



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa**

ESTUDO DA MICROBIOTA DE UM PRODUTO CÁRNEO COZIDO

**Aplicação de Duas Tecnologias de Embalagem: Vácuo e Atmosfera
Modificada**

Marta Sofia Ferreira Bentes da Encarnação Guerreiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Teresa de Jesus da Silva Matos

Co-orientador: Doutora Lídia Adelina Pó Catalão Dionísio

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

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

Lisboa, 2011

*Estudo da Microbiota de um Produto Carne Cozido.
Aplicação de Duas Tecnologias de Embalagem: Vácuo e Atmosfera Modificada*

Ao meus pais, irmãos
e Simão
pelo amor, amizade,
dedicação, disponibilidade
e inspiração

Agradecimentos

Gostaria de manifestar a minha mais profunda gratidão às pessoas que, de uma forma directa ou indirecta, ajudaram à realização deste trabalho.

À Professora Doutora Teresa Matos, orientadora interna da dissertação de Mestrado, pelo voto de confiança ao convidar-me para realizar este trabalho.

À Professora Doutora Lídia Adelina Pó Catalão Dionísio, orientadora externa da dissertação de Mestrado, que esteve sempre disponível, transmitindo os seus conhecimentos e experiência. Os meus sinceros agradecimentos por me ter ajudado sempre e me ter ensinado muito ao longo do estágio. A minha profunda gratidão.

Ao Professor Jorge Pereira, pelo apoio, atenção, disponibilidade, ajuda e simpatia.

À Sra. Dona Lisete, pela simpatia, ensinamento e experiência na fase inicial.

À Doutora Maria José Vito, por me ter transmitido os seus conhecimentos, por me ter apoiado desde o início e pela sua disponibilidade. Sem a sua ajuda e amizade tinha sido mais complicado. Foi uma pessoa essencial para a concretização deste trabalho. O meu muito obrigada.

À Marta e ao Bruno, pela sua ajuda e simpatia.

À Carolina Bruno de Souza, que foi uma surpresa boa e que adorei conhecê-la. Além do que me ajudou bastante nos momentos menos fáceis, que nunca me irei esquecer. O meu sincero agradecimento.

Ao Doutor Paulo Pedro, pela sua atenção, disponibilidade e simpatia.

Aos meus pais e irmãos pela sua amizade, companheirismo, apoio e confiança depositada em mim. Sem eles não seria possível realizar este trabalho.

Ao Simão, pelo seu amor, amizade, companheirismo, força e apoio. Sem ele seria tudo mais difícil.

Aos meus colegas e amigos, mas em especial à Fátima, Sofia, Carolina, Filipa e Joana, pela sua presença e apoio nos momentos bons e menos bons.

A minha profunda e sincera gratidão a todos.

Resumo

A morcela de arroz é obtida através de diversos processos de fabrico e submetida a manipulações, sendo assim susceptível de contaminação microbiana.

As análises microbiológicas realizadas no presente trabalho visaram contribuir para o estudo da microbiota ao longo do prazo de validade (44 dias) da morcela de arroz. Foi transversalmente estudada a influência na conservação do produto de diferentes tecnologias de embalagem: atmosfera modificada (80%CO₂/20%N₂) e vácuo, e sem tecnologia de embalagem específica.

Os parâmetros microbiológicos determinados foram: microrganismos totais a 30°C, psicrotróficos, bactérias ácido-lácticas, bolores e leveduras, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Enterobacteriaceae*. Em cada um dos dois lotes estudados prepararam-se três amostras de cada atmosfera. A amostragem decorreu nos dias 1,8,15,22,30 e 44 de armazenamento do lote.

Nas enterobactérias obtiveram-se valores superiores ao limite máximo estabelecido para produtos cárneos tratados termicamente (10² ufc/g). Os microrganismos totais foram isolados em maiores concentrações (10⁷ ufc/g).

Os resultados obtidos não permitiram sugerir qual o tipo de embalagem que melhor contribuiu para a conservação da morcela de arroz em termos de qualidade microbiológica, visto que não existiu uma atmosfera em que todos os microrganismos estudados cresceram menos.

Palavras-chave: morcela de arroz, atmosferas de conservação, bactérias, bolores e leveduras, indicadores de higiene.

Abstract

The rice blood sausage is obtained through various manufacturing processes and subject to manipulation and is therefore liable to microbial contamination.

