasitas e microrganismos e, conseqüentemente, obtenção de um produto mais uniforme (Hernández *et al.*, 2006). Contudo estes estudos têm-se revelado um pouco contraditórios pelo número de variáveis envolvidas tais como, a densidade habitacional, a dimensão do grupo, o tipo de materiais utilizados nas infra-estruturas, as espécies em estudo, entre outros (Bosco *et al.*, 2002).

O tipo de alimentação afecta a performance do animal vivo, o rendimento de carcaça e o *ratio* de músculo/ osso (Zotte *et al.*, 2005). Em animais monogástricos, como é o caso do coelho, a quantidade e proporção de ácidos gordos na carne e nos tecidos adiposos varia com a dieta adoptada e com o *ratio* de ácidos gordos insaturados e saturados incorporados na alimentação, o qual pode melhorar a qualidade nutricional da carne (Hernández *et al.*, 2000).

O consumidor actual tem uma preocupação acrescida pela qualidade a nível nutricional com os alimentos que consome. A carne de coelho é uma carne com elevada digestibilidade, saborosa e com baixo teor em calorias, sendo recomendada pelos nutricionistas, ainda que considerado um nicho de mercado (Cavani *et al.*, 2004).

A carne de coelho é uma carne branca, com elevado teor de proteína e rica em certas vitaminas e minerais (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006). A carne de coelho caracteriza-se ainda por ter baixos valores de gordura (em média 6,8 g/ 100 g de carne fresca) e de calorias (em média 618 kJ/ 100 g de carne fresca) por comparação com as carnes vermelhas (tabela 2), e apresenta os mais baixos níveis de colesterol (em média 53 mg/ 100 g de carne fresca)

(tabela 3). Por análise da tabela 3 verifica-se que a carne de coelho possui uma elevada proporção de ácidos gordos polinsaturados e uma baixa proporção de ácidos gordos monoinsaturados, o que faz com que a carne de coelho seja um alimento muito benéfico para a dieta humana

Tabela 2 – Composição química e valor energético de carnes (para 100g de fracção edível) (adaptado de Zotte, 2002).

	Carne de porco		Carne de vaca		Carne de vitela		Carne de frango		Carne de coelho	
	I ^(a)	M ^(b)	I	M	I	M	I	M	I	M
Água (g)	60,0–75,3	70,5	66,3–71,5	69,1	70,1–76,9	73,5	67,0–75,3	72,2	66,2–75,3	70,8
Proteína (g)	17,2–19,9	18,5	18,1–21,3	19,5	20,3–20,7	20,5	17,9–22,2	20,1	18,1–23,7	21,3
Lípidos (g)	3,0–22,1	8,8	3,1–14,6	9,0	1,0–7,0	4,0	0,9–12,4	6,6	0,6–14,4	6,8
Energia (kJ)	418–1121	639	473–854	665	385–602	493,5	406–808	586	427–849	618

a) Intervalo.

b) Média.

Tabela 3 – Valores médios da composição em ácidos gordos (% total ácidos gordos) e colesterol (mg/100g de fracção edível) para diferentes carnes (adaptado de Zotte, 2002).

	Carne de porco	Carne de vaca	Carne de vitela	Carne de frango	Carne de coelho	
					Carcaça	Mãos
Ácidos gordos esteáricos	37,00	39,50	38,90	32,00	38,60	40,10
Ácidos gordos monoinsaturados	44,40	42,40	34,40	41,00	32,80	22,70
Ácidos gordos polinsaturados	18,50	9,50	15,20	25,10	23,90	37,30
Colesterol	61,00	70,00	66,00	81,00	45,00	60,00

A carne é avaliada em termos de qualidade pelo seu nível microbiológico e pela sua aparência (James, 2000). Quando os consumidores adquirem carne para a sua alimentação procuram produtos com qualidade a nível sensorial, que sejam fáceis de preparar e com elevada relação qualidade/preço (Zotte, 2002), procurando ainda alimentos que sejam seguros aquando o acto de consumo.

Para avaliar a qualidade da carne são utilizados de forma frequente estudos sensoriais, onde se verifica que a preferência dos consumidores recai sobre aspectos como cor, aparência e textura e em menor extensão com alterações no *flavour* (Becker, 2000).

A qualidade a nível microbiológico avaliada pelo consumidor é subjectiva pois é realizada com base na presença ou ausência de odores e viscosidade (*slime*) existente na superfície da carne (James, 2000).

De entre os perigos microbiológicos há a considerar em primeiro lugar os que estão presentes nos animais vivos, como por exemplo *Salmonella*, microrganismos patogénicos que se podem encontrar na cadeia alimentar, por exemplo *Listeria monocytogenes* e algumas espécies de *Aeromonas*, e microrganismos que podem ser introduzidos pelos

manipuladores, como *Staphylococcus aureus* (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006). Esta espécie para além de poder ser introduzido pelos manipuladores representa uma grande preocupação na indústria de produção de carne de coelho pois pode também estar associados a alguma doenças que ocorrem nos coelhos como abscessos subcutâneos, mastites e problemas dérmicos (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006).

A contaminação microbiana em carne fresca é sempre uma questão importante para a segurança alimentar, contudo a informação para a carne de coelho é escassa. A carne de coelho é obtida, processada e armazenada da mesma forma que outros tipos de carne e de acordo com a legislação em vigor da União Europeia (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006). Em Portugal a produção de carnes frescas para consumo humano é controlada de acordo com o estipulado no Regulamento (CE) n.º 1441/2007 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, onde são estabelecidas três categorias de critérios microbiológicos para carnes vermelhas: satisfatória, aceitável e insatisfatória. Os valores para m e M são, respectivamente, 3,5 e 5 log ufc/ cm² para o número de colónias aeróbias e 1,5 e 2,5 log ufc/cm² para *Enterobacteriaceae*, em carcaças após preparação mas antes da refrigeração e quando analisadas pelo método destrutivo. Contudo este regulamento não faz qualquer referência a limites para os critérios microbiológicos a aplicar na carne de coelho fresca.

1.3. A conservação da carne

A produção dos animais para carne deve ser livre de microrganismos patogénicos, contudo em condições normais de produção isto não é garantido (James e James, 2002). Um animal saudável que entra no matadouro transporta consigo uma grande diversidade de microflora no tracto gastrointestinal, na pele/pêlo ou penas (Simonsen *et al.*, 1988 e Cano-Muñoz, 1991 e James e James, 2002), mas no seu interior, de modo geral, a carne é estéril (Simonsen *et al.*, 1988 e James e James, 2002), contudo pode existir um número mais elevado de microrganismos quando os animais são submetidos a situações de stress ou quando são portadores de algum tipo de infecção (Adams e Moss, 2000). Por outro lado apenas uma pequena percentagem é patogénica, afectando de forma directa a segurança alimentar e a qualidade das carcaças (James e James, 2002).

Devido ao elevado número de microrganismos presentes, todas as operações do matadouro constituem uma oportunidade para a ocorrência da contaminação da carne, pelo que é fundamental que o processo de higienização das instalações, equipamentos, utensílios e dos manipuladores seja eficaz (Simonsen *et al.*, 1988 e Adams e Moss, 2000). O músculo fresco é um ambiente favorável ao desenvolvimento microbiano e está sujeito à actividade de enzimas endógenas que causam a maturação no músculo, tornando-o mais tenro e com

um *flavour* característico (Cano-Muñoz, 1991). É essencial a redução da temperatura da carne, especialmente à superfície, de forma imediata após o abate para prevenir o desenvolvimento dos microrganismos (Cano-Muñoz, 1991) e a actividade enzimática (Simonsen *et al.*, 1988 e Adams e Moss, 2000).

1.3.1. Refrigeração

Actualmente existem diversas formas para prolongar o prazo de validade dos produtos alimentares e para prevenir a transmissão de microrganismos patogénicos ao Homem, como a refrigeração, a congelação, a secagem, a fermentação, o uso de conservantes, tratamentos térmicos, embalagens sob vácuo e atmosfera modificada e irradiação (Simonsen *et al.*, 1988).

O processo de refrigeração teve um impacto significativo para os consumidores durante os anos 80 e 90 e satisfaz os desejos do consumidor em termos de segurança, confiança e na procura de “alimentos frescos” (Dennis e Stringer, 2000). Este processo foi também estimulado pelos produtores, pois permitiu que houvesse um aumento do valor acrescentado dos seus produtos. A armazenagem em refrigeração implica que as organizações e infra-estruturas que trabalham com alimentos refrigerados assegurem a cadeia de frio desde a produção até ao consumidor final (Adams e Moss, 2000).

Em 1990 o *Institute of Food Science on Technology* (IFST) definiu alimentos refrigerados como “alimentos perecíveis, os quais para prolongar o seu período de vida útil, devem ser mantidos em intervalos de temperatura restritos e inferiores a -1 °C” (Dennis e Stringer, 2000). A carne é um alimento muito perecível, quando armazenado à temperatura ambiente (16 - 30 °C), podendo chegar ao limite do prazo de validade em horas ou poucos dias. Em condições de refrigeração o tempo de armazenagem pode ser estendido até 6 semanas para algumas carnes vermelhas (Dennis e Stringer, 2000). Um processo de arrefecimento rápido após o abate reduz a perda de humidade do produto, diminui a actividade enzimática e metabólica o que previne quanto à deterioração (Cano-Muñoz, 1991).

A refrigeração é também importante em termos de qualidade e segurança alimentar por diminuir o crescimento de microrganismos, incluindo os de deterioração e os patogénicos (Cano-Muñoz, 1991). As temperaturas de refrigeração retardam o crescimento da maioria dos microrganismos patogénicos, contudo os microrganismos continuam a crescer com uma taxa muito baixa. A flora microbiana presente na carne é muito diversificada sendo que os microrganismos psicrotróficos representam uma pequena percentagem da população inicial, mas esta torna-se predominante se a carne for mantida de forma constante a temperaturas de refrigeração (Adams e Moss, 2000). A temperatura de refrigeração é um factor crítico para a selecção da flora presente na carne, uma vez que as bactérias se desenvolvem mais

rapidamente que os fungos. A deterioração causada pelos fungos começa apenas quando as bactérias de competição são inibidas (Dennis e Stringer, 2000). A temperaturas de refrigeração os microrganismos saprófitos psicotróficos desenvolvem-se rapidamente, os mais relevantes pertencem aos géneros *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, micrococos e *Lactobacillus* (Simonsen *et al.*, 1988 e Dennis e Stringer, 2000).

1.3.2. Embalagem sob atmosfera modificada

Têm sido desenvolvidas novas técnicas de embalagem para os produtos alimentares de forma a mantê-los mais secos e limpos, facilitar o transporte a longas distâncias e reduzir a sua deterioração, tornando-os mais seguros e permitindo aumentar o seu prazo de validade. O desenvolvimento destas técnicas conduziu ao desenvolvimento de novos materiais de embalagem (Jenkins e Harrington, 1991).

A utilização da embalagem sob atmosfera modificada (MAP – *Modified Atmosphere Packaging*) tem tido uma aplicação crescente em produtos como carne e peixe, pois reduz o desenvolvimento microbiano e mantém a cores mais atractivas (Sprenger, 2007). A MAP é uma técnica de conservação que permite que o alimento seja mantido numa atmosfera com uma composição diferente da do ar (Day, 2000), pois o ar na embalagem é substituído por um ou mais gases. Esta substituição é seguida de uma selagem que previne a re-entrada do ar, sendo mantida durante a armazenagem (Farber *et al.*, 2003 e Sprenger, 2007). A armazenagem em refrigeração dos alimentos embalados em MAP é essencial para que o alimento possua qualidade, segurança e para prolongar o seu prazo de validade (Sprenger, 2007).

A MAP apresenta algumas vantagens e desvantagens, quer para o produtor como para o consumidor final, estando representadas na tabela 4.

Tabela 4 – Apresentação de algumas vantagens e desvantagens da utilização de embalagens sob atmosfera modificada (adaptado de Philipps, 1996).

	Vantagens	Desvantagens	
Consumidor	Aumento do prazo de validade; Qualidade elevada do produto; Facilita a separação, facilmente visiona o produto; Reduzida ou ausente utilização de conservantes	Os benefícios perdem-se quando a embalagem é aberta	Custos acrescidos; Requer controlo de temperatura;
Produtor	Aumento do prazo de validade; Redução nos custos de distribuição (possibilidade de haver menos entregas de longas distâncias)	Necessário equipamento específico; Diferentes composições gasosas para cada produto	Aumento do volume conduzindo a um aumento no custo de armazenagem e transporte

1.3.2.1. Gases utilizados

A mistura gasosa utilizada na MAP é escolhida de acordo com as características de cada produto, sendo de uma forma geral constituída por dióxido de carbono (CO₂), oxigénio (O₂) e azoto (N₂) (Philipps, 1996 e Day, 2000). Outros tipos de gases como óxido nítrico, dióxido de enxofre, etileno, ozono e óxido de propileno foram testados e investigados experimentalmente mas estes não foram adoptados pela indústria por questões regulamentares, questões relacionadas com a segurança no manuseamento e por questões económicas (Farber *et al.*, 2003). Para alguns alimentos, como por exemplo carnes vermelhas, é aplicada uma atmosfera com elevadas concentrações de O₂ para que haja um prolongamento da qualidade visual do produto (Betts, 2006). Philipps (1996) sugeriu dois tipos de composições gasosas da atmosfera para carne fresca: i) 30% CO₂: 30% O₂: 40% N₂ e ii) 15 – 40% CO₂: 60 – 85% O₂.

Dos três gases utilizados mais frequentemente, o CO₂ é o único que apresenta características bacteriostáticas e fungicidas, conduzindo a um retardamento no desenvolvimento de bactérias aeróbias e bolores (Day, 2000 e Farber *et al.*, 2003). De forma geral o efeito do CO₂ na MAP resulta de um aumento da fase lag e no tempo de duplicação durante a fase de crescimento logarítmico dos organismos envolvidos. A eficiência do CO₂ é influenciada pelas concentrações iniciais e finais de gás de embalagem, pelas temperaturas de armazenagem e pela microflora presente no produto (Philipps, 1996).

Philipps (1996) e Farber *et al.* (2003) sugeriram algumas hipóteses que explicam o efeito antimicrobiano do CO₂:

1. Alteração da membrana celular, que afecta a forma de obtenção e absorção de nutrientes;
2. Inibição directa das enzimas ou decréscimo na taxa de reacção enzimática;
3. Penetração na membrana bacteriana que conduz a alterações no pH intracelular;
4. Alteração directa nas propriedades físico-químicas das proteínas.

Quando existe uma baixa concentração de O₂, o CO₂ possui um baixo efeito sobre o desenvolvimento das leveduras, enquanto que o desenvolvimento das bactérias lácticas é favorecido (Day, 2000 e Farber *et al.*, 2003). O efeito inibitório sobre o aeróbio *Pseudomonas* é tanto maior quanto maior for a concentração de CO₂ e menor for a temperatura (Wiley, 1999 e Farber *et al.*, 2003). Alguns microrganismos patogénicos, como *Listeria monocytogenes*, são pouco afectados pela presença de CO₂ quando as concentrações são inferiores a 50% (Farber *et al.*, 2003). Na MAP o grupo de microrganismos que se torna predominante é o das bactérias lácticas, com uma proporção menor de *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae*.

O efeito inibitório do CO₂ é favorecido a baixas temperaturas pois este possui solubilidade suficiente em água para formar o ácido carbónico. O CO₂ presente na atmosfera pode ser absorvido pelo produto ao longo do tempo. Esta absorção está dependente da quantidade de água e de gordura do alimento. Se houver uma absorção excessiva de CO₂ a retenção de água do produto poderá diminuir resultando num excesso de exsudado, o que conduz a um mau aspecto do produto. Com a absorção do CO₂ por parte da carne pode ocorrer, também, colapso da embalagem (Wiley, 1999 e Day, 2000).

Na MAP os níveis de O₂ devem ser o mais baixo possível de forma a inibir o crescimento de microrganismos aeróbios e para reduzir a deterioração dos alimentos por oxidação. Contudo, existem algumas excepções, como por exemplo nas frutas e vegetais a presença de O₂ é necessária para o processo de respiração e nas carnes para retenção de cor (Day, 2000)

O N₂ é um gás inerte com baixa solubilidade em água e gorduras, sendo utilizado na MAP, por um lado, para substituir o O₂ de forma a retardar o crescimento de microrganismos aeróbios e a deterioração oxidativa, por outro lado, actua como elemento de “enchimento” da embalagem, prevenindo dessa forma o colapso da mesma (Philipps, 1996 e Day, 2000).

1.3.2.2. Materiais de embalagem

As principais características a ter em atenção para a selecção dos materiais de embalagem são a permeabilidade ao gás, as propriedades mecânicas e a fiabilidade na selagem.

É desejável que a atmosfera inicial introduzida na embalagem seja mantida por um período tão longo quanto possível. Se o material não for adequado a atmosfera inicial não será suficiente por muito tempo, pois podem ocorrer alterações nas concentrações da mesma. A permeabilidade dos materiais de embalagem depende de vários factores como a natureza do gás, a estrutura e a espessura do material, a temperatura e humidade relativa. De forma geral a permeabilidade dos materiais de embalagem é medida em cm³/m²/dia/atm e a transmissão de vapor de água em g/m²/dia, para uma dada temperatura e humidade relativa ambiente (Day, 2000).

Os materiais utilizados na MAP devem possuir uma elevada barreira à transmissão gasosa e ao vapor de água (Wiley, 1999). A permeabilidade da embalagem depende do tipo de material utilizado, da sua espessura e da diferença de pressões existentes entre o interior da embalagem e a pressão atmosférica (Wiley, 1999). Os materiais utilizados na MAP devem ainda apresentar uma força para resistir à perfuração, suportar dobragens sucessivas e stress mecânico durante o manuseamento e distribuição. Quando o material de embalagem apresenta propriedades mecânicas pobres, a embalagem pode-se danificar facilmente e colocar em causa a segurança do produto (Philipps, 1996, Wiley, 1999 e Day, 2000).

É essencial que a selagem seja efectiva de forma a manter uma correcta atmosfera no interior da embalagem, para tal é necessário seleccionar um correcto equipamento para a termosoldadura e controlar a operação de selagem (Wiley, 1999 e Day, 2000), de modo a que esta seja mantida até ao momento do consumidor a abrir (Wiley, 1999).

Day (2000) referiu que nos produtos refrigerados, nomeadamente carne fresca, o plástico é o material mais utilizado. Os tipos de plásticos utilizados mais frequentemente são polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), *polyvinyl chloride* (PVC), *polyethylene terephthalate* (PET) e *acrylonitrile – butadiene – styrene* (ABS). Contudo, existem outros materiais que permitem embalar sob vácuo e atmosfera modificada que têm tido uma crescente utilização na indústria alimentar, por representarem menores custos de produção, e que também possuem uma barreira efectiva ao O₂. Estes materiais, normalmente, são produzidos por coextrusão em multicamadas e designam-se por *polyvinylidene chloride* (PVDC) ou *ethylene – vinylalcohol* (EVOH).

Na tabela 5 são apresentadas as permeabilidades e taxas de transmissão de oxigénio e água para os materiais supracitados.

Tabela 5 – Permeabilidade e taxas de transmissão de oxigénio e vapor de água para materiais seleccionados para embalagem sob atmosfera modificada (adaptado de Day, 2000 e Farber *et al.*, 2003).

	Oxigénio		Vapor de água	
	Permeabilidade cm ³ /m ² /d/atm (25 °C)	Taxa de transmissão cm ³ /m ² /d/atm (23 °C e 0% HR ^{a)})	Transmissão g/m ² /dia/atm (38 °C e 90% HR)	Taxa de transmissão g/m ² /dia (38 °C e 90% HR)
PP	3700	3.000 – 3.700	10 – 12	10 – 12
PVC	500 – 30.000	2.000 – 10.000 ^{b)}	15 – 40	200
PET		50 - 100		20 – 30
PVDC)	9 – 15	0,8 – 9,2	____ ^{c)}	0,3 – 3,2
EVOH	3 – 5	0,2 – 1,6 ^{d)}	16 – 18	24 – 120

(a) Humidade relativa.

(b) Dependente da humidade relativa e do nível de plastificação.

(c) Informação não disponível.

(d) Depende da humidade relativa.

1.4. Microrganismos presentes nas carnes verdes

1.4.1. Bactérias lácticas ácidas

As bactérias lácticas ácidas (LAB) são bactérias Gram positivas, em forma de coco ou bastonete, não formam esporos, são catalase e oxidase negativas, muitas são tolerantes a condições de anaerobiose (Adams e Moss, 2000). Os principais géneros de LAB são *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (Adams e Moss, 2000).

As espécies de LAB reportadas como sendo dominantes em carne e produtos cárnicos incluem géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*,

Weissella, *Pediococcus* e *Enterococcus*. (Schilling e Holzapfel, 2006), os que ocorrem de forma mais frequente na carne fresca embalada sob atmosfera modificada são do género *Carnobacterium* e *Lactobacillus* (Stanbridge e Davies, 1998).

Quando existe uma redução da concentração de O₂, como embalagem sob vácuo ou atmosfera modificada, baixo pH e baixa temperatura há um processo de selecção que favorece o desenvolvimento das LAB enquanto bactérias causadoras de deterioração (Schilling e Holzapfel, 2006).

As LAB produzem ácido láctico como um dos principais produtos finais da fermentação, o que permite reduzir o pH para níveis onde as bactérias de putrefacção (como por exemplo *Clostridium* e *Pseudomonas*) e bactérias toxinogénicas (como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*) são inibidos ou mesmo mortos, e desta forma aumentar a qualidade e segurança de alguns produtos alimentares (Adams e Moss, 2000). O ácido não dissociado, lipossolúvel, difunde-se no interior das células bacterianas reduzindo o pH intracelular e reduz a actividade metabólica. No caso de uma *Enterobacteriaceae*, como a *E. coli*, inibe o seu crescimento com pH próximo de 5,1 (Holzapfel, 1998).

Pelas características supracitadas as LAB tornam-se predominantes quando a carne é embalada sob atmosfera modificada. Esta técnica de embalagem previne o crescimento de bactérias Gram negativas e aeróbias (Schilling e Holzapfel, 2006).

As LAB produzem compostos que promovem a deterioração de carne de forma lenta, contudo o prazo de validade da carne é limitado pela perda de coloração da carne antes da deterioração microbiológica (Corry, 2007 e Stanbridge e Davies, 1998). Schilling e Holzapfel (2006) sugeriram que normalmente as primeiras alterações em carne crua associadas à presença de LAB são a produção de *flavours* atípicos, como queijo e ácido, os quais são acompanhados pela formação de aromas atípicos e *off-odours*. Para além destas alterações pode ainda ocorrer uma outra alteração de deterioração como a formação de gás.

1.4.2. Bolores e Leveduras

Os elementos do reino dos fungos são responsáveis por processos de alteração de alimentos (Moss, 2006). O estudo das leveduras enquanto microrganismos de deterioração e causadores de infecções de origem alimentar tem tido uma importância crescente (Loureiro e Querol, 1999 e Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Existem alguns registos de gastroenterites a partir de alimentos onde se suspeita que as leveduras são o agente causador. Existem também alguns indivíduos que desenvolvem reacções alérgicas às leveduras (Fleet, 1992).

As leveduras e os bolores são microrganismos ubíquos no meio ambiente, ocorrendo em plantas, ar, água, solo e animais. Muitas destas leveduras são psicotróficas e são organismos de deterioração potenciais em ambientes refrigerados. Algumas leveduras isoladas de instalações e carcaças são *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces hansenii*, *Sporobolomyces shibatanus roseus* e *Yarrowia lipolytica* (Dillon, 1998). Os bolores, por possuírem uma presença ubíqua na natureza, são fáceis de transferir para a superfície da carne. Algumas espécies, como *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Penicillium* e *Rhizopus mucilaginosus*, foram isoladas de superfícies de carcaças (Dillon, 1998)

Os bolores e as leveduras são organismos de deterioração da carne e dos produtos cárnicos, mas apenas quando a competição com bactérias é reduzida. Inicialmente ocorrem em número reduzido, mas se à temperatura de refrigeração a competição com bactérias psicotróficas for baixa o seu número vai aumento de forma gradual (Dillon, 1998). A contaminação dos fungos a temperaturas de refrigeração pode ocorrer, não só devido à baixa temperatura, mas também por associação com o abaixamento da actividade da água à superfície das carcaças (Dillon, 1998). As leveduras são predominantes quando a superfície possui uma actividade da água intermédia, enquanto que os bolores serão predominantes quando a actividade da água na superfície é mais baixa (Gill, 1998).

A flora de leveduras presente na carne é dominada pelas leveduras não pigmentadas, estando as leveduras carotenoides presentes em pequeno número (Dillon, 1998).

A deterioração dos alimentos causada por leveduras consiste em alterações visíveis ou detectáveis, por propriedades físicas e sensoriais como resultado da sua actividade (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Em produtos cárnicos os principais efeitos causados pelas leveduras são desenvolvimento à superfície do produto, descoloração, produção de gás e formação de *off-flavours* (Loureiro e Querol, 1999 e Kurtzman, 2006).

1.4.3. *Enterobacteriaceae*

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* podem encontrar-se em água, solo, nos intestinos dos animais, nas fezes humanas, entre outras fontes (Harrigan, 1998). Os membros desta família têm a forma de bastonete, são Gram negativas, com catalase positiva e oxidase negativa, podendo ser móveis por flagelos peritriquiais ou não apresentarem mobilidade, são anaeróbios facultativos e fermentam a glucose com produção de gás (Harrigan, 1998). No meio VRBGA (*violet red bile glucose agar*) formam colónias características (ISO 21528-2, 2002) (figura 1).

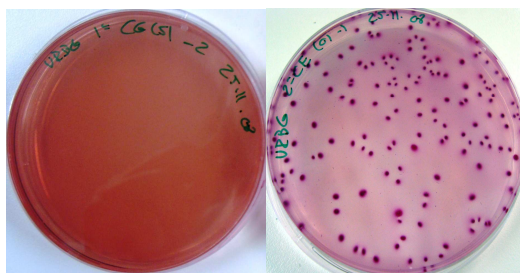


Figura 1 – Meio VRBGA (à esquerda) e meio VRBGA com colónias de *Enterobacteriaceae* características (à direita).

A família *Enterobacteriaceae* inclui um total de 29 géneros, dos quais *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Escherichia coli* e *Yersinia* estão associados à deterioração da carne (García-López *et al.*, 1998). Algumas espécies de *Enterobacteriaceae* psicrótróficas ocorrem de forma comum em carne refrigerada, possuindo uma capacidade de crescimento aeróbio em tecidos adiposos e músculo com pH superior a 6 (García-López *et al.*, 1998). Quando a carne é embalada em atmosfera modificada e apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento de *Enterobacteriaceae*, como pH, temperatura de armazenagem e tipo de embalagem, estas podem crescer e causar a deterioração da carne (García-López *et al.*, 1998).

A contagem de *Enterobacteriaceae* em meio selectivo demonstra que certos géneros desta família têm uma presença significativa, mas não dominante, na flora microbiana presente em carne armazenada em condições aeróbias à temperatura de refrigeração (Stanbridge e Davies, 1998).

1.4.4. *Pseudomonas*

As bactérias do género *Pseudomonas* são bactérias Gram negativas em forma de bastonete não esporulado, aeróbias, com oxidase e catalase positivas, móveis por um flagelo polar (Liao, 2006) e no meio glucose agar têm a capacidade de fermentar a glucose (ISO 13720 (E), 1995) (figura 2).

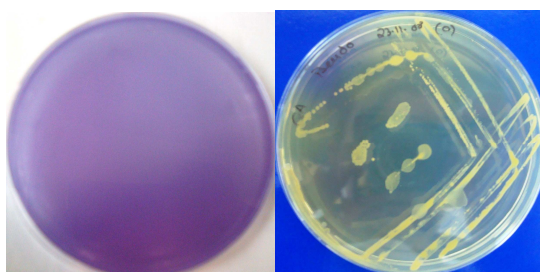


Figura 2 – Meio glucose agar (à esquerda) e meio glucose agar após inoculação e incubação com *Pseudomonas* (à direita).

A maioria das *Pseudomonas* spp. cresce a temperaturas próximas de 30 °C, mas a *Pseudomonas aeruginosa* e outras espécies caracterizam-se por poderem crescer a temperaturas entre 41 - 42 °C (Harrigan, 1998).

As *Pseudomonas* são muito versáteis em termos nutricionais, podendo encontrar-se em solo, água e associadas a muitos processos aeróbios de decomposição e biodegradação. As quatro principais espécies associadas a deterioração dos alimentos são *P. fluorescens*, *P. viridiflava*, *P. fragi* e *P. lundensis*. As espécies proteolíticas e lipolíticas, *P. fluorescens*, *P. fragi* e *P. lundensis*, estão associados a deteriorações que ocorrem em alimentos de origem animal, como carne, leite e peixe. A deterioração causada por estas bactérias conduz a uma aparência viscosa, produção de *off-odours* e degradação parcial ou completa dos tecidos (Liao, 2006).

Uma forma de avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e a higiene do processo produtivo é realizar análises com meios selectivos. Um meio selectivo utilizado para a determinação de *Pseudomonas* é o CFC (*Cetrimide – Fucidin – Cephalosporina*), que previne o crescimento de uma vasta maioria da flora não *Pseudomonas*, incluindo *Enterobacteriaceae* e bactérias Gram positivas como *Bacillus* e *Lactobacillus* spp. (Liao, 2006).

Na carne as *Pseudomonas* tornam-se predominantes devido ao seu rápido crescimento e da sua afinidade com o oxigénio, contudo existem algumas espécies de *Pseudomonas* que resistem bem a baixas concentrações de oxigénio, como *Pseudomonas fragi* que utiliza outras fontes de carbono, como creatina e creatinina em condições de aerobiose (Nychas *et al.*, 1998).

Em carnes armazenadas sob MAP, o género *Pseudomonas* spp. não representa uma grande importância numérica, contudo possuem uma importância comercial pela sua capacidade de sobrevivência em embalagens que apresentem algum tipo de fendas e em carnes armazenadas de forma aeróbia após a abertura da embalagem, uma vez que as *Pseudomonas* podem crescer rapidamente após a remoção da embalagem (Stanbridge e Davies, 1998).

1.4.5. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram positiva em forma de cocos, de esférico a oval com cerca de 1 µm de diâmetro, com catalase positiva, oxidase negativa e anaeróbia facultativa. É uma bactéria mesófila típica, sendo o intervalo de temperaturas de crescimento entre 7 e 48 °C com a temperatura óptima de 37 °C, com pH óptimo de crescimento entre 6 e 7. A bactéria *St. aureus* tem como principal habitat a pele, glândulas da pele e membranas mucosas de animais de sangue quente. No Homem está particularmente associada ao tracto nasal (Adams e Moss, 2000). A bactéria *St. aureus*

pode crescer a temperaturas inferiores a 7,7 °C enquanto a toxina é formada a 14,3 °C, sendo esta a causadora de doença (Walker e Betts, 2000).

Um dos métodos mais apropriados para a contagem de *Staphylococcus aureus* é por plaqueamento directo no meio Baird-Parker, no qual se desenvolvem colónias características de cor preta e com formação de halos (figura 3).

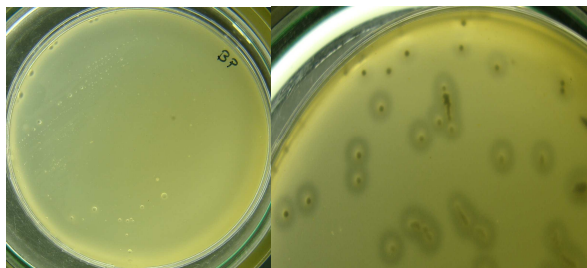


Figura 3 – Meio Baird-Parker Agar (à esquerda) e meio Baird-Parker Agar com colónias de *St. aureus* pretas e com formação de halos (à direita).

Holzappel (1998) referiu que durante a fermentação de carne para produção de enchidos a presença de bactérias lácticas ácidas conduziu a uma rápida redução do pH, para próximo de 5,3. Este abaixamento de pH afecta o desenvolvimento da bactéria *St. aureus*, o qual pode ser retardado ou mesmo inibido.

1.4.6. *Listeria monocytogenes*

Das seis espécies pertencentes ao género *Listeria* a que apresenta maior risco para o Homem é a espécie *Listeria monocytogenes* (Adams e Moss, 2000).

A *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram positiva, em forma de bastonete (0,4 - 0,5 µm x 0,5 – 2 µm), anaeróbia facultativa, com catalase positiva e oxidase negativa (Adams e Moss, 2000), é móvel por flagelos peritriquais. A bactéria *L. monocytogenes* é psicrótrófica pode crescer a temperaturas compreendidas entre 0 °C e 45 °C, sendo sua temperatura óptima de crescimento a 37 °C. Contudo tem a capacidade de se multiplicar à temperatura de refrigeração (Vásquez-Boland *et al.*, 2001) na qual a fase lag passa de 1 para 33 dias e o tempo de duplicação de 13 para mais de 133 horas (Adams e Moss, 2000). A espécie *L. monocytogenes* tem a capacidade de crescer em ambientes com pH entre 4,4 e 9,4 e em meios com a actividade da água igual ou superior a 0,92. Pelas suas características tem a capacidade de crescer em ambientes muito diversos, tendo já sido isolada a partir de solo, água, material fecal, vegetação em decomposição e silagens (Adams e Moss, 2000), também pode estar presente em animais domésticos, como a vaca, a ovelha e a cabra (Donnelly, 2001). É possível encontrar *L. monocytogenes* em indústrias de transformação alimentar, particularmente quando estas possuem um ambiente frio e húmido (FAO/ WHO, 2004), pelo que é fundamental controlar a sua presença no ambiente da produção para

evitar a presença de *L. monocytogenes* nos produtos finais, o que pode ser obtido por procedimentos de higienização correctos e eficazes (Walker e Betts, 2000).

Os alimentos associados a surtos ocorridos com *Listeria* são alimentos refrigerados, alimentos processados e alimentos prontos-a-consumir. As doenças no Homem estão normalmente associadas a meningites, septicemia e abortos (McClure, 2000).

L. monocytogenes não é considerada uma bactéria termo-resistente, tendo sido observados tempos de redução decimal de 8 - 16 segundos a 70 °C. É recomendado que alimentos sujeitos a um período de refrigeração sejam submetidos a um tratamento térmico no mínimo a 70 °C durante 2 minutos para assegurar a sua eliminação (Walker e Betts, 2000).

Como foi referido anteriormente, a bactéria *L.monocytogenes* desenvolve-se bem em carnes frescas, especialmente quando armazenadas em ambientes frios e húmidos. Quando a carne é armazenada sob MAP esta bactéria continuará presente e desenvolver-se-á bem uma vez que são inibidas algumas das bactérias presentes na flora habitual da carne, o que se torna num factor crítico para a segurança deste produto (Stanbridge e Davies, 1998).

A presença de *Listeria* é avaliada de forma comum com recurso ao meio *Palcam Agar Base*, no qual se desenvolvem colónias de coloração verde azeitona com formação de um halo preto (figura 4).

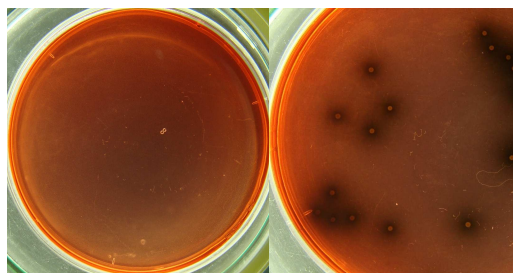


Figura 4 – Meio *Palcam Agar Base* (à esquerda) e meio *Palcam Agar Base* com colónias de *Listeria* pretas e com formação de halos (à direita).

1.4.7. *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à família das *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria Gram negativa em forma de bastonete, catalase positiva e oxidase negativa. A bactéria *E. coli* pode-se desenvolver a temperaturas entre 7 – 50 °C, sendo a sua temperatura óptima de crescimento 37 °C, contudo pode desenvolver-se a 4 °C, com pH óptimo de crescimento perto da neutralidade (Adams e Moss, 2000).

A *E. coli* tem como principal habitat o tracto intestinal do Homem e de outros animais de sangue quente, pode também ser encontrada em solo e água afectados pela actividade do Homem ou dos animais (McClure, 2000).

Existem muitos tipos de doenças causadas pela *E. coli* e estas dependem dos factores virulentos presentes. São reconhecidos seis grupos de virulência *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli*

enteropatogénica verotoxigénica (VTEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) e *E. coli* difusa aderente (DAEC) (McClure, 2000 e Adams e Moss, 2000).

Em países desenvolvidos a incidência de *E. coli* em surtos de origem alimentar é significativa e tende a aumentar (McClure, 2000). A presença de *E. coli* pode ser avaliada com o meio *Chromocult PTX Agar*, no qual se desenvolvem colónias de coloração azulada (figura 5).

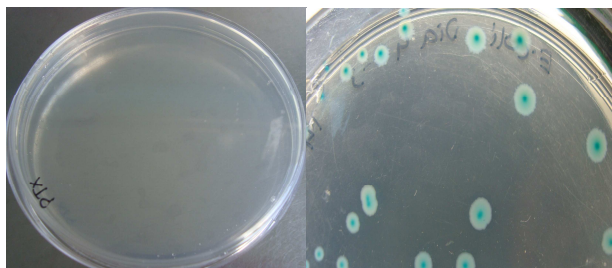


Figura 5 – Meio *Chromocult PTX Agar* (à esquerda) e meio *Chromocult PTX Agar* com colónias de *E. coli* de coloração azulada (à direita).

E. coli é uma das bactérias da família das *Enterobacteriaceae* que tem sido reportada como causadora de processos de deterioração em carne e produtos cárnicos (García-López *et al.*, 1998). Em conjunto, a *E. coli* patogénica O157:H7 tem sido isolada de carnes, tendo origem nos animais vivos (Stanbridge e Davies, 1998).

1.4.8. *Salmonella* spp.

O género *Salmonella* spp. é uma das principais causas das doenças de origem alimentar a nível mundial. É um dos microrganismos mais patogénicos para o Homem, diferindo nas suas características e na severidade nas doenças que causam, sendo a doença mais severa a febre tifóide (Adams e Moss, 2000). São responsáveis por um elevado número de síndromes clínicas, agrupando-se em enterites e doenças sistémicas (Adams e Moss, 2000).

A *Salmonella* pertence à família das *Enterobacteriaceae*, são Gram negativas em forma de bastonetes (0,5 μm x 1 – 3 μm), anaeróbias facultativas, catalase positiva e oxidase negativa, normalmente apresentando mobilidade com flagelo peritriqual. A *Salmonella* spp. pode crescer a temperaturas entre 5 °C e 47 °C, sendo a sua temperatura óptima de crescimento cerca de 37 °C, estas são sensíveis ao calor e destruídas a temperaturas de pasteurização (Adams e Moss, 2000).

A actividade da água mínima para o crescimento de *Salmonella* é cerca de 0,93, mas sobrevivem bem em alimentos secos. O pH mínimo para o seu crescimento varia entre 5,4 e 4,05, sendo o pH óptimo de crescimento perto de 7 (Adams e Moss, 2000).

As salmonelas encontram-se de forma predominante no tracto gastrointestinal, de animais de alimentação, animais selvagens, roedores, animais de estimação, répteis e insectos, normalmente sem apresentarem qualquer sintoma de doença (Adams e Moss, 2000 e

Baylis, 2006). Pode, ainda, encontrar-se em nódulos linfáticos de alguns animais (Gill, 1998). A *Salmonella* pode ser disseminada via fecal para o solo, água e alimentos (Adams e Moss, 2000).

A *Salmonella* spp. não tifoide é um dos surtos mais comuns nos países industrializados. Os sintomas mais comuns de salmonelose no Homem incluem náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais e febre, durante 3 a 12 dias. As condições clínicas associadas podem incluir artrites, artrites sépticas e septicemia (McClure, 2000).

A bactéria *Salmonella* pode-se encontrar em carne fresca crua, contudo estudos realizados indicam que o seu desenvolvimento não é significativo quando esta é embalada sob MAP (Stanbridge e Davies, 1998).

Os primeiros veículos de *Salmonella* são a carne, o leite e os ovos, que podem ser consumidos crus ou não sujeitos a um correcto tratamento térmico, o que permite a sobrevivência de *Salmonella*, ou por contaminação cruzada com alimentos que já não sofrerão qualquer tratamento térmico (Adams e Moss, 2000).

A presença de *Salmonella* pode ser avaliada com o meio *Brilliant Green Agar* (Edel and Kampeimacher), no qual se desenvolvem colónias de coloração rosada (figura 6).



Figura 6 – Meio *Brilliant Green Agar* (Edel and Kampeimacher) (à esquerda) e meio *Brilliant Green Agar* (Edel and Kampeimacher) com colónias de *Salmonella* de coloração rosada (à direita).

1.5. Avaliação do prazo de validade

Os consumidores são cada vez mais exigentes em termos alimentares e esperam que a qualidade dos produtos seja mantida desde o acto da compra até ao acto de consumo. Estas exigências reflectem-se tanto a nível de alimentos seguros como também na qualidade nutricional (Kilcast e Subramaniam, 2000). Durante o período de armazenagem ocorrem alterações que deterioram os produtos, tornando-os inaceitáveis para o consumo humano. O tempo durante o qual os produtos se mantêm estáveis e apresentam as características de qualidade desejáveis é designado por *shelf-life* (Betts, 2006), designação que se traduz como prazo de validade, sendo esta a designação usada ao longo do trabalho.

Em 1993, o *Institute of Food Science on Technology* (IFST) definiu *shelf-life* como o período no qual o produto alimentar permanece seguro, mantém as características sensoriais,

microbiológicas, químicas e físicas desejáveis, sem alteração das características nutricionais que declara na embalagem, quando armazenado nas condições recomendadas (Kilcast e Subramaniam, 2000 e Betts, 2006).

A indústria alimentar teve necessidade de estabelecer critérios de forma a determinar o limite para o prazo de validade, que se baseiam em critérios microbiológicos (microrganismos de deterioração e patogénicos), químicos, físico-químicos e sensoriais (Kilcast e Subramaniam, 2000), pelo que é muito importante definir quais os atributos que limitam o prazo de validade (Betts, 2006) (figura 7). Cada tipo de alimento possui uma flora microbiana específica e o contributo destes microrganismos na deterioração da qualidade dos produtos depende do desenho industrial, da formulação do produto e das condições de armazenagem (Betts, 2006).

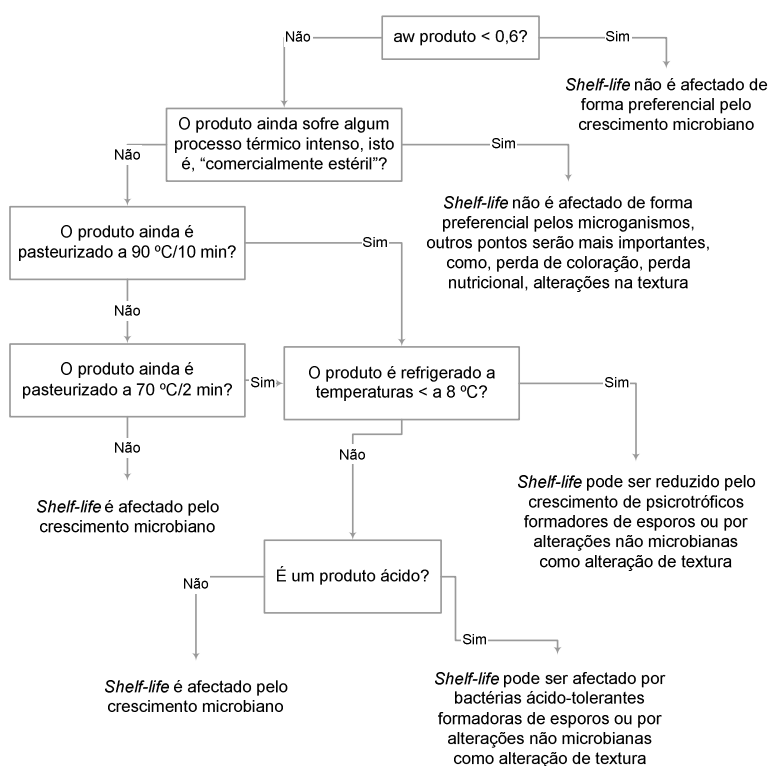


Figura 7 – Limitações ao prazo de validade baseadas no processo produtivo e características da formulação (adaptado de Betts, 2006).

O prazo de validade é influenciado quer por factores intrínsecos (actividade da água (aw), pH, potencial redox (Eh), quantidade de oxigénio disponível, presença de nutrientes, composição do produto) quer por factores extrínsecos (temperatura, humidade relativa, exposição à luz, contaminação microbiana, presença de atmosfera diferente da do ar) e ainda pelo manuseamento por parte dos diferentes intervenientes da cadeia alimentar e do próprio consumidor, quer em termos de tempo e temperatura de transporte quer os tratamentos térmicos efectuados (Kilcast e Subramaniam, 2000).

Com a crescente concorrência na indústria alimentar os produtores têm uma preocupação acrescida com os produtos comercializados. Se determinado produto alimentar não mantém a sua qualidade até ao final do prazo certamente que as suas vendas serão prejudicadas e a imagem da empresa envolvida em relação à concorrência. Este facto terá tanto mais impacto quanto maior for o risco para a segurança alimentar. Por estas razões é muito importante, para a indústria e para todos os intervenientes na cadeia alimentar, que a determinação do prazo de validade dos produtos por eles comercializados seja efectuada de forma correcta, séria e precisa (Man, 2000).

Durante o desenvolvimento dos produtos existem dois aspectos diferentes que devem ser considerados (Betts, 2006):

- É o produto seguro e estável durante as condições normais de produção e armazenagem, atendendo à microflora natural presente?

Esta determinação é efectuada com recurso à avaliação do prazo de validade, onde o produto é armazenado nas condições normais e avaliado por quaisquer alterações que possam ser desenvolvidas pela microflora natural dos produtos.

- É o produto seguro e estável durante o prazo de validade se for contaminado por microrganismos que coloquem em causa a sua estabilidade?

Esta determinação é efectuada recorrendo ao *challenge test*, onde o produto é deliberadamente inoculado por microrganismos patogénicos que possam contaminar o produto durante o período de armazenagem.

1.5.1. Técnicas de determinação do prazo de validade

O prazo de validade pode ser determinada de forma directa ou indirecta. A determinação directa é normalmente utilizada para alimentos de curta e média duração. A determinação indirecta é mais utilizada para alimentos com longo prazo de validade ou em ensaios de desenvolvimento de novos produtos, sendo realizadas pelo método *Accelerated shelf-life testing* (ASLT) e/ ou pela aplicação de modelos preditivos (Man, 2000).

1.5.1.1. Determinação directa

A determinação directa do prazo de validade consiste em estudar o intervalo de tempo que determinado alimento demora até atingir um nível de qualidade considerado inaceitável quando armazenado nas condições apresentadas pelo produtor (Man, 2000). A determinação directa do prazo de validade envolve um estudo experimental de deterioração do alimento, terminando com a identificação do instante que marca o fim do prazo de validade. A forma mais comum de realizar a determinação directa do prazo de validade é elaborar experiências de armazenagem do produto que simulem as condições a que o produto alimentar está sujeito ao longo da cadeia alimentar. Por ser difícil simular todas as

condições a que o produto alimentar está sujeito, e por haver muitos factores de variação ao longo da cadeia alimentar, estes testes são realizados de acordo com as condições estabelecidas pelo produtor (Man, 2004). Não existem protocolos universais estabelecidos para a determinação do prazo de validade, pelo que o método escolhido deve ser adaptado ao produto alimentar em estudo (Kilcast e Subramaniam, 2000), e a experiência conduzida para que os resultados sejam claros e precisos (Man, 2004).

1.5.1.2. **Determinação indirecta e previsão do prazo de validade**

1.5.1.2.1. *Accelerated shelf-life testing* (ASLT)

O modelo *Accelerated shelf-life testing* (ASLT) baseia-se em dados obtidos num período de tempo inferior ao prazo de validade estabelecido para o produto. O ASLT aplica-se a qualquer processo de degradação de um alimento que tenha um modelo cinético válido, sendo os mesmos para qualquer um dos tipos de degradação (microbiológico, químico/bioquímico e físico), contudo a maioria dos estudos efectuados com ASLT baseiam-se em processos de degradação química (Mizrahi, 2000). O princípio ASLT consiste em alterar uma das condições de armazenamento para que o processo químico ou físico que conduz à degradação do produto seja acelerado, para tal é necessário que exista uma relação entre as condições normais de armazenamento e as condições aceleradas a que o alimento é sujeito e que os processos de degradação sejam os mesmos em ambas as situações (Kilcast e Subramaniam, 2000).

1.5.1.2.2. Modelos preditivos

Os modelos preditivos baseiam-se em relações matemáticas e estatísticas entre variáveis como os factores intrínsecos, factores extrínsecos e factores implícitos. Os modelos preditivos são muito utilizados para estudar o comportamento microbiano. Estes modelos são baseados em dados experimentais representativos que relacionam as taxas de alteração com as combinações dos factores (Kilcast e Subramaniam, 2000).

A utilização destes estudos matemáticos pode conduzir a uma redução de estudos de armazenagem, *challenge testing*, reformulações de produtos e modificações de processos, que são trabalhosos, morosos e dispendiosos (Blackburn, 2000).

1.5.2. **Challenge test microbiológico**

O *challenge test* pode ser aplicado quer a produtos novos quer a produtos já existentes, de forma a determinar a segurança do produto, determinar o potencial de deterioração do produto e avaliação da estabilidade de novas formulações (Betts, 2006). O *challenge test* microbiológico consiste na inoculação de microrganismos com relevância para a segurança e qualidade alimentar na superfície do produto alimentar e numa posterior incubação sob

condições ambientais controladas para avaliar o risco de intoxicação/ infecção alimentar ou estabelecer a estabilidade do alimento no caso de microrganismos de alteração (Betts e Everis, 2000).

O *challenge test* deve ser utilizado sempre que exista suspeita de presença de um microrganismo que coloque em causa a segurança e/ ou a qualidade alimentar em concentração reduzida num alimento, ou se existir a possibilidade de contaminação ao longo da cadeia alimentar (Notermans e int't Veld, 1994 e Betts e Everis, 2000), pois mesmo com o cumprimento do código de boas práticas e de uma correcta implementação do sistema HACCP (*Hazard analysis of critical control points*) não anula a possibilidade de um alimento ser contaminado por microrganismos de alteração ou patogénicos diferentes da flora normal do alimento ao longo da cadeia alimentar (Betts e Everis, 2000).

O *challenge test* pode ser utilizado para avaliar o efeito da armazenagem no produto final sob condições de armazenagem variadas e controladas. Este estudo deve simular situações de abuso nas condições de armazenagem, as quais podem ocorrer durante a distribuição ou durante a manipulação por parte do consumidor (Betts, 2006).

A escolha dos microrganismos a utilizar no *challenge test* é muito importante, pois devem representar uma microflora que possa realmente causar alterações no produto (Betts, 2006). As culturas escolhidas, idealmente, devem ser isoladas a partir de fontes alimentares similares do produto que vai ser estudado, ou devem ter sido cultivadas numa amostra de produto ou desenvolver-se num meio de cultura com características similares (Notermans e int't Veld, 1994). O número de microrganismos inoculados deve ser suficientemente elevado de forma a permitir a sua detecção facilmente (Betts, 2006).

Antes de iniciar o *challeng test* é importante definir os critérios de aceitabilidade do produto. Se o critério em estudo não se desenvolver durante o prazo de validade em estudo então o produto pode considerar-se estável em relação às condições estudadas, para quando ocorrem contaminações com microrganismos de características similares às estudadas. Se ocorrer algum tipo de alteração, mesmo que pequena, relacionadas com a formulação do produto, com as condições de processamento, de armazenagem, de distribuição ou de venda então os resultados do *challenge test* não podem ser considerados de terá de se rever todo o processo (Betts, 2006).

2. Enquadramento e objectivos

O centro de abate que colaborou na realização do presente estudo possui um Sistema de Gestão da Qualidade implementado de acordo com a norma ISO 22000: 2005 o que permite cumprir todos os requisitos legais, estabelecidos quer pela legislação nacional quer pela legislação a nível Europeu.

Os critérios de higiene estabelecidos no centro de abate estão definidos de acordo com o apresentado no Regulamento (CE) n.º 1441/2007 (cf. Secção 1.2). Contudo este não define critérios microbiológicos para a carne de coelho fresco, pelo que surgem dificuldades no planeamento das análises a estabelecer anualmente, bem como na elaboração e validação do plano HACCP, por a informação ser escassa sobre os perigos microbiológicos associados à carne de coelho fresca. Por outro lado, a certificação do processo produtivo do centro de abate exige que os prazos de validade dos seus produtos estejam devidamente validados. Foi por estas razões que a Administração do centro de abate colaborou na realização deste trabalho, de forma a determinar:

- Critérios microbiológicos para a flora microbiana presente nos coelhos frescos prontos a embalar: coelho a granel, coelho embalado e coelho embalado em atmosfera modificada;
- Qual o melhor material para a embalagem sob atmosfera modificada através da avaliação de dois filmes com espessuras diferentes;
- De forma directa, o prazo de validade da carne de coelho para cada uma das três formas de apresentação da carcaça de coelho;
- O comportamento de algumas bactérias patogénicas (*St. aureus*, *E. coli*, *L. innocua* e *S. typhimurium*) na carne de coelho fresco, através da realização de um *challenge test*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Colheita e embalagem das carcaças

Os coelhos utilizados neste estudo eram predominantemente da raça branca da Nova Zelândia com um peso vivo entre 2,25 e 2,50 kg. As carcaças de coelho foram obtidas num centro de abate de dimensão média existente na zona centro de Portugal pelo processo normal de laboração do mesmo (figura 8). O centro de abate possui uma estrutura, um *layout* e operações de manutenção e de higiene de acordo com a legislação da União Europeia.

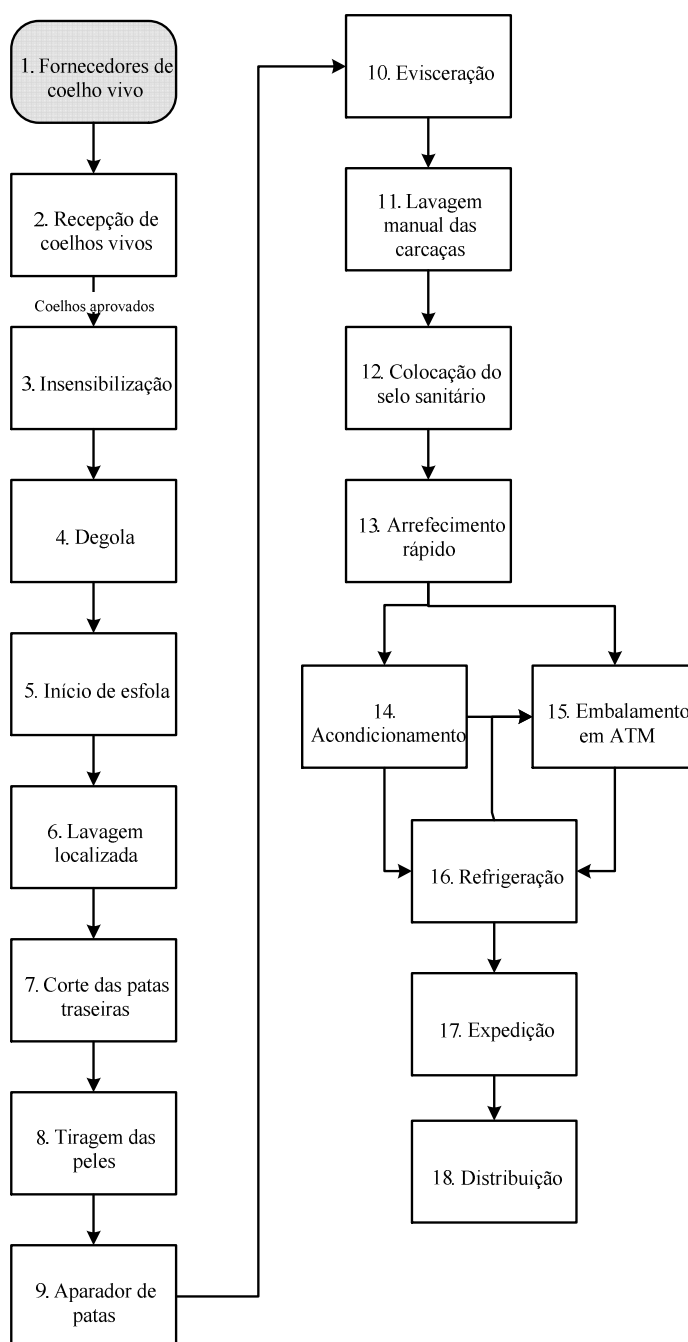


Figura 8 – Diagrama simplificado do processo produtivo.

As carcaças utilizadas no ensaio foram preparadas de acordo com o produto que representavam: coelho a granel, coelho embalado e coelho embalado em atmosfera modificada. Para todos os tipos de embalamento foram efectuados testes com três lotes distintos de carcaças.

O coelho a granel foi colocado em caixas próprias para contacto directo com os alimentos e foi-lhes colocada uma película plástica e etiqueta. Tanto o coelho embalado como o coelho embalado em atmosfera modificada foram embalados numa embaladora horizontal SP 100 – H (Belca, Villabona, Espanha). Nos coelhos embalados foram testados dois filmes de alta barreira: i) com 35 μm de espessura, com taxa de transmissão de oxigénio de 4,5 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{dia}$, a 23 °C e 0% de humidade relativa (Toplex HB 35, Plastopil, Lda., Israel), ii) com 45 μm de espessura, com taxa de transmissão de oxigénio de 3,0 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{dia}$, a 23 °C e 0% de humidade relativa (Toplex HB 45, Plastopil, Lda., Israel), cujas especificações técnicas se encontram definidas no anexo I. O gás utilizado na embalagem foi Biogon CON 30:30 (Linde Sogás, Lda., Alenquer, Portugal), composto por 30% O_2 / 40 % CO_2 / 30% N_2 .

Durante o período de ensaio as carcaças foram mantidas numa câmara de refrigeração (temperatura entre 0 °C e 4 °C) do centro de abate e transportadas, quando necessário, para o laboratório de microbiologia do Instituto Superior de Agronomia, numa mala térmica com cubetes de gelo de forma a garantir a manutenção da cadeia de frio até ao momento da realização das análises.

3.2. Preparação da amostra

Os ensaios com as carcaças de coelho foram realizados de acordo com o apresentado na tabela 6, onde o dia zero corresponde ao dia de abate.

Tabela 6 – Cronograma para a realização dos ensaios.

Dia	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Amostra																								
Coelho a Granel																								
Coelho Embalado																								
Coelho Embalado em Atmosfera Modificada																								

Dias de análiseDias de refrigeração

As amostras foram preparadas de acordo com um protocolo adaptado de Rodríguez-Calleja *et al.* (2005). As amostras foram retiradas das embalagens de forma asséptica. Cortaram-se 10 g de carne de coelho para um saco *BagFilter* (Breveté – França) estéril que continha 90

ml de triptona sal (TS) (0,1% w/v). As 10 g de amostra para análise são compostas por cerca de 2 g de perna, 2 g de mão, 2 g de costela, 2 g de rim e 2 g de fígado, sendo estes últimos dois elementos incluídos na amostra porque não são retirados aquando a evisceração.

Para a preparação do diluente triptona sal (TS) foram dissolvidas 1 g de triptona (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e 8,5 g de cloreto de sódio (Panreac Quimica, SA, Barcelona, Espanha) num litro de água destilada. O diluente foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C, sendo conservado à temperatura ambiente até à sua utilização. Em seguida a solução foi agitada vigorosamente durante 30 segundos no *Mastigator* (IUL), de acordo com o representado na figura 9.



Figura 9 – Preparação da suspensão – mãe (diluição 10^{-1}).

Após a agitação no *Mastigator* foram efectuadas diluições decimais, com o diluente TS de acordo com o descrito na Norma ISO 6887 – 1 (1999). Cada diluição foi realizada em duplicado, como representado na figura 10.

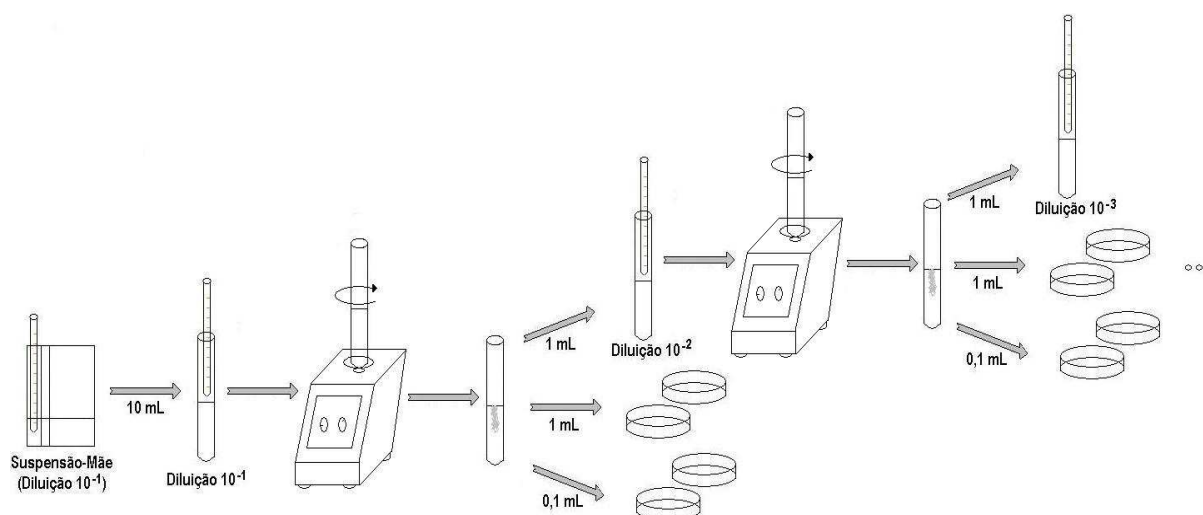


Figura 10 – Preparação das diluições.

3.3. Análises químicas

3.3.1. Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada numa solução homogeneizada de carne (10g de músculo/ 10mL de água destilada), de acordo com o descrito por Rodríguez-Calleja *et al.* (2005) com um eléctrodo de vidro (Schott pH elektrode blue line) com o potenciómetro PHM 92 LAM pH meter (Radiometer, Copenhaga).

3.4. Análises microbiológicas

3.4.1. Determinação de mesófilos e psicrotróficos aeróbios

A determinação de microrganismos mesófilos e psicrotróficos aeróbios foi efectuada de acordo com o descrito em Patsias *et al.* (2006) e Rodríguez-Calleja *et al.* (2005), tendo sido realizada com o meio *Plate Count Agar* (PCA). Para a preparação do meio PCA foram dissolvidas 20,5 g de meio desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) num litro de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C, permanecendo à temperatura ambiente. Sempre que foi utilizado era derretido e colocado num banho termostaticado a 60 °C e distribuído nas placas de Petri após a colocação do inóculo.

A inoculação foi feita por incorporação de 1 ml de amostra. As colónias totais de mesófilos e psicrotróficos foram contadas ao fim de 3 dias a 30 °C ± 1 °C e de 14 dias a 4,5 °C ± 1 °C, respectivamente, e os resultados expressos em log UFC/g.

3.4.2. Determinação de bactérias lácticas

A determinação de bactérias lácticas foi realizada de acordo com o descrito na norma ISO 13408 (E) (1998). Tendo sido a contagem efectuada com o meio *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS). Para a preparação do meio MRS foram dissolvidas 55,3 g de meio desidratado

(Biokar Diagnostics, Beauvais, França) com 20 g de ágar-ágar (Dário Correia, Lisboa, Portugal) num litro de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C, permanecendo à temperatura ambiente. Sempre que era utilizado era derretido e colocado num banho termostatizado a 60 °C e distribuído nas placas de Petri após a colocação do inóculo.

A inoculação foi feita por incorporação de 1 ml de amostra. As colónias de bactérias lácticas foram contadas ao fim de 3 dias a 30 °C ± 1 °C e os resultados expressos em log UFC/g.

3.4.3. Determinação de bolores e leveduras

A determinação de fungos e leveduras foi realizada de acordo com o descrito na Norma Portuguesa NP 3277-1 (1987). Tendo sido a contagem realizada com o meio *Chloramphenicol Rose Bengal Agar Base* (CRB). Para a preparação do meio CRB foram dissolvidas 32 g de meio desidratado (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) num litro de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C, findo este período foi colocado num banho termostatizado a 60°C. De seguida foi-lhe adicionado o suplemento cloranfenicol (100ppm) e distribuído em placas de Petri, deixando-se secar em câmara de fluxo laminar durante 45 minutos, sendo conservado a 4 °C até à sua utilização.

A inoculação foi feita por espalhamento de 0,1 ml de amostra. As colónias de fungos e leveduras foram contadas ao fim de 5 dias a 25 °C ± 1 °C e os resultados expressos em log UFC/g.

3.4.4. Determinação de *Enterobacteriaceae*

A determinação de *Enterobacteriaceae* foi realizada de acordo com o descrito na norma ISO 21528-2 (2002). Tendo sido a contagem realizada com o meio *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBGA). Para a preparação do meio VRBGA foram dissolvidas 39,5 g de meio desidratado (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) num litro de água destilada esterilizada, o meio foi preparado em cada dia de ensaio. No final da fervura o meio era colocado num banho termostatizado a 60 °C e distribuído nas placas de Petri após a colocação do inóculo.

A inoculação foi feita por incorporação de 1 ml de amostra, após a solidificação do meio as placas eram cobertas com mais uma camada de ágar. As colónias de *Enterobacteriaceae* foram contadas ao fim de 24 horas a 37 °C ± 1 °C e os resultados expressos em log UFC/g.

Para confirmação das colónias de *Enterobacteriaceae* foram seleccionadas 5 colónias de forma aleatória as quais foram espalhadas em placas de Agar Nutritivo (AN). Para a preparação do meio AN foram dissolvidas 20 g de meio desidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha) num litro de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C, findo este período foi colocado num banho termostatizado a 60°C. De seguida foi distribuído em placas de Petri, deixando-se secar em câmara de fluxo laminar durante 45 minutos,

sendo conservado a 4 °C até à sua utilização. A confirmação bioquímica foi realizada com o teste da oxidase e fermentação da glucose. O teste da oxidase foi realizado com *sticks* de identificação estéreis (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). A fermentação da glucose foi realizada por espalhamento das colónias em meio Glucose Agar (GA). Para a preparação do meio GA foram dissolvidas 10 g de triptona (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), 1,5 g de extracto de levedura (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), 5 g de cloreto de sódio (Panreac Quimica, SA, Barcelona, Espanha), 10 g de glucose monohidratada (COPAM, Bobadela, Portugal), 0,015 g de bromocresol purple (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 12 g de ágar-ágar (Dário Correia, Lisboa, Portugal) num litro de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C, findo este período foi colocado num banho termostatizado a 60 °C. De seguida foi distribuído em placas de Petri, deixando-se secar em câmara de fluxo laminar durante 45 minutos, sendo conservado a 4 °C até à sua utilização.

As colónias de *Enterobacteriaceae* foram confirmadas ao fim de 24 horas a 37 °C ± 1 °C.

3.4.5. Determinação de *Pseudomonas*

A determinação de *Pseudomonas* foi realizada de acordo com o descrito na norma ISO 13720 (E) (1995). Tendo sido a contagem realizada como o meio *Pseudomonas Base Agar* (PBA). Para a preparação do meio PBA foram dissolvidas 24,2 g de meio desidratado (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) num litro de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C, findo este período foi colocado num banho termostatizado a 60 °C. De seguida foi-lhe adicionado o suplemento *Cetrimide – Fucidin – Cephalosporina* (CFC) (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e distribuído em placas de Petri, deixando-se secar em câmara de fluxo laminar durante 45 minutos, sendo conservado a 4 °C até à sua utilização.

A inoculação foi feita por espalhamento de 0,1 ml de amostra. As colónias de *Pseudomonas* foram contadas ao fim de 2 dias a 25 °C ± 1 °C e os resultados expressos em log UFC/g. Para confirmação das colónias de *Pseudomonas* foram seleccionadas 5 colónias de forma aleatória as quais foram espalhadas em placas de NA, sendo realizados os testes da oxidase e fermentação da glucose, como referidos anteriormente.

3.5. Determinação do prazo de validade

A determinação da *shelf-life* da carne de coelho fresco foi feita seguindo o protocolo descrito em Rodríguez-Calleja *et al.* (2005). Na ausência de legislação em termos microbianos para a carne de coelho, os parâmetros escolhidos foram os mesófilos aeróbios e enterobactérias, considerados como indicadores de higiene pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007 que

estabelece os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Para além destes parâmetros, foram também utilizadas as contagens de *Pseudomonas*, bactérias lácticas, fungos e leveduras e psicrótróficos aeróbios. O tempo de *shelf-life* foi obtido a partir da representação gráfica dos valores das contagens microbianas em função do tempo. Como os valores referenciados no Regulamento (CE) n.º 1441/2007 apenas se referem a contagens efectuadas no dia do abate, o tempo de *shelf-life* correspondeu ao número de dias necessário para se atingir o valor das contagens considerado no trabalho desenvolvido por Rodríguez-Calleja *et al.* (2005) de 7 log UFC/g.

3.6. Challenge test

Foi efectuado um *challenge test* na carne de coelho fresco a granel com o objectivo de estudar o crescimento/ sobrevivência de diferentes microrganismos patogénicas ao longo do tempo (até 8 dias após o abate), à temperatura de $8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6.1. Colheita de carcaças

As carcaças utilizadas no *challenge test* foram colocadas em caixas próprias para contacto directo com os alimentos e foi-lhes colocada uma película plástica e etiqueta. No dia do abate foram transportadas para o laboratório de microbiologia do Instituto Superior de Agronomia, numa mala térmica com cuvetes de gelo de forma a garantir a manutenção da cadeia de frio até ao momento da realização das análises. Durante o período de ensaio as carcaças foram mantidas num frigorífico à temperatura de $8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os ensaios com as carcaças de coelho foram realizados nos dias 0, 2, 4, 6 e 8. No dia 0 os ensaios foram realizados imediatamente após a inoculação com os microrganismos.

3.6.2. Microrganismos e preparação do inóculo

Os microrganismos utilizados no *challenge testing* foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria innocua* (ATCC 33090/ NCTC 11288) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 13028). Estes microrganismos foram riscados em placas de “Tryptone soya broth” (TSB), onde cresceram durante 24 horas.

Para a preparação do meio TSB foram dissolvidas 30 g de meio desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França), com 6 g de extracto de levedura (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e 18 g de ágar-ágar (Dário Correia, Lisboa, Portugal) num litro de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, findo este período foi colocado num banho termostaticado a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. De seguida foi distribuído em placas de Petri, deixando-se secar em câmara de fluxo laminar durante 45 minutos, sendo conservado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua utilização.

Após a incubação dos diferentes microrganismos foram efectuadas suspensões em triptona sal com cada um dos microrganismos de forma a obter uma concentração inicial de 10^8 / ml. A concentração inicial foi confirmada por contagem directa do número de células em câmara de contagem para microrganismos, sendo a profundidade de 0,02 mm e a área da quadrícula de 1/ 400 mm².

3.6.3. Preparação da amostra

As amostras foram retiradas das embalagens de forma asséptica. Cortaram-se as pernas da carcaça de coelho para um recipiente para que se procedesse à inoculação com os microrganismos em estudo, sendo mantida uma amostra sem inóculo de forma a avaliar a flora de mesófilos aeróbios presente.

A preparação da suspensão – mãe e das diluições foi realizada de acordo com o descrito no ponto 3.2 e esquematizado nas figuras 2 e 3, diferindo apenas na quantidade de amostra, 5 g de amostra para 45 ml de TS (0,1 % w/v).

3.6.4. Análises microbiológicas

3.6.4.1. *Staphylococcus aureus*

A contagem de *St. aureus* foi realizada com o meio *Baird-Parker Agar* (BPA). Para a preparação do meio BPA foram dissolvidas 58 g de meio desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) em 950 ml de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C, findo este período foi colocado num banho termostaticado a 60°C. De seguida foi-lhe adicionado o suplemento de ovo (emulsão estéril de gema de ovo com telurito 10 ml da Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e distribuído em placas de Petri, deixando-se secar em câmara de fluxo laminar durante 45 minutos, sendo conservado a 4 °C até à sua utilização. A inoculação foi feita por espalhamento de 0,1 ml de amostra. As colónias de *Staphylococcus aureus* foram contadas ao fim de 24 horas a 37 °C \pm 1 °C e os resultados expressos em log UFC/g.

3.6.4.2. *Listeria innocua*

A contagem de *L. innocua* foi realizada com o meio *Palcam Agar Base* (PAB). Para a preparação do meio PAB foram dissolvidas 68,9 g de meio desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) num litro de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C, findo este período foi colocado num banho termostaticado a 60 °C. De seguida foram-lhe adicionados 2 ml do suplemento selectivo (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e distribuído em placas de Petri, deixando-se secar em câmara de fluxo laminar durante 45 minutos, sendo conservado a 4 °C até à sua utilização. A inoculação foi feita por

espalhamento de 0,1 ml de amostra. As colónias de *L. innocua* foram contadas ao fim de 24 horas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ e os resultados expressos em log UFC/g.

3.6.4.3. *Escherichia coli*

A contagem de *E. coli* foi realizada com o meio *Chromocult PTX Agar* (PTX). Para a preparação do meio PTX foram dissolvidas 20,45 g de meio desidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha) num litro de água destilada. O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C , findo este período foi colocado num banho termostaticado a 60 °C . De seguida foi distribuído em placas de Petri, deixando-se secar em câmara de fluxo laminar durante 45 minutos, sendo conservado a 4 °C até à sua utilização. A inoculação foi feita por espalhamento de 0,1 ml de amostra. As colónias de *E. coli* foram contadas ao fim de 24 horas a $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ e os resultados expressos em log UFC/g.

3.6.4.4. *Salmonella typhimurium*

A contagem de *S. typhimurium* foi realizada com o meio *Brilliant Green Agar* (Edel and Kampeimacher) (BGA). Para a preparação do meio BGA foram dissolvidas 57,3 g de meio desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) num litro de água destilada esterilizada, o meio foi preparado em cada dia de ensaio. No final da fervura o meio era colocado num banho termostaticado a 60 °C e distribuído nas placas de Petri após a colocação do inoculo. A inoculação foi feita por incorporação de 1 ml de amostra. As colónias de *S. typhimurium* foram contadas ao fim de 24 horas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ e os resultados expressos em log UFC/g.

3.7. Análises estatísticas

A análise estatística realizada foi efectuada utilizando o teste Fisher LSD com o programa Statistic 6.0 (Statsoft, Inc., USA). A determinação dos coeficientes de correlação e das taxas de crescimento foram feitos utilizando o programa OriginPro 8 (Microcal Software, Inc., USA). As taxas de crescimento (dia^{-1}) foram determinadas a partir do declive da parte linear das curvas de crescimento usando os valores obtidos na contagem de microrganismos em log UFC/g. O incremento do crescimento foi determinado como o inverso da taxa de crescimento, que corresponde ao tempo (em dias) necessário para que as populações microbianas aumentem de 1 ciclo logarítmico.

4. Resultados e discussão

4.1. Carga microbiana nas carcaças de coelho

A primeira fase do trabalho consistiu em avaliar a carga microbiana da carne fresca de coelho após o abate, sendo as carcaças retiradas após o processo de refrigeração (ver ponto 17 do fluxograma, cf. figura 8). As contagens dos vários indicadores microbiológicos determinados são apresentadas na tabela 7. Os resultados obtidos demonstraram que as carcaças laboradas apresentam uma elevada variabilidade inicial, com uma gama de valores que diferiu de 2 ou mais ciclos logarítmicos para as contagens de mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios, *Pseudomonas*, bolores e leveduras e *Enterobacteriaceae*. A exceção foi a contagem de bactérias lácticas, que variou de 1,5 log CFU/g.

Tabela 7 – Quantificação dos indicadores microbiológicos presentes nas carcaças dos coelhos antes da embalagem (log UFC/g).

	Média ± Desvio padrão	Gama de valores	N.º de amostras <limite detecção/ N.º total de amostras
Mesófilos aeróbios	3,62 ± 0,59	2,87 – 4,87	0/ 12
Psicrotróficos aeróbios	3,63 ± 0,86	2,46 – 5,25	0/ 12
<i>Pseudomonas</i>	2,68 ± 0,85	1,00 – 3,99	0/ 12
Bactérias lácticas	2,86 ± 0,40	2,21 – 3,71	0/ 12
Bolores e leveduras	1,87 ± 0,97	<1,00 – 3,92	1/ 12
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,18 ± 1,35	<1,00 – 3,27	6/ 12

De uma forma geral, a quantificação dos indicadores microbiológicos determinada no presente trabalho é semelhante às contagens microbiológicas encontradas na bibliografia consultada. Concretamente, as quantificações de *Pseudomonas* e bactérias lácticas estão dentro da gama de valores encontrada por Rodríguez-Calleja *et al.* (2004). Do mesmo modo, as contagens de bactérias lácticas também estão de acordo com a gama de valores encontrados por Rodríguez-Calleja *et al.* (2005). Enquanto que a quantificação de psicrotróficos aeróbios determinada é inferior aos valores referidos em Rodríguez-Calleja *et al.* (2005) e superior ao valor encontrado por Badr (2004), numa amostra de carne de coelho irradiada com 3,0 kGy. Num trabalho semelhante ao nosso, Berruga *et al.* (2005) encontrou menores valores para as contagens de mesófilos aeróbios, bactérias lácticas, *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae*, esta diferença pode dever-se ao facto destes autores terem realizado a amostragem por zaragatoa à superfície da carcaça.

Tal como se verificou nos trabalhos realizados por Bobbitt (2003), Rodríguez-Calleja *et al.* (2004) e Rodríguez-Calleja *et al.* (2005), os grupos microbianos predominantes foram as

Pseudomonas e as bactérias lácticas, seguindo-se dos bolores e leveduras. As contagens de *Enterobacteriaceae* apresentaram uma elevada variabilidade, não tendo sido detectadas em seis das doze amostras analisadas. Contudo, os valores por nós determinados são inferiores aos encontrados por Badr (2004) e Rodríguez-Calleja *et al.* (2004) e superiores aos determinados por Berruga *et al.* (2005) e Rodríguez-Calleja *et al.* (2005).

Tendo em consideração o processo de fabrico (cf. figura 8), as contagens microbianas iniciais estão relacionadas com a contaminação inicial dos coelhos e com as condições de manipulação durante o processo de abate até ao momento do acondicionamento. Este factor deve ser tido em conta na avaliação do prazo de validade, uma vez que cada ponto de amostragem analisado ao longo do tempo corresponde a uma carcaça diferente. Assim, a evolução da flora microbiana reflectirá, para além das variações ocorridas durante o tempo de incubação, a variabilidade das contaminações iniciais. A forma de superar esta limitação foi realizar a análise em três lotes de fornecedores diferentes de coelhos vivos, o que permitiria minimizar o efeito da variabilidade da contaminação inicial nas eventuais diferenças entre as formas de embalagem testadas. Para confirmar esta hipótese, os valores das contagens iniciais (cf. tabela 7) foram agrupados de acordo com o tipo de embalagem posterior e submetidos a análise estatística pelo teste Fisher LSD. Os resultados da análise estatística, apresentados na tabela 8, permitiram verificar que as contagens microbianas, considerando as contagens de mesófilos aeróbios, embora sejam provenientes de diferentes lotes não são significativamente diferentes entre si, isto é como os valores são todos superiores a 0,05 então as amostras não são diferentes, com uma probabilidade de 95%. Desta forma, em termos estatísticos, a utilização de três lotes diferentes parece ser suficiente para que a influência da variabilidade da contaminação inicial seja equivalente para as formas de acondicionamento testadas.

Tabela 8 – Resultados do teste Fisher LSD referentes ao dia zero, com todas as amostras (p <0,05).

	CG ^{a)}	CE ^{b)}	CATM 1 ^{c)}	CATM 2 ^{d)}	CATM 3 ^{e)}
CG		0,323543	0,336582	0,896105	0,804455
CE	0,323543		0,978434	0,265499	0,456211
CATM 1	0,336582	0,978434		0,276845	0,472445
CATM 2	0,896105	0,265499	0,276845		0,7075581
CATM 3	0,804455	0,456211	0,472445	0,7075581	

a) CG – Coelho a granel

b) CE – Coelho embalado

c) CATM 1 – Coelho embalado sob atmosfera modificada com filme de 35 µm de espessura

d) CATM 2 – Coelho embalado sob atmosfera modificada com filme de 35 µm de espessura

e) CATM 3 – Coelho embalado sob atmosfera modificada com filme de 45 µm de espessura

4.2. Relação entre os indicadores microbiológicos

A obtenção de um elevado número de resultados analíticos permite observar eventuais correlações entre os vários indicadores. Estas correlações permitiram determinar qual será o indicador mais adequado para avaliar a qualidade microbiológica do produto e que pode servir como medida para determinação do prazo de validade.

A figura 11 mostra as correlações obtidas entre mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios, mesófilos aeróbios e *Pseudomonas*, mesófilos aeróbios e bactérias lácticas, e mesófilos aeróbios e bolores e leveduras, usando os valores das contaminações iniciais. Na tabela 9 são apresentados os coeficientes de correlação e os declives das rectas obtidas.

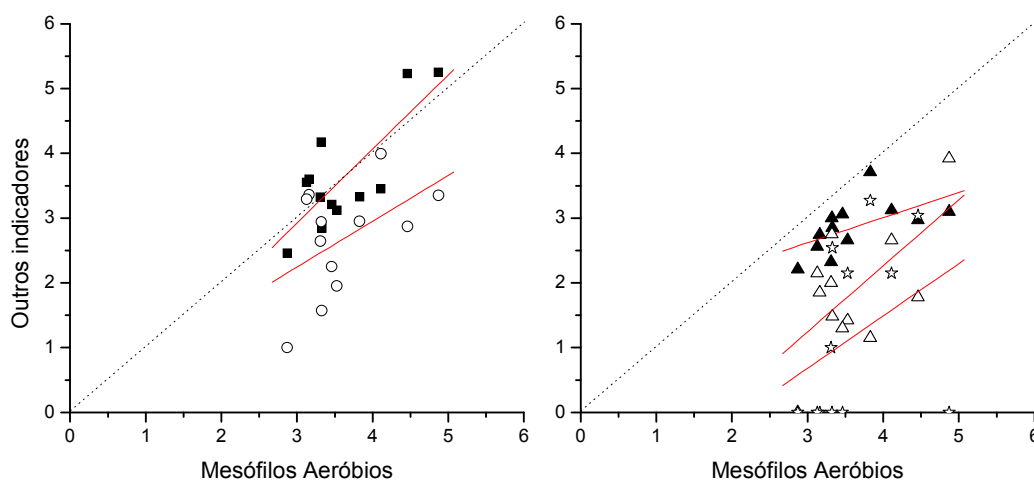


Figura 11 – Relações entre as contagens dos indicadores microbiológicos (log UFC/g) determinados em carcaças de coelhos antes da embalagem (■ – Psicrotróficos aeróbios; ○ – *Pseudomonas*; ▲ – Bactérias lácticas; △ – Bolores e leveduras; ☆ – *Enterobacteriaceae*). As rectas a ponteadas traduzem o valor 1 de correlação. As rectas a vermelho traduzem a correlação entre os vários indicadores microbiológicos.

Tabela 9 – Correlações entre os diferentes indicadores microbiológicos.

	Declive	r
Mesófilos aeróbios x Psicrotróficos aeróbios	1,14 ± 0,28	0,789
Mesófilos aeróbios x <i>Pseudomonas</i>	0,71 ± 0,39	0,493
Mesófilos aeróbios x Bactérias lácticas	0,39 ± 0,18	0,573
Mesófilos aeróbios x Bolores e leveduras	1,02 ± 0,41	0,621
Mesófilos aeróbios x <i>Enterobacteriaceae</i>	0,81 ± 0,67	0,356

Numa primeira observação, pela proximidade do declive do valor 1, parece ser indiferente usarmos os indicadores mesófilos aeróbios ou psicrotróficos aeróbios. Tal consideração não se aplica à relação com bolores e leveduras, com declive 1, porque os valores destas contagens são sempre inferiores aos dos mesófilos aeróbios (cf. anexos II a VI). Em relação às *Pseudomonas*, houve duas amostras, em doze, com valores superiores aos dos mesófilos aeróbios. Assim, parece-nos que este indicador não será mais indicado do que os mesófilos aeróbios para avaliarmos a evolução do prazo de validade. No caso das *Enterobacteriaceae*, a falta de correlação é evidenciada pela ausência de contagens em seis das doze amostras analisadas, pelo que nos parece que, também, não é um indicador adequado para este estudo. No entanto, quando presentes, os valores mais elevados de *Enterobacteriaceae* correspondem a valores mais elevados de mesófilos aeróbios (cf. anexos II a VI). Por outro lado, a ausência deste indicador foi observada em amostras com elevado número de mesófilos aeróbios, o que suscita a necessidade de avaliar futuramente qual o parâmetro mais adequado como indicador da qualidade higiénica do processamento de carne coelho.

4.3. Evolução da flora microbiana ao longo do tempo de incubação

As amostras de coelho acondicionadas sob diferentes formas foram analisadas ao longo do tempo, em relação aos diferentes indicadores microbiológicos. Os resultados de todas as análises realizadas estão apresentados nos anexos II, III, IV, V e VI, respectivamente, em relação a: i) carne de coelho fresco a granel (CG), ii) carne de coelho fresco embalado (CE), iii) carne de coelho fresco embalado sob atmosfera modificada com filme de alta barreira com 35 μm de espessura (CATM 1), iv) carne de coelho fresco embalado sob atmosfera modificada com filme de alta barreira com 35 μm de espessura (CATM 2) e v) carne de coelho fresco embalado sob atmosfera modificada com filme de alta barreira com 45 μm de espessura (CATM 3).

A título ilustrativo são apresentados, na figura 12, os valores das contagens para o coelho embalado sob atmosfera modificada com filme de 35 μm de espessura (CATM2). Os valores revelaram uma evolução crescente dos indicadores mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios, *Pseudomonas* e bactérias lácticas. Os bolores e leveduras mantiveram valores estáveis e as *Enterobacteriaceae* apresentam tendência para crescer, embora nem sempre tenham sido detectadas ao longo do tempo. Os resultados revelaram uma elevada variabilidade das contagens, evidenciada pelos elevados valores obtidos no desvio padrão da média e pela gama de contagens observada (anexo V). Tal facto não é de estranhar devido à elevada variabilidade verificada nas amostras iniciais, tal como foi referido ponto 4.1.

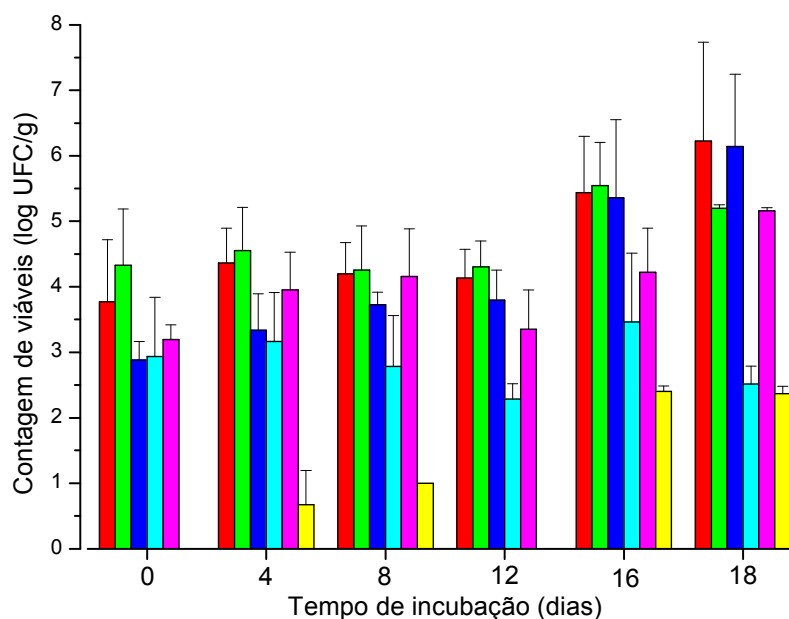


Figura 12 – Evolução das contagens microbiológicas ao longo do tempo de incubação das amostras de coelho embaladas sob atmosfera modificada com filme de alta barreira com 35 µm de espessura (■ Mesófilos aeróbios; ■ Psicrotrofos aeróbios; ■ Bactérias lácticas; ■ Bolores e leveduras; ■ Pseudomonas; ■ Enterobacteriaceae).

A análise dos resultados a seguir descrita foi feita com base nas três principais formas de embalagem seleccionadas pela empresa com base neste trabalho: i) coelho a granel (CG); ii) coelho embalado (CE) e iii) coelho embalado sob atmosfera modificada com filme de alta barreira com 45 µm de espessura (CATM3). De facto, os resultados do primeiro ensaio com o coelho embalado sob atmosfera modificada com filme de 35 µm (CATM1) revelaram que havia deficiência no processo de termoselagem das amostras, pelo que os resultados não possuíam significado tecnológico. Para o coelho embalado sob atmosfera modificada a empresa optou pelo filme de alta barreira com 45 µm de espessura, sendo também este que apresenta melhores resultados a nível de contagens microbiológicas por comparação com o filme de alta barreira com 35 µm de espessura, tal como é evidenciado nos anexos V e VI, respectivamente, pelo que os resultados do CATM2 não foram considerados para a determinação do prazo de validade. A evolução das contagens nas amostras embaladas nas outras condições seguiu um perfil semelhante ao apresentado na figura 12, excepto em relação às *Enterobacteriaceae*, que não apresentaram acréscimo ao longo do tempo, e dos bolores e leveduras que mostraram tendência para aumentar ligeiramente ao longo do tempo, mantendo-se sempre abaixo de 5 log UFC/g.

Com base nestas observações, o estudo do prazo de validade foi efectuado com base nas contagens de mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios, bactérias lácticas e *Pseudomonas* para o CG, CE e CATM3. A evolução destes indicadores ao longo do tempo está apresentada na figura 13.

O CG foi o que apresentou aumentos mais rápidos da flora microbiana, em particular dos psicrotróficos aeróbios, a partir de 3 – 4 dias de incubação. Ao fim de 8 dias, apenas este indicador passou acima de 5 log UFC/g. As *Pseudomonas* também registaram um incremento significativo ao fim de 4 dias, mas os valores das contagens não evoluíram após este tempo.

Ainda que o CG tenha apresentado um aumento microbiano mais precoce, os valores máximos detectados ocorreram nas outras formas de embalagem devido ao maior tempo de incubação. De uma forma geral, as amostras embaladas ao ar ou sob atmosfera modificada, mostraram valores próximos ou acima de 5 log UFC/g de um ou vários indicadores, no fim do período de incubação, após uma fase lag de 4 ou mais dias. A excepção foi a contagem de *Pseudomonas* no CATM 3, onde só se verificou a existência de um aumento significativo no fim do período de incubação.

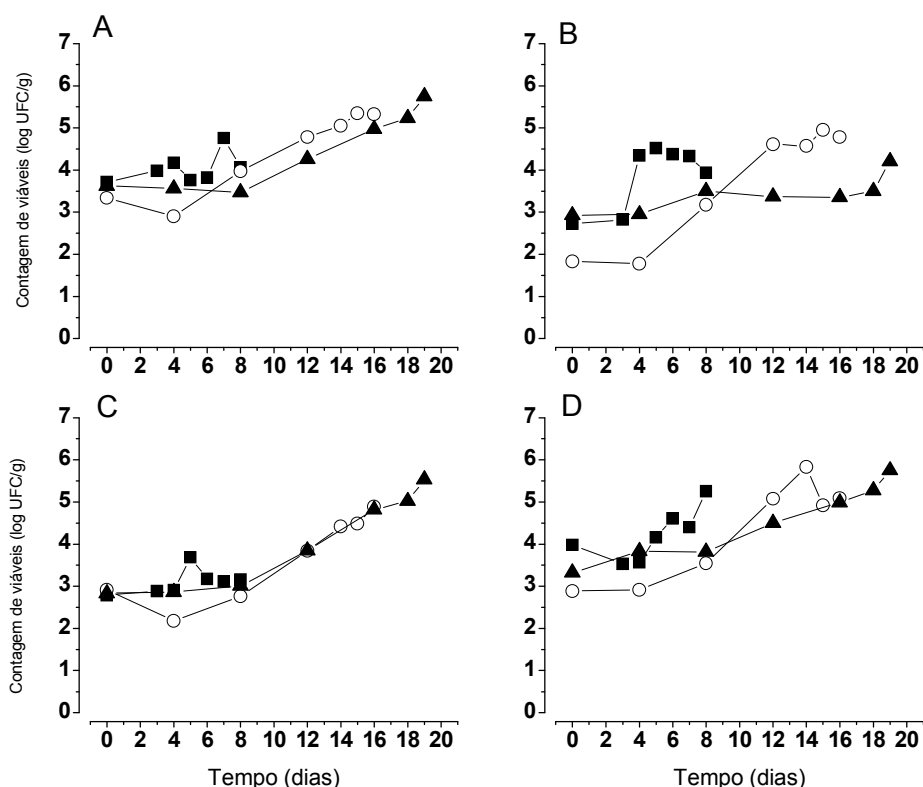


Figura 13 – Evolução da flora microbiana do coelho a granel (CG) (■), embalado (CE) (○) e embalado sob atmosfera modificada (CATM3) (▲) ao longo do tempo (A – Mesófilos aeróbios; B – *Pseudomonas*; C – Bactérias lácticas; D – Psicrotróficos aeróbios).

4.4. Determinação das taxas de crescimento e do incremento

O período de crescimento exponencial observado na maior parte dos indicadores, representados na figura 13, permitiu estimar uma taxa de crescimento que traduz o aumento do logaritmo da população por dia. O valor do incremento foi calculado a partir do inverso da taxa de crescimento, correspondendo aos dias necessários para que as contagens aumentem de um ciclo logarítmico. A fase lag foi determinada como o tempo, em dias, a partir do qual o crescimento foi exponencial. Na prática correspondeu ao primeiro dia a partir do qual se determinou a taxa de crescimento. A tabela 10 mostra os valores determinados para estes 3 parâmetros, relativos aos vários indicadores microbiológicos em função do tipo de embalagem.

Tabela 10 – Fase lag (dias), taxa de crescimento (dias⁻¹) e incremento (dias) dos indicadores microbianos, mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios, *Pseudomonas*, bactérias lácticas e bolores e leveduras, em função do tipo de embalagem.

	Coelho a granel			Coelho embalado			Coelho embalado sob atmosfera modificada		
	Fase lag (dias)	Taxa de crescimento (dias ⁻¹)	Incremento (dia)	Fase lag (dias)	Taxa de crescimento (dias ⁻¹)	Incremento (dia)	Fase lag (dias)	Taxa de crescimento (dias ⁻¹)	Incremento (dia)
Mesófilos aeróbios	4	0,19±0,21	5,3	4	0,20±0,01	5,0	8	0,19±0,01	5,3
Psicrotróficos aeróbios	4	0,36±0,09	2,8	4	0,21±0,05	4,8	8	0,16±0,02	6,3
<i>Pseudomonas</i>	3 – 4	0,00	–	4	0,26±0,03	3,9	–	0,00	–
Bactérias lácticas	–	0,00	–	4	0,23±0,01	4,3	8	0,22±0,01	4,5
Bolores e leveduras	4	0,15±0,07	6,7	4	0,21±0,04	4,8	–	0,00	–

Os resultados mostraram que há uma relativa homogeneidade do crescimento/ incremento das contagens. Os valores mais divergentes corresponderam aos psicrotróficos aeróbios no CG, que apresenta taxas próximas do dobro das outras formas de embalagem. No caso das *Pseudomonas* no coelho a granel, a seguir à fase lag não ocorreu crescimento, provavelmente devido ao facto das carcaças terem diferentes cargas microbianas iniciais. Como seria de esperar, no coelho embalado sob atmosfera modificada as bactérias lácticas e as *Pseudomonas* apresentaram um período de latência no seu crescimento, evidenciando-se mesmo que as *Pseudomonas* não cresceram excepto no fim do período de incubação, estes resultados estão de acordo com o relatado por Berruga *et al.* (2005) que indica que as *Pseudomonas* apresentaram um período de latência de cerca de 15 dias.

O resultado mais interessante do nosso trabalho foi a observação de que o efeito da atmosfera modificada é especialmente significativo na fase lag, uma vez que as taxas de

crescimento de mesófilos aeróbios, psicrotrofos aeróbios e bactérias lácticas são semelhantes às obtidas na embalagem sob ar, sendo este dado pouco relatado na bibliografia consultada. Day (2000) e Walsh (2000) referem que o CO₂ utilizado na atmosfera modificada possui um efeito bacteriostático e fungicida, e que o efeito negativo que existe entre várias enzimas e reacções bioquímicas conduzem a um aumento da fase lag e do tempo de geração. O trabalho elaborado por Berruga *et al.* (2005) refere que a atmosfera modificada inibe ou desacelera o crescimento de *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae*, não especificando em que fase do seu crescimento.

Em relação aos bolores e leveduras, como a taxa de crescimento foi inferior ou semelhante à dos outros indicadores, não os considerámos para a avaliação do prazo de validade.

4.5. Determinação do prazo de validade

Em face dos resultados anteriores, para termos os dados analíticos necessários ao cálculo do prazo de validade, falta assumir um valor máximo admissível para as contagens microbianas. Numa primeira aproximação retivemos o valor de 7 log UFC/g, por este ser o valor referido por Berruga *et al.* (2005) e por Rodríguez-Calleja *et al.* (2005), a partir do qual as carcaças começam a demonstrar alterações como “softening” e superfície brilhante com uma ligeira humidade. No entanto, no nosso caso pareceu-nos ser mais correcto tomar o valor 6 log UFC/g como limite. De facto, nas carcaças por nós analisadas, foram observados odores e colorações estranhas (figura 14a), formação de uma camada viscosa na superfície da carcaça (figura 14b), rancificação das gorduras (figura 14c) e fígado mole e com coloração esverdeada (figura 14d), após 16, 18 e 19 dias de armazenagem em carcaças embaladas e embaladas sob atmosfera modificada, respectivamente, quando as contagens se aproximam desse valor.

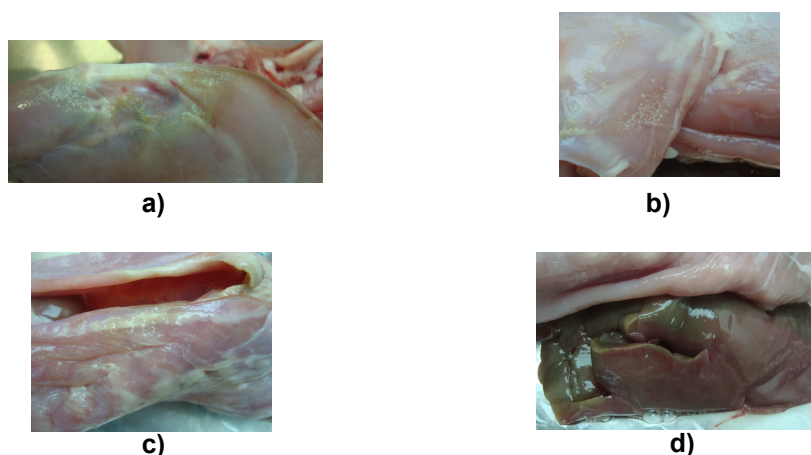


Figura 14 – Alterações encontradas nas carcaças analisadas. a) Carcaça com odores e coloração estranhos; b) Formação de uma camada viscosa na superfície da carcaça; c) Rancificação das gorduras e d) fígado com coloração esverdeada.

Em resumo, a determinação do prazo de validade tecnológico foi feita por tipo de embalagem, assumindo uma contagem máxima de 6 UFC/g, e uma fase lag e taxa de crescimento em função dos indicadores respectivos (ver tabela 10). Os valores do prazo de validade, em dias, foram calculados em função da contaminação inicial da carcaça e dos valores médios e máximos de contaminação observados nas amostras iniciais (ver tabela 7). Os valores do prazo de validade para o coelho a granel estão apresentados na tabela 11. Neste caso, devido ao curto tempo de incubação, apenas se observou crescimento em relação aos mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios. Os valores mais reduzidos foram determinados para os psicrotróficos aeróbios e podem ser de apenas 4 dias, quando a carga microbiana é elevada.

Os valores para o coelho embalado sob ar estão listados na tabela 12. Neste caso verificou-se um tempo de prazo de validade equivalente para os 4 indicadores. Assim, o indicador limitante, foi aquele que apresentou valores de contaminação inicial mais elevados, caso dos psicrotróficos aeróbios.

Em relação ao coelho embalado sob atmosfera modificada, os valores do prazo de validade dos vários indicadores são semelhantes, em especial para contaminações superiores a 4 log UFC/g, pelo que o prazo de validade é determinado pelos valores mais elevados de contaminação inicial. Como os valores iniciais mais elevados correspondem às contagens de psicrotróficos aeróbios, este será o indicador limitante. Os valores do prazo de validade para o coelho embalado sob atmosfera modificada estão representados na tabela 13.

Tabela 11 – Determinação do prazo de validade em coelho a granel em função dos indicadores microbiológicos com crescimento observado, mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios, considerando a fase lag de 4 dias e o incremento de 5,3 e 2,8 dias, respectivamente.

Carga inicial (log UFC/ g)	Mesófilos aeróbios		Psicrotróficos aeróbios	
	Fase lag (dias)	Prazo de validade (dias) ^{a)}	Fase lag (dias)	Prazo de validade (dias) ^{a)}
2	4	25	4	15
3	4	19	4	12
4	4	14	4	9
5	4	9	4	6
6	4	4	4	4
3,62/ 3,63 ^{b)}	4	16	4	10
4,87/ 5,25 ^{c)}	4	10	4	6

a) Valores arredondados por excesso

b) Valores médios de contagens de mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios, em amostras independentes, respectivamente (tabela 7).

c) Valores mais elevados de contagens de mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios, em amostras independentes, respectivamente (tabela 7).

Tabela 12 – Determinação do prazo de validade em coelho embalado em função dos indicadores microbiológicos com crescimento observado, mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios, *Pseudomonas* e bactérias lácticas, considerando a fase lag de 4 dias e o incremento de 5, 4,8, 3,9 e 4,3 dias, respectivamente.

Carga inicial (log UFC/ g)	Mesófilos aeróbios		Psicrotróficos aeróbios		<i>Pseudomonas</i>		Bactérias lácticas	
	Fase lag (dias)	Prazo de validade (dias) ^{a)}	Fase lag (dias)	Prazo de validade (dias) ^{a)}	Fase lag (dias)	Prazo de validade (dias) ^{a)}	Fase lag (dias)	Prazo de validade (dias) ^{a)}
2	4	24	4	23	4	19	4	21
3	4	19	4	18	4	15	4	16
4	4	14	4	13	4	11	4	12
5	4	9	4	8	4	8	4	8
6	4	4	4	4	4	4	4	4
3,62/ 3,63/ 2,68/ 2,86 ^{b)}	4	15	4	15	4	16	4	17
4,87/ 5,25/ 3,99/ 3,71 ^{c)}	4	9	4	7	4	11	4	13

a) Valores arredondados por excesso

b) Valores médios de contagens de mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios, em amostras independentes, respectivamente (tabela 7).

c) Valores mais elevados de contagens de mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios, em amostras independentes, respectivamente (tabela 7).

Tabela 13 – Determinação do prazo de validade em coelho embalado sob atmosfera modificada em função dos indicadores microbiológicos com crescimento observado, mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios e bactérias lácticas, considerando a fase lag de 8 dias e o incremento de 5,3, 6,3 e 4,5 dias, respectivamente.

Carga inicial (log UFC/ g)	Mesófilos aeróbios		Psicrotróficos aeróbios		Bactérias lácticas	
	Fase lag (dias)	Prazo de validade (dias) ^{a)}	Fase lag (dias)	Prazo de validade (dias) ^{a)}	Fase lag (dias)	Prazo de validade (dias) ^{a)}
2	8	29	8	33	8	26
3	8	23	8	26	8	21
4	8	18	8	20	8	17
5	8	13	8	14	8	12
6	8	8	8	8	8	8
3,62/ 3,63/ 2,86 ^{b)}	8	20	8	22	8	22
4,87/ 5,25/ 3,71 ^{c)}	8	14	8	12	8	18

a) Valores arredondados por excesso

b) Valores médios de contagens de mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios, em amostras independentes, respectivamente (tabela 7).

c) Valores mais elevados de contagens de mesófilos aeróbios e psicrotróficos aeróbios, em amostras independentes, respectivamente (tabela 7).

Sabendo que na empresa são utilizados como prazos de validade 8, 10 e 12 dias para o CG, CE e CATM, respectivamente, parece-nos que se está a trabalhar com uma base pouco

segura, devido à probabilidade de ocorrência de elevadas contaminações iniciais. Assim, se os prazos de validade não forem reduzidos, o desafio da empresa será controlar os valores máximos de contaminação iniciais em mesófilos aeróbios ou psicrotróficos aeróbios abaixo de 4 log CFU/g, para o CG e CE, e 5 log UFC/g, para o CATM3.

Uma vez que se se considerar como limite de contaminação inicial os 4 log UFC/ g o prazo de validade para o CG será de 9 dias, sendo limitado pelo desenvolvimento de psicrotróficos aeróbios, para o CE de 11 dias, sendo o indicador limitante as *Pseudomonas* e para o CATM 17 dias sendo este limitado pelo crescimento de bactérias lácticas. Se o limite de contaminação inicial for 5 log UFC/ g o prazo de validade para o CG, CE e CATM serão de 6, 7 e 12 dias, respectivamente.

O valor para o prazo de validade encontrado para o CG está de acordo com o indicado por Rodríguez-Calleja *et al.* (2005), 6,8 dias para uma contaminação inicial de cerca de 5 log UFC/g de psicrotróficos aeróbios. O prazo de validade determinado para o CATM está dentro dos limites estabelecidos por Berruga *et al.* (2005), que refere que para todas as atmosferas analisadas, o prazo de validade das carcaças de coelho varia entre 9 e 18 dias.

4.6. Evolução do pH

Na determinação de pH realizada ao longo do tempo foi possível verificar que este apresenta poucas variações ao longo do tempo, $6,01 \pm 0,06$ e $6,36 \pm 0,20$, valor mais baixo e mais alto respectivamente. Este valor aproxima-se do valor de pH determinado por Rodríguez-Calleja *et al.* (2005), $6,26 \pm 0,20$, no músculo *Biceps femoris*. Os valores de pH encontrados no presente trabalho são superiores aos determinados por Rodríguez-Calleja *et al.* (2004) (5,98) e por Vergara *et al.* (2005) ($5,76 \pm 0,01$).

4.7. Challenge test

Durante a análise das amostras não foram detectados patogénicos pelo que não é possível avaliar a sua evolução ao longo do tempo. Assim, realizou-se um *challenge test* para observar o crescimento de espécies aparentadas com conhecidos patogénicos perigosos.

Os resultados apresentados na figura 15 são relativos a dois ensaios independentes realizados com coelho a granel. O *challenge test* não foi efectuado nos coelhos embalado e embalado sob atmosfera modificada por questões de segurança alimentar, pois o embalamento foi efectuado na unidade industrial. Os resultados mostraram a diversidade no comportamento nas duas amostras analisadas. No entanto, a única espécie que cresce de forma evidente em ambas as amostras é *L. innocua*. As outras bactérias inoculadas demonstraram um crescimento praticamente nulo ao longo do tempo de incubação. Os mesófilos aeróbios cresceram a uma taxa média, nos dois testes, de $0,18 \text{ dias}^{-1}$, o que está

de acordo com o calculado anteriormente (ver tabela 10), embora neste caso não tenham apresentado uma fase lag.

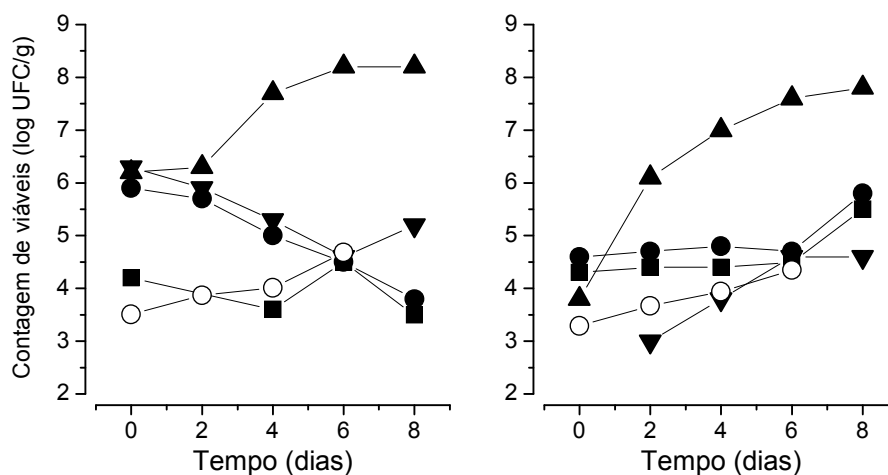


Figura 15 – Evolução da viabilidade das bactérias *E. coli* (●), *Salmonella* (■), *St. aureus* (▼), *Listeria innocua* (▲) e mesófilos aeróbios (○) após inoculação em carne de coelho, em duas experiências independentes, incubada em aerobiose a 8 °C.

O efeito da embalagem sob atmosfera modificada na taxa de crescimento tem sido estudado por vários autores. Hintlian e Hotchkiss (2007) referem que uma atmosfera modificada com elevada concentração de CO₂ (cerca de 75%) não inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus*, enquanto a presença de *Salmonella* é extremamente afectada pela mesma concentração de CO₂. Phillips (1996) também refere que o crescimento de enterobactérias, incluindo a *Salmonella*, é reduzido com o aumento da concentração de CO₂. Phillips (1996) referiu que MAP constituído com 3% de O₂ e 97% de N₂ possui um efeito quase nulo sobre a população de *E. coli*, quando comparadas com o controlo armazenado ao ar. Nissen *et al.* (2000), numa análise a carne picada verificou que uma atmosfera modificada constituída por uma elevada concentração de CO₂ e baixa concentração de CO inibe o crescimento de *E. coli*. Farber *et al.* (2003) referiu que a *Listeria* tem sido reportada como um microrganismos que praticamente não é afectado com a utilização de MAP. Os produtos que são acondicionados com MAP podem estar organolepticamente aceitáveis, contudo podem apresentar *L. monocytogenes*, especialmente se houver uma baixa concentração de bactérias lácticas. Concentrações entre 10 e 20% de CO₂ estimulam o crescimento de *L. monocytogenes* à superfície de modelos alimentares. Farber *et al.* (2003) referiu que se houver um aumento da concentração de CO₂ para níveis próximos de 20% há um aumento no crescimento de bactérias lácticas o que irá proporcionar uma inibição no crescimento de microrganismos patogénicos. Nissen *et al.* (2000) verificou que a *Listeria monocytogenes*

demonstrou um crescimento reduzido em todas as formas de acondicionamento: 60% de CO₂/ 40% de N₂, elevada concentração de CO₂/ baixa concentração de CO e elevada concentração de O₂. Este facto foi também descrito por Fraqueza *et al.* (2006), num ensaio realizado com carne de peru, onde não ocorreu crescimento de *L. monocytogenes* em qualquer uma das embalagens MAP constituídas por 0,5%CO/ 49,5% N₂/ 50% CO₂, 50% N₂/ 50% CO₂ e 50% Ar/ 50% CO₂, quando a carne foi armazenada a temperaturas de 7 e 0 °C. Em face destes resultados não é de supor que os microrganismos cresceriam mais rapidamente sob atmosfera modificada, pelos que os nossos resultados deixam concluir que, eventualmente, o único patogénico com capacidade para crescer em carne de coelho refrigerada sejam membros do género *Listeria*.

4.8. Aplicação industrial dos estudos do prazo de validade

4.8.1. Determinação de especificações industriais

A tabela 14 mostra o nível inicial de contaminações determinadas ao longo do ano de 2008, na empresa em estudo. Quando se considerou o limite de 6 log UFC/g para determinar o prazo de validade verificou-se que contaminações iniciais de mesófilos aeróbios superiores a 5 log UFC/g não são confortáveis para o coelho a granel e embalado sob ar. Assim, as carcaças que apresentassem este nível de contaminação inicial deveriam ser destinadas para embalagem sob atmosfera modificada, se fosse possível ter resultados em tempo útil.

Tabela 14 – Nível inicial de contaminações iniciais, expressas em log UFC/g, determinadas no decorrer do ano 2008, e respectiva previsão do prazo de validade (em dias) atendendo à contaminação inicial de mesófilos a 30 °C (análises realizadas por laboratório independente).

Contaminação (UFC/g)				Prazo de validade previsível para um nível máximo de 6 log UFC/ g		
Mesófilos a 30 °C	Bactérias coliformes a 30 °C	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coelho a granel	Coelho embalado	Coelho embalado sob atmosfera modificada
5,18	2,32	1,48	<2,00	8	8	12
4,53	2,61	<1,00	<2,00	11	11	15
3,83	2,11	<1,00	<2,00	15	14	19
4,67	<1,00	<1,00	<2,00	11	10	15
7,04	4,96	4,83	4,32	—	—	—
5,77	4,18	4,08	<2,00	5	5	9
4,38	<1,00	2,36	<2,00	12	12	16
4,99	2,84	2,79	<2,00	9	9	13
4,97	4,49	3,91	4,04	9	9	13
3,67	<1,00	<1,00	<2,00	16	15	20
4,04	<1,00	<1,00	<2,00	14	13	18
5,30	<1,00	<1,00	<2,00	7	7	11
5,32	<1,00	1,00	1,00	7	7	11
5,86	4,91	4,56	1,00	4	4	8
2,86	1,18	<1,00	1,00	20	19	24
5,30	<1,00	<1,00	1,00	7	7	11
4,04	<1,00	<1,00	1,00	14	13	18
3,67	<1,00	<1,00	1,00	16	15	20
3,74	<1,00	<1,00	<2,00	15	15	20

Assumindo uma especificação industrial de 4 log UFC/g, apenas 5 em 19 lotes seriam aceites. Se o valor fosse de 5 log UFC/g, seriam aceites 12 em 19 lotes, o que pensamos ser ainda um valor baixo de aceitação. Assim, parece-nos que o mais correcto a curto prazo será reduzir o prazo de validade, em especial dos coelhos a granel ou embalados sob ar.

4.8.2. Verificação do nível de contaminação após o prazo de validade

Na parte final deste trabalho, foram realizadas análises ao produto após o final do prazo de validade para verificar se foram ultrapassados os valores estabelecidos como limite (6 log UFC/g). Na tabela 15 são apresentados os resultados de análises efectuadas pela empresa de auditoria, nos vários tipos de embalagem e para várias partes do coelho.

Tabela 15 – Resultados analíticos (em log UFC/g) no final do prazo de validade previsto para o coelho a granel, coelho embalado e coelho embalado sob atmosfera modificada.

Tipo de embalagem	Ponto de amostragem	Mesófilos a 30 °C	<i>Enterobacteriaceae</i>
Coelho a granel com 7 dias	Fígado	5,11	2,28
	Ombro	6,26	1,60
	Coxas	7,23	2,49
	Costela	6,36	2,60
Coelho embalado com 11 dias	Fígado	5,38	2,78
	Ombro	5,99	<1,00
	Coxas	5,04	<1,00
Coelho embalado sob atmosfera modificada com 14 dias	Fígado	4,28	<1,00
	Ombro	4,92	<1,00
	Coxas	5,62	2,34

Os resultados da tabela 15 mostram que analisando várias partes da carcaça de coelho verifica-se que apenas no CG houve pontos a excederem os 6 e 7 log UFC/g, sendo o valor mais elevado nas coxas da carcaça (7,23 log UFC/ g). Tal facto está de acordo com as nossas previsões anteriores, pois o coelho a granel foi o produto onde o prazo de validade utilizado pela empresa nos parecia menos seguro. A análise dos restantes coelhos após o fim do prazo de validade revelaram valores acima de 7 log UFC/g e as carcaças já demonstravam sinais de deterioração.

Tabela 16 – Resultados analíticos (em log UFC/g) no final do prazo de validade previsto para o coelho a granel, coelho embalado e coelho embalado sob atmosfera modificada, com os valores médios e respectivos desvios padrão para os resultados analíticos (em log UFC/g), com 3 amostras diferentes.

Dias de refrigeração	Valor médio e desvio padrão de contagens para mesófilos a 30 °C
Coelho a granel com 7 dias	7,67 ±0,48
Coelho embalado com 11 dias	6,90±0,72
Coelho embalado sob atmosfera modificada com 14 dias	7,15±0,19

Os resultados expressos na tabela 16 revelam que as amostras analisadas não cumprem com os requisitos dos 6 log UFC/ g como limite de aceitabilidade. Estes dados podem ser explicados por valores elevados de contaminação inicial ou abuso na temperatura de armazenagem. Em face das nossas observações anteriores, pensamos que estes resultados corroboram uma vez mais a necessidade de reduzir os prazos de validade industriais enquanto não se processarem coelhos com teores mais reduzidos de contaminação inicial.

4.9. Caracterização taxonómica

4.9.1. Leveduras

Foram efectuados testes de identificação das leveduras que eram predominantes no decorrer do ensaio. Para identificação das leveduras estas foram seleccionadas, isoladas e analisadas pelo método PCR-RFLP da região 5,8S-ITS do rRNA das leveduras. Os perfis observados conduziram a leveduras da espécie *Cryptococcus laurentii* e *Yarrowia lipolítica*, tendo esta espécie sido confirmada por um teste expedito de crescimento a 37 °C. Das colónias que não foi possível identificar através do método PCR-RFLP foi efectuada uma sequenciação da região D1D2 do gene 26S do rRNA das leveduras tendo identificado as leveduras MC7 – *Mrakia frígida* e MCC – *Sporobolomyces roseus*. A identificação das leveduras foi um trabalho externo, efectuado no laboratório de microbiologia do Instituto Superior de Agronomia de acordo com os protocolos publicados.

4.9.2. Bactérias

No decorrer do trabalho foram realizados testes de confirmação de várias colónias de *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae*, tendo estes testes sido efectuados de acordo as normas ISO 13720 (E) (1995) e ISO 21528-2 (2002), respectivamente. Das colónias analisadas verificou-se que as colónias que se desenvolveram eram pertencentes aos grupos microbiológicos em estudo.

Foram ainda feitas alguns testes bioquímicos de bactérias que se desenvolveram no meio CRB, utilizado para leveduras.

Para a identificação rápida das bactérias foram efectuados testes que caracterizam a sua forma, a coloração Gram, o teste da oxidase, o teste da catalase e fermentação da glucose, no meio GA. Os resultados obtidos para estes testes são apresentados na tabela 14.

Tabela 17 – Resultados da identificação rápida de colónias de bactérias.

Colónia	Forma	Coloração Gram	Teste oxidase	Teste catalase	Fermentação glucose
1	Bastonetes	-	-	+	+
2	Bastonetes	-	-	+	+
3	Bastonetes	-	-	+	+
4	Bastonetes	-	-	+	+
4A	Bastonetes	-	-	+	+
5	Bastonetes	-	-	+	+
6	Bastonetes	-	-	+	+

Por análise da tabela 17 verifica-se que as bactérias isoladas apresentam características semelhantes entre si. Para identificar o género a que pertencem recorreu-se a uma tabela que se encontra no anexo VII, baseada no *Cown and Steel's Manual for the Identification of medical Bactéria*, tendo-se verificado que todas as bactérias presentes a identificação pertencem ao género *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*).

5. Conclusões

A realização deste trabalho surgiu no âmbito da necessidade de um centro de abate de coelhos estabelecer os parâmetros para controlo das condições higiénicas e os limites para a *shelf-life* dos diferentes produtos produzidos: coelho a granel, coelho embalado e coelho embalado sob atmosfera modificada. Para tal, e como não existe legislação específica para a carne de coelho fresco, foi necessário determinar qual a flora microbiana predominante neste tipo de produto. Dos indicadores microbiológicos analisados, mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios, *Pseudomonas*, bactérias lácticas, bolores e leveduras e *Enterobacteriaceae*, verificou-se uma grande variabilidade nas contagens das contaminações iniciais. A gama de valores das contagens microbianas diferiu de 2 ou mais ciclos logarítmicos para todos os indicadores com excepção das bactérias lácticas, que variaram 1,5 log UFC/g. A variabilidade nas contagens iniciais está relacionada com a contaminação inicial dos coelhos vivos e com as condições de manipulação durante o processo de abate até ao momento de acondicionamento. Com estas análises foi possível verificar que os grupos microbianos predominantes foram as *Pseudomonas* e as bactérias lácticas, seguindo-se dos bolores e leveduras. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos realizados por Bobbitt (2003), Rodríguez-Calleja *et al.* (2004, 2005).

De uma forma geral, houve uma evolução crescente dos indicadores mesófilos aeróbios, psicrotróficos aeróbios, *Pseudomonas* e bactérias lácticas, com o tempo de incubação. Os bolores e leveduras apresentaram valores relativamente estáveis ao longo do tempo. As *Enterobacteriaceae* apresentaram tendência para crescer, embora nem sempre tenham sido detectadas durante o tempo que duraram os ensaios.

Para além do estudo da evolução da flora microbiana ao longo do tempo nas diferentes formas de embalagem, foi ainda efectuado um estudo para avaliar qual o filme que apresentava melhores características para o coelho embalado sob atmosfera modificada, tendo-se verificado que o que conduziu a melhores resultados foi o filme de 45 µm de espessura.

Com base nos crescimentos observados dos vários indicadores microbiológicos, com excepção das *Enterobacteriaceae*, foi possível determinar a fase lag, a taxa e o incremento de crescimento para cada indicador e por cada tipo de embalagem. A fase lag foi, em média, de 4 dias no coelho a granel e no coelho embalado e de 8 dias no coelho embalado sob atmosfera modificada. As taxas e os incrementos de crescimento apresentaram uma relativa homogeneidade, tendo os valores mais divergentes correspondido aos psicrotróficos aeróbios no coelho a granel, que apresentaram taxas próximas do dobro das outras formas de embalagem.

Para determinar a *shelf-life* dos três tipos de embalagem utilizou-se como valor admissível um limite de 6 log UFC/g, que foi o valor que nos pareceu como mais correcto devido às alterações que ocorreram nas carcaças. Tal como era esperado, verificou-se que uma elevada contaminação inicial das carcaças de coelho reduz muito a *shelf-life* do produto. Se a contaminação inicial for 4 log UFC/g a *shelf-life* para o coelho a granel, coelho embalado e coelho embalado sob atmosfera modificada será de, respectivamente, 9, 11 e 17 dias. Mas se o valor da contaminação inicial for 5 log UFC/g a *shelf-life* passará para 6, 7 e 12, para o coelho a granel, coelho embalado e coelho embalado sob atmosfera modificada, respectivamente. Os indicadores limitantes foram, para o coelho a granel, psicrotróficos aeróbios, para o coelho embalado, as *Pseudomonas*, e para o coelho embalado sob atmosfera modificada, as bactérias lácticas.

Com a realização deste trabalho foi possível verificar que o efeito do embalagem sob atmosfera modificada que permitiu prolongar a *shelf-life* se deveu ao aumento da fase lag de alguns microrganismos de deterioração, estando este dado de acordo com dados descritos na bibliografia consultada em Day (2000) e Walsh (2000).

Atendendo aos resultados obtidos, e por análises efectuadas ao produto no final do prazo de validade por uma empresa independente, verificou-se que é necessário que a empresa reduza os prazos de validade praticados, ou, querendo manter estes valores tem de garantir matéria-prima menos contaminada e procedimentos internos mais rigorosos, de forma a que as contaminações iniciais não ultrapassem 4 log UFC/g.

Na determinação de pH realizada ao longo do tempo foi possível verificar que este apresentava poucas variações ao longo do tempo, entre $6,01 \pm 0,06$ e $6,36 \pm 0,20$, o qual se aproxima do valor de pH determinado por Rodríguez-Calleja *et al.* (2005) ($6,26 \pm 0,20$) mas superior ao valor de pH determinado por Rodríguez-Calleja *et al.* (2004) (5,98) e por Vergara *et al.* (2005) ($5,76 \pm 0,01$).

No *challenge test* verificou-se que dos microrganismos inoculados na carne de coelho fresco, *E. coli*, *Salmonella*, *St. aureus* e *Listeria innocua*, a única espécie com capacidade para crescer em carne de coelho refrigerada foi esta última. Assim, é de supor que o patogénico mais problemático para este tipo de produtos pertença ao género *Listeria*. Estes resultados também evidenciam a necessidade de evitar abusos de temperatura na cadeia de frio, que permitiriam o crescimento das outras espécies de microrganismos patogénicos.

5.1. Trabalhos futuros

Em termos industriais este trabalho permitiu perceber quais as melhorias a propor a nível prático. O centro de abate de coelhos deverá seleccionar fornecedores de coelho vivo de melhor qualidade higio-sanitária de forma a baixar as contaminações iniciais das carcaças de coelho fresco. Após a recepção da matéria-prima será preciso rever com mais rigor o processamento dos coelhos, de forma a minimizar os aumentos das cargas microbianas antes da refrigeração, bem como assegurar a cadeia de frio até à entrega do produto no cliente.

Na empresa pode ainda ser testado a aplicação de um duche com ozono ou hipoclorito de sódio, na pele dos coelhos de forma a reduzir a flora microbiana aí presente e que posteriormente irá contaminar a carcaça devido manuseamento que ocorre no centro de abate.

De forma a controlar o desenvolvimento microbiano poder-se-iam desenvolver estudos em métodos alternativos, de entre eles, estudar o efeito da irradiação em carne de coelho refrigerada e também a aplicação de ácidos fracos no momento da lavagem das carcaças, nomeadamente ácido acético ou ácido láctico, pois seriam boas alternativas para controlar o desenvolvimento microbiano, contudo estes dois métodos ainda não podem ser aplicados em Portugal devido às regulamentações europeias. Assim, e com base nos métodos que existem que podem ser aplicados em carne fresca seria interessante estudar, para as condições de fabrico testadas, outras concentrações gasosas, nomeadamente com misturas gasosas mais ricas em CO₂, uma vez que estas permitem obter *shelf-life* mais longos na carne de coelho refrigerada, tal como foi descrito por Berruga *et al.* (2005).

Numa perspectiva de aplicação de métodos rápidos de controlo analítico, seria interessante estudar a aplicação de métodos rápidos que permitissem decidir sobre o destino a dar às carcaças em função das cargas iniciais de microrganismos.

Para além dos critérios microbiológicos existem outros factores que determinam a *shelf-life* dos produtos, como as alterações físico-químicas que ocorrem durante o tempo de armazenagem do produto. De forma a garantir um produto seguro e com qualidade alimentar, seria bastante proveitoso efectuar análises sensoriais de uma forma sistemática, para que se pudessem relacionar com as alterações causadas pelos microrganismos e pelos agentes físico-químicos e definir mais rigorosamente os prazos de validade dos produtos.

6. Bibliografia

- Adams, M.R., Moss, M.O. 2000. Food Microbiology. 2.^a edição. Royal Society of Chemistry. Cambridge. UK.
- Anónimo. 2007. Estatísticas Agrícolas de 2007. Instituto Nacional de estatística. Publicado em 2008.
- Badr. H.M. 2004. Use of irradiation to control foodborne pathogens and extend the refrigerated market life of rabbit meat. *Meat Science*. 67: 541 – 548.
- Baylis, C.L. 2006. Enterobacteriaceae *In Food spoilage microorganisms*. Blackburn, W. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 624 – 667.
- Becker, T. 2000. Defining meat quality *In Meat processing – improving quality*. Kerry, J., Kerry, J. e Ledward, D. (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 3 – 24.
- Berruga, M.I., Vergara, H. e Linares, M.B. 2005. Control of microbial growth and rancidity in rabbit carcasses by modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 1987 – 1991.
- Betts, G. 2006. Determining the stability and *shelf-life* of foods *In Food spoilage microorganisms*. Blackburn, W. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 119 – 146.
- Betts, G. e Everis, L. 2000. Shelf-life determination and challenge testing *In Chilled foods – a comprehensive guide*. 2.^a Edição. Stringer, M. e Dennis, C. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 259 – 283.
- Blackburn, C.W. 2000. Modelling shelf-life *In The stability and shelf-life of food*. Kilcast, D. e Subramaniam, P (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 55 – 75.
- Bobbitt, J. 2003. Buffalo, Camel, Crocodile, Emu, Kangaroo, Ostrich and Rabbit meat – New value added products. Rural Industries Research and Development Corporation. Publicação n.º 03/ 036.
- Bosco, A. Dal, Castellini, C. e Mugnai, C. 2002. Rearing rabbits on a wire net floor or straw litter: behaviour, growth and meat qualitative traits. *Livestock Production Science*. 75: 149 – 156.
- Cano-Muñoz, G. 1991. Cold preservation of meat products *In Manual of meat cold store operation and management*. FAO Animal production and health. Paper 92. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Pp. 5 – 10.

- Cavani, C., Petracci, M. 2004. *In: Proc. 8th World Rabbit Congress. September. Puebla – Mexico. 1318 – 1336.*
- Corry, J.E.L. 2007. Spoilage organisms of red meat and poultry *In Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs.* Mead, G.C. (Eds.). Woodhead publishing in food science, technology and nutrition, Cambridge, Inglaterra. Pp. 101 – 122.
- Day, B.P.F. 2000. Chilled food packaging *In Chilled foods – a comprehensive guide. 2.^a Edição.* Stringer, M. e Dennis, C. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 135 – 152.
- Dennis, C. e Stringer, M. 2000. The chilled foods market *In Chilled foods – a comprehensive guide. 2.^a Edição.* Stringer, M. e Dennis, C. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 1 – 16.
- Dillon, U.M. 1998. Yeasts and moulds associated with meat and meat products *In The microbiology of meat and poultry.* Davies, A. e Board, R. (eds). Blackie Academic & Professional, London, UK. Pp. 85 – 117.
- Donnelly, C.W. 2001. *Listeria monocytogenes In Foodborne Disease Handbook. Volume 1: Bacterial Pathogens.* Hui, Y.H., Pierson, M.D. e Gorham, J.R. (Eds.). 2.^a Edição. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 213 – 245.
- Eady, S.J., Garreau, H., Gilmour, A.R. 2007. Heritability of resistance to bacterial infection in meat rabbits. *Livestock Science.* 112: 90 – 98.
- Farber, J.N., Harris, L.J., Parish, M.E., Beuchat, L.R., Suslow, T.V., Gorney, J.R., Garret, E.H., Busta, F.F. 2003. Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* Vol. 2. Pp. 142-160.
- FAO/ WHO. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. Microbial risk assessment series 5. Geneva, World Health Organization. Pp. 1 – 6.
- Fleet, G. 1992. Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology.* 12: 1 – 44.
- Fraqueza, M.J., Ferreira, M.C. e Barreto, A.S. 2006. *Listeria monocytogenes* in turkey meat under modified atmosphere packaging with gas mixtures of argon or carbon monoxide. *Revista Portuguesa de Zootecnia.* Ano XIII – N.º 1. Pp. 19 – 35.
- García-López, M.L., Prieto, M. e Otero, A. 1998. The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products *In The*

- microbiology of meat and poultry*. Davies, A. e Board, R. (eds). Blackie Academic & Professional, London, UK. Pp. 1 – 34.
- Gill, C.O. 1998. Microbiological contamination on meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs *In The microbiology of meat and poultry*. Davies, A. e Board, R. (eds). Blackie Academic & Professional, London, UK. Pp. 118 – 157.
- Harrigan, W.F. 1998. A scheme for identification of Gram-negative bacteria *In Laboratory methods in food microbiology*. 3.^a Edição. Academic Press, California, USA. Pp. 317 – 332.
- Hernandéz, P., Pla, Ma., Oliver, M.A. e Blasco, A. 2000. Relationships between meat quality measurements in rabbit fed with three diets of different fat type and content. *Meat Science*. 55: 379 – 384.
- Hernández, P., Ariño, B., Grimal, A., Blasco, A. 2006. Comparison of carcass and meat characteristics of three rabbit lines selected for litter size or growth rate. *Meat Science*. 73: 645 – 650.
- Hintlian, C.B. e Hotchkiss, J.H. (2007). Microbiological and sensory evaluation of cooked roast beef packaged in a modified atmosphere. *Journal of Food Processing and Preservation*. 11: 171 – 179.
- Holzapel, W.H. 1998. The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products *In The microbiology of meat and poultry*. Davies, A. e Board, R. (eds). Blackie Academic & Professional, London, UK. Pp. 35 – 84.
- 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.
- ISO 13408 (E). 1998. Microbiology of food and animal feedings stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 °C.
- ISO 13720 (E). 1995. Meat and meat products – Enumeration of *Pseudomonas* spp.
- ISO 21528-2. 2002. Microbiology of food and feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Colony-count method.
- James, S.J. 2000. Raw material selection: Meat and poultry *In Chilled foods – a comprehensive guide*. 2.^a Edição. Stringer, M. e Dennis, C. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 63 – 78.

- James, S.J. e James, C. 2002. Microbiology of refrigerated meat *In Meat refrigeration – improving quality*. Kerry, J., Kerry, J. e Ledward, D. (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 3 – 20.
- Jenkins, W.A. e Harrington, J.P. 1991. Packaging Foods with Plastics. Technomic Publishing Company, Lancaster.
- Kilcast, D. e Subramaniam, P. 2000. Introduction *In The stability and shelf-life of food*. Kilcast, D. e Subramaniam, P (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 1 – 22.
- Kurtzman, C.P. 2006. Detection, identification and enumeration methods for spoilage yeasts *In Food spoilage microorganisms*. Blackburn, W. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 28 – 54.
- Ledward, D. 2000. Introduction *In Meat processing – improving quality*. Kerry, J., Kerry, J. e Ledward, D. (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 1 – 2.
- Liao, C.H. 2006. *Pseudomonas* and related genera *In Food spoilage microorganisms*. Blackburn, W. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 507 – 540.
- Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira, M. 2003. Yeasts in spoilage *In Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2.^a ed. Pp. 5530 – 5536.
- Loureiro, V. e Querol, A. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Food Science and Technology*. 10: 356 – 365.
- Man, C.M.D. 2000. Determining shelf-life *In Food labelling*. Blanchfield, J.R. (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 237 – 253.
- Man, C.M.D. 2004. Shelf-life testing *In Understanding and Measuring the shelf-Life of food*. Steele, R. (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 340 – 354.
- McClure, S.J. 2000. Microbiological hazard identification in the meat industry *In Meat processing – improving quality*. Kerry, J., Kerry, J. e Ledward, D. (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 217 – 236.
- Miller, R. K. 2000. Factors affecting the quality of raw meat *In Meat processing – improving quality*. Kerry, J., Kerry, J. e Ledward, D. (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 27 – 63.
- Mizrahi, S. 2000. Accelerated shelf-life testing *In The stability and shelf-life of food*. Kilcast, D. e Subramaniam, P (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 107 – 125.

- Morisse, J.P., Boilletot, E., Martrenchar, A. 1999. Preference testing in intensively kept meat production rabbits for straw on wire grid floor. *Applied Animal Behaviour Science*. 64: 71 – 80.
- Moss, M.O. 2006. General characteristics of moulds *In Food spoilage microorganisms*. Blackburn, W. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 401 – 414.
- Nissen, H. Alvseike O., Bredholt, S. Holck, A. e Nesbakkent, T. (2000). Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* sPp... In ground beef packed by three commercially used packaging. *International Journal of Food Microbiology*. 59: 211 – 220.
- Norma Portuguesa 3277-1. 1987. Microbiologia Alimentar – Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25 °C.
- Notermans, S. e int't Veld, P. 1994. Microbiological challenge testing for ensuring safety of foods products *In International Journal of Food Microbiology*. 24: 33 – 39.
- Nychas, G.-J.E., Drosinos, E.H. e Board, R.G. 1998. Chemical changes in stored meat *In The microbiology of meat and poultry*. Davies, A. e Board, R. (eds). Blackie Academic & Professional, London, UK. Pp. 288 – 326.
- Patsias, A., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. 2006. *Shelf-life* of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology*. 23: 423 – 429.
- Phillips, C.A. 1996. Review – Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science*. 31: 463 – 479.
- Ramírez, J.A., Oliver, M.A., Pla, M., Guerrero, L., Ariño, B., Blasco, A., Pascual, M. e Gil, M. 2004. Effect of selection for growth rate on biochemical, quality and texture characteristics on meat from rabbits. *Meat Science*. 67: 617 – 624.
- Regulamento (CE) n.º 1441/ 2007 da Comissão de 05 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/ 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.
- Rodríguez-Calleja, J.M., Santos, J.A., Otero A. and García-López, M.L. 2004. Microbiological Quality of rabbit meat. *Journal of food protection*. 67: 966 – 971.
- Rodríguez-Calleja, J.M., García-López, M.L., Santos, J.A., Otero, A. 2005. Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat. *Meat Science*. 70: 389 – 394.

- Rodríguez-Calleja, J.M., García-López, I., García-López, M.L., Santos, J.A. e Otero, A. 2006. Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 69: 1106 – 1112.
- Schilling, V. e Holzapel, W.H.. 2006. Lactic acid bacteria *In Food spoilage microorganisms*. Blackburn, W. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 541 – 578.
- Simonsen, B., Hamm, R. e Rogowski. 1988. Meat as food *In World Animal Science*. Neimann-Sorensen, A., Tribe, D.E. (Ed.). Elsevier, Copenhaga – Dinamarca. Pp.115 – 139
- Sprenger, R.A. 2007. Hygiene for management – A text for food safety courses. 13.^a Edição. Highfield.co.UK.limited. Pp. 154.
- Stanbridge, L.H. e Davies, A.R. 1998. The microbiology of chill-stored meat *In The microbiology of meat and poultry*. Davies, A. e Board, R. (eds). Blackie Academic & Professional, London, UK. Pp. 174 – 219.
- Vásquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Charaborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. e Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*.14: 584 – 640.
- Vergara, H., Berruga, M. e Belén Linares, M. 2005. Effect of gas composition on rabbit meat quality in modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 1981 – 1986.
- Walker, S.J. e Betts, G. 2000. Chilled foods microbiology *In Chilled foods – a comprehensive guide*. 2.^a Edição. Stringer, M. e Dennis, C. (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 153 – 186.
- Walsh, H.M. 2000. Meat packaging *In Meat processing – improving quality*. Kerry, J., Kerry, J. e Ledward, D. (eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. Pp. 417 – 451.
- Wiley, J. and sons. 1999. Meat modified atmosphere packaging *In Wiley encyclopedia of food science and technology*. Francis, F.J. (Eds). Publisher John Wiley and sons. Pp. 1561 – 1566.
- Zotte, A. Dalle. 2002. Perception of rabbit meat and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livestock Production Science*. 75: 11 – 32.

Zotte, A. Dalle, Rémignon, H. E Ouhayoun, J. 2005. Effect of feed during post-weaning growth on meat quality, muscle energy metabolism and fibre properties of *Biceps femoris* muscle in the rabbit. *Meat Science*. 70: 301 – 306.

7. Cibergrafia

John L's Bacteriology Pages, <http://www.jlindquist.net/generalmicro/102bactid.html>, consultada In 04/03/ 2009

ANEXOS

Anexo I – Características técnicas dos filmes utilizados nos ensaios – Toplex HB 35 e Toplex HB 45

Propriedades	Unidades	ASTM	Valores	
			Toplex HB 35	Toplex HB 45
Espessura	μ		35	45
Rendimento (yield)	m ² / kg		25,5	20,5
Força de tensão	MD	D-882	75	60
	TD		75	60
Carga de tensão	MD		65	67,5
	TD		65	67,5
Elongação	MD	D-882	79	100
	TD		70	90
Impacto F 50	g	D-1709	400	400
Energia de perfuração	N/ mm	Método Plastopil	180	140
Haze (névoa)	%	D-1003	7	6
Clarity	%	D-1746	90	95
C.O.F.	In-in	D-1894	> 1	> 1
Estático-Dinâmico	Out-out			
Taxa de transmissão de oxigénio, 23 °C, ambiente seco	cm ³ / m ² / dia	D-3985	4,5	3
Taxa de transmissão de vapor de água, 38 °C, 90% HR	g/ m ² / dia	E-96	12	12

Anexo II – Evolução das contagens microbiológicas para a carne de coelho fresco a granel, durante 8 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio ± desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado).

Dia	Parâmetro Microbiológico																	
	Mesófilos aeróbios			Psicrotíficos aeróbios			Bactérias lácticas			Bolos e Leveduras			Enterobacteriaceae			Pseudomonas		
	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior
0	3,05	3,72±0,67 (3)	4,54	2,96	3,98±1,10 (3)	5,23	2,60	2,79±0,16 (3)	3,01	1,00	1,68±0,23 (3)	1,86	2,00	2,60±0,63 (2)	3,04	1,48	2,72±0,72 (3)	3,46
3	2,86	3,98±0,91 (3)	4,72	2,18	3,53±0,86 (3)	4,34	2,08	2,89±0,65 (3)	3,49	1,70	1,83±0,19 (3)	2,26		< 10(g (3)		1,60	2,83±0,92 (3)	3,90
4	3,51	4,17±0,78 (3)	5,10	2,51	3,57±0,83 (3)	4,41	2,41	2,91±0,71 (3)	3,77	2,43	3,23±0,33 (3)	3,26		< 10(g (3)		3,30	4,35±1,01 (3)	5,47
5	3,26	3,76±0,60 (3)	5,11	3,16	4,16±0,87 (3)	4,92	2,49	3,69±1,03 (3)	4,41	2,61	3,28±0,61 (3)	4,92		< 10(g (3)		3,91	4,52±0,46 (3)	5,08
6	3,88	3,82±0,25 (3)	5,43	4,14	4,61±0,69 (3)	5,42	2,92	3,18±0,22 (3)	3,40	3,00	3,11±0,20 (3)	3,36	1,00	1,29±0,08 (2)	1,70	4,24	4,38±0,10 (3)	4,48
7	3,62	4,76±1,28 (3)	6,27	3,00	4,40±1,50 (3)	6,03	2,38	3,11±0,31 (3)	3,58	2,90	3,48±0,40 (3)	4,02	1,00	1,15±0,21 (1)	1,30	4,17	4,33±0,08 (2)	4,47
8	3,33	4,07±0,86 (3)	5,14	5,09	5,25±0,11 (3)	5,40	2,52	3,16±0,65 (3)	3,85	3,48	3,90±0,18 (3)	4,07		1,00±0,00 (1)		3,43	3,94±0,72 (2)	4,45

Anexo III – Evolução das contagens microbiológicas para a carne de coelho fresco embalado, durante 16 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio \pm desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado).

Dia	Parâmetro Microbiológico																	
	Mesófilos aeróbios			Psicrotóficos aeróbios			Bactérias lácticas			Bolores e Leveduras			Enterobacteriaceae			Pseudomonas		
	Limite inferior	Média \pm DP	Limite superior	Limite inferior	Média \pm DP	Limite superior	Limite inferior	Média \pm DP	Limite superior	Limite inferior	Média \pm DP	Limite superior	Limite inferior	Média \pm DP	Limite superior	Limite inferior	Média \pm DP	Limite superior
0	2,86	3,34 \pm 0,48 (3)	3,88	2,40	2,89 \pm 0,42 (3)	3,34	2,18	2,92 \pm 0,75 (3)	3,72	1,00	1,31 \pm 0,23 (2)	1,48	2,53	2,90 \pm 0,52 (2)	3,27	1,00	1,83 \pm 0,99 (3)	2,95
4	2,60	2,90 \pm 0,23 (3)	3,26	2,72	2,92 \pm 0,24 (3)	3,28	1,78	2,18 \pm 0,27 (3)	2,45		< 10/g (3)			< 10/g (3)		1,00	1,78 \pm 0,96 (3)	3,40
8	3,29	3,97 \pm 0,72 (3)	4,85	3,12	3,55 \pm 0,52 (3)	4,34	2,20	2,76 \pm 0,43 (3)	3,16	1,48	2,45 \pm 0,84 (3)	3,37		1,00 \pm 0,00 (1)		1,85	3,18 \pm 1,63 (3)	4,43
12	4,08	4,78 \pm 0,53 (3)	5,45	4,59	5,08 \pm 0,63 (3)	5,88	3,06	3,84 \pm 0,69 (3)	4,45	2,75	3,32 \pm 0,56 (3)	4,04		< 10/g (3)		5,51	4,61 \pm 0,75 (3)	5,38
14	4,75	5,05 \pm 0,21 (2)	5,26	5,67	5,83 \pm 0,10 (2)	5,94	4,12	4,42 \pm 0,42 (3)	4,92	3,29	3,45 \pm 0,02 (3)	3,62		< 10/g (3)		4,26	4,57 \pm 0,38 (3)	5,08
15	3,90	5,35 \pm 1,57 (2)	6,47	4,65	4,92 \pm 0,38 (1)	5,19	4,19	4,48 \pm 0,28 (3)	4,81	3,58	4,26 \pm 0,85 (3)	5,30	1,78	2,05 \pm 0,38 (1)	2,32	4,18	4,95 \pm 0,82 (2)	5,54
16	5,08	5,32 \pm 0,02 (2)	5,53	4,94	5,09 \pm 0,20 (2)	5,26	4,32	4,89 \pm 0,46 (3)	5,26	2,76	4,22 \pm 1,18 (3)	5,38		< 10/g (3)		3,66	4,78 \pm 1,41 (2)	6,07

Anexo IV – Evolução das contagens microbiológicas para a carne de coelho fresco embalado em atmosfera modificada, com o filme de alta barreira com 35 µm de espessura, durante 21 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio ± desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado).

Dia	Parâmetro Microbiológico																	
	Mesófilos aeróbios			Psicrotróficos aeróbios			Bactérias lácticas			Bolores e Leveduras			Enterobacteriaceae			Pseudomonas		
	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior
0	2,76	3,35±0,62 (3)	4,98	2,04	2,72±0,61 (3)	3,28	2,08	2,86±0,81 (3)	3,76	1,00	1,15±0,21 (2)	1,30	2,08	2,39±0,27 (2)	2,57	1,00	1,30±0,43 (2)	1,60
4	3,25	3,70±0,40 (3)	4,26	2,34	3,17±0,56 (3)	3,85	2,15	2,79±0,62 (3)	3,43	1,00	1,56±0,97 (3)	3,18		< 10/g (3)		1,00	1,79±0,74 (3)	2,48
8	3,47	4,22±0,94 (2)	4,97	2,40	3,36±0,48 (3)	3,90	2,18	2,79±0,58 (3)	3,40	1,60	2,25±0,84 (3)	3,26		< 10/g (3)		1,00	1,78±1,78 (2)	2,48
12	3,89	4,85±1,01 (3)	5,98	3,64	4,13±0,61 (2)	4,59	3,49	3,96±0,39 (3)	4,88	1,48	3,24±1,60 (3)	4,60		< 10/g (3)		1,30	3,11±2,56 (2)	4,99
16	4,64	5,53±1,26 (2)	6,44	4,87	5,64±1,03 (2)	6,37	3,95	5,15±1,13 (3)	6,26	2,08	3,52±1,24 (2)	4,41	1,30	2,31±0,94 (2)	3,16	4,08	5,56±1,22 (3)	6,46
18	4,64	4,84±0,03 (2)	5,07	4,26	4,52±0,38 (1)	4,79	4,70	5,06±0,53 (3)	5,69	2,04	3,03±1,40 (3)	4,66		1,00±0,00 (3)		2,78	4,31±1,81 (3)	6,41
19	5,14	5,69±0,60 (2)	6,12	5,26	5,72±0,65 (1)	6,18	5,14	5,42±0,24 (3)	5,72	2,99	3,57±0,56 (3)	4,40	1,00	1,73±1,02 (3)	3,04	4,18	4,26±0,07 (2)	4,45
20		—			—		5,84	5,90±0,11 (2)	6,00	4,65	4,97±0,33 (2)	5,18	1,00	1,15±0,21 (1)	1,30	6,39	6,42±0,04 (1)	6,44
21	4,34	4,37±0,04 (1)	4,40	6,20	6,28±0,11 (1)	6,36	4,79	5,84±0,86 (3)	6,44	3,72	4,37±0,93 (3)	5,59	1,00	1,30±0,43 (2)	1,60	3,08	4,81±2,36 (2)	6,48

Anexo V – Evolução das contagens microbiológica para a carne de coelho fresco embalado em atmosfera modificada, com o filme de alta barreira com 35 µm de espessura durante 21 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio ± desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado).

Dia	Parâmetro Microbiológico																	
	Mesófilos aeróbios			Psicrotroficos aeróbios			Bactérias lácticas			Bolores e Leveduras			Enterobacteriaceae			Pseudomonas		
	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior
0	3,08	3,77±0,95 (3)	5,03	3,30	4,33±0,86 (3)	5,34	2,52	2,88±0,28 (3)	3,11	1,95	2,94±0,90 (3)	3,95		< 10/g (3)	2,90	3,19±0,22 (3)	3,47	
4	3,76	4,36±0,53 (3)	5,20	3,84	4,55±0,66 (3)	5,45	2,88	3,33±0,56 (3)	3,98	2,64	3,17±0,74 (3)	4,06	0,30	0,67±0,52 (2)	3,52	3,95±0,58 (3)	4,66	
8	3,75	4,20±0,48 (3)	4,76	3,53	4,26±0,67 (3)	5,07	3,49	3,73±0,19 (3)	3,93	1,90	2,78±0,78 (3)	3,64		1,00±0,00 (2)	3,51	4,16±0,73 (3)	5,02	
12	3,58	4,13±0,44 (3)	4,69	3,85	4,30±0,40 (3)	4,89	3,30	3,80±0,46 (3)	4,34	2,00	2,29±0,23 (3)	2,56		< 10/g (3)	2,60	3,35±0,60 (3)	4,00	
16	4,62	5,44±0,86 (3)	6,46	4,92	5,54±0,66 (3)	6,35	4,49	5,36±1,19 (2)	6,21	2,76	3,46±1,05 (3)	4,76	2,34	2,40±0,08 (1)	3,69	4,22±0,67 (3)	4,99	
18	5,12	6,23±1,51 (2)	7,38	5,16	5,20±0,05 (1)	5,24	4,85	6,14±1,10 (3)	6,86	2,32	2,51±0,27 (1)	2,71	2,28	2,37±0,11 (2)	5,12	5,16±0,05 (1)	5,19	
19	5,87	6,29±0,56 (3)	6,99	6,02	6,40±0,58 (3)	7,13	5,59	6,00±0,65 (3)	6,77	2,76	3,17±0,74 (3)	4,13	2,11	2,18±0,10 (1)		—		
20	5,99	6,49±0,40 (3)	6,79	6,70	6,75±0,17 (3)	7,10	4,81	5,99±0,98 (3)	6,69	2,65	3,22±0,63 (2)	3,87	1,00	1,42±0,60 (2)	4,15	4,58±0,41 (3)	5,15	
21	7,03	7,17±0,15 (2)	7,34	7,09	7,28±0,09 (2)	7,34	6,82	6,95±0,10 (2)	7,08	3,32	3,72±0,38 (2)	4,05		< 10/g (2)	2,96	3,68±1,00 (2)	4,52	

Anexo VI – Evolução das contagens microbiológica para a carne de coelho fresco embalado em atmosfera modificada, com o filme de alta barreira com 45 µm de espessura durante 21 dias. Os resultados são expressos em log UFC/g, valor médio ± desvio padrão (n.º de amostras consideradas) e os respectivos limites inferior e superior. Cada ponto resulta da média de 6 determinações (três lotes independentes analisados em duplicado).

Dia	Parâmetro Microbiológico																	
	Mesófilos aeróbios			Psicrotrofos aeróbios			Bactérias lácticas			Bolores e Leveduras			Enterobacteriaceae			Pseudomonas		
	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior	Limite inferior	Média ± DP	Limite superior
0	3,23	3,62±0,42 (3)	4,23	3,10	3,32±0,12 (3)	3,45	2,30	2,83±0,45 (3)	3,16	1,30	1,99±0,68 (3)	2,73	1,00	1,57±0,81 (2)	2,15	2,04	2,92±0,86 (3)	3,90
4	3,26	3,56±0,38 (3)	4,03	3,18	3,83±1,06 (3)	5,16	2,67	2,86±0,24 (3)	3,18	1,30	2,03±0,91 (2)	2,72		< 10(g (3)		1,30	2,95±1,43 (3)	4,57
8	3,08	3,47±0,29 (3)	3,81	3,43	3,82±0,40 (3)	4,32	2,48	3,01±0,31 (3)	3,23	1,60	2,10±0,43 (3)	2,40		< 10(g (3)		2,00	3,50±0,74 (3)	4,15
12	4,14	4,26±0,11 (3)	4,41	4,36	4,50±0,11 (3)	4,64	3,72	3,85±0,19 (3)	3,96	1,78	2,33±0,43 (3)	2,63	1,00	1,25±0,35 (2)	1,70	2,78	3,37±0,30 (3)	3,64
16	3,93	4,98±1,00 (3)	6,00	4,25	4,99±1,10 (3)	6,35	3,97	4,82±0,10 (3)	6,03	1,30	2,46±1,27 (3)	3,86	2,77	2,79±0,03 (1)	2,81	3,02	3,35±0,26 (3)	3,54
18	4,81	5,23±0,47 (3)	5,83	4,89	5,28±0,46 (3)	5,83	4,61	5,02±0,48 (3)	5,58	2,30	2,31±0,05 (3)	2,45	1,30	1,39±0,12 (1)	1,48	3,14	3,50±0,35 (3)	3,94
19	4,72	5,75±1,06 (3)	6,85	4,74	5,75±0,95 (3)	6,82	4,57	5,53±1,09 (3)	6,77	2,36	3,39±0,89 (3)	4,72	1,00	1,68±0,67 (3)	2,36	3,26	4,21±1,01 (3)	5,32
20	5,99	6,08±0,05 (3)	6,15	6,09	6,28±0,17 (3)	6,47	5,48	5,86±0,18 (3)	6,06	1,85	2,92±0,83 (3)	3,52	1,00	1,49±0,35 (2)	1,48	3,32	3,86±0,52 (3)	4,48
21	5,71	5,88±0,19 (2)	6,06	5,83	6,05±0,19 (2)	6,27	5,76	6,21±0,62 (3)	6,93	2,53	3,14±0,73 (3)	4,07	1,00	1,20±0,35 (3)	1,60	3,75	4,12±0,41 (2)	4,43

Anexo VII – Identificação de bactérias pelas suas características morfológicas e reacções físico-químicas.

Reacção Gram (cultura jovem)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Forma	Cocos (clusters)	Cocos (clusters)	Cocos (cadeia)	Cocos (tetraedro)	Bastonete	Bastonete	Bastonete irregular	Bastonete	Bastonete	Bastonete	Bastonete	Bastonete	Bastonete	Bastonete	Bastonete	Bastonete	Cocos (pares)
Crescimento aeróbio	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento anaeróbio	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Endósporos	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Mobilidade	-	-	-	-	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+	-
Reacção da catalase	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reacção benzidina	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reacção oxidase	+	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	-	-	-	+	+
Fermentação da glucose (ácido ou ácido+gás)	-	+	+	+	+	-	-	+/-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Meio glucose O/F												-	O	F	F	F	O
<i>Micrococcus</i>	X																
<i>Staphylococcus</i>		X															
<i>Streptococcus</i>			X														
<i>Lactococcus</i>			X														
<i>Enterococcus</i>			X														
<i>Leuconostoc</i>			X														
<i>Pediococcus</i>			x	X													
<i>Aerococcus</i>				X													
<i>Lactobacillus</i>					X												
<i>Kurthia</i>						X											
<i>Arthrobacter</i>							X										
<i>Clostridium</i>								X									
<i>Bacillus</i>									X	X							
<i>Alcaligenes</i>											X						
<i>Pseudomonas</i>												X					
<i>Klebsiella</i>													X				
<i>Shigella</i>													X				
<i>Salmonella</i>														X			
<i>Escherichia</i>														X			
Outros géneros entéricos														X			
<i>Aeromonas</i>																X	
<i>Chromobacterium</i>																X	
<i>Neisseria</i>																	x