Microbiological tests performed in this study aimed to contribute to the study of the microbiota along the expiry date (44 days) of rice blood sausage. It was studied the influence across the conservation of the product in different packaging technologies: modified atmosphere (80% CO₂/20% N₂) and vacuum, and without specific packaging technology.

The microbiological parameters determined were: total microorganisms at 30°C, psychrotrophic, lactic acid bacteria, molds and yeasts, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* and *Enterobacteriaceae*. In each of the two studied batches were prepared three samples of each atmosphere. Sampling took place on days 1, 8, 15, 22, 30 and 44 of the storage lot.

In enterobacteria the values obtained were above the ceiling for heat-treated meat products (10² cfu/g). The total microorganisms were isolated in higher concentrations (10⁷cfu/g).

The results failed to suggest what the best atmosphere that contributes to the quality and safety of rice blood sausage, because there was an atmosphere in which all organisms studied grew less.

Keywords: Rice blood sausage, atmospheres conservation, bacteria, molds and yeasts, hygiene indicator.

Extended Abstract

The rice blood sausage is obtained through various manufacturing processes and subject to manipulation and is therefore liable to microbial contamination. The rice blood sausage is a cooked meat product which main ingredient is blood. This product has a great economic importance to the small domestic producers and for various industries. The thermal treatment undergone by the product studied was just cooking.

The blood sausage to have a high water activity and neutral pH, facilitate the growth of microorganisms. Therefore, are applied various methods of conservation, such as packaging technology in order to inhibit microbial growth and increase the lifetime of the product.

Microbiological tests performed in this study aimed to contribute to the study of the microbiota along the expiry date (44 days) of rice blood sausage. It was studied the influence across the conservation of the product in different packaging technologies: modified atmosphere (80% CO₂/20% N₂) and vacuum, and without specific packaging technology.

The microbiological parameters determined were: total microorganisms at 30°C, psychrotrophic, lactic acid bacteria, molds and yeasts, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* and *Enterobacteriaceae*. In each of the two studied batches were prepared three samples of each atmosphere. Sampling took place on days 1, 8, 15, 22, 30 and 44 of the storage lot.

The presence of total microorganisms at 30°C and psychrotrophic can affect the sanitary conditions of meat products, as well as molds and yeasts.

Lactic acid bacterias being lactic acid producers allow increasing the shelf life of the product. On the other hand, may alter its organoleptic characteristics.

Clostridium perfringens and *Bacillus cereus* are pathogenic bacteria produce toxins that can cause food poisoning, even if the microorganisms have been eliminated.

Some bacterias from the family *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia coli*, are hygiene indicators, responsible for changes in food products.

In enterobacteria the values obtained were above the ceiling for heat-treated meat products (10² cfu/g). The total microorganisms were isolated in higher concentrations (10⁷cfu/g).

The results failed to suggest what the best atmosphere that contributes to the quality and safety of rice blood sausage, because there was an atmosphere in which all organisms studied grew less.

Índice Geral

1.	Introdução	1
2.	Revisão bibliográfica	4
2.1.	Conservação da carne	4
2.2.	Produtos cárneos	5
2.2.1.	Morcelela de arroz	6
2.3.	Importância dos microrganismos nos alimentos	6
2.3.1.	Microrganismos totais a 30°C	7
2.3.2.	Psicrotróficos.....	7
2.3.3.	Bactérias ácido-lácticas	8
2.3.4.	Bolores e Leveduras	10
2.3.5.	<i>Bacillus cereus</i>	11
2.3.6.	<i>Clostridium perfringens</i>	14
2.3.7.	<i>Enterobacteriaceae</i>	15
2.4.	Factores que influenciam a microbiota em alimentos.....	16
2.4.1.	pH	16
2.4.2.	Actividade da água (aw)	17
2.4.3.	Temperatura.....	18
2.4.4.	Disponibilidade de oxigénio	19
2.4.5.	Matéria – prima e especiarias	20
2.4.6.	Cozedura.....	22
2.4.7.	Embalagens alimentares	23
2.4.7.1.	Embalagem em atmosfera modificada (EAM)	23
2.4.7.2.	Embalagem a vácuo	25
3.	Objectivos.....	26
4.	Material e métodos.....	26
4.1.	Equipamento de Laboratório	26

4.2.	Meios de Cultura	27
4.3.	Reagentes.....	31
4.4.	Análises Microbiológicas	31
4.4.1.	Preparação das amostras	32
4.4.2.	Preparação de diluições	32
4.4.3.	Contagem de microrganismos totais a 30°C e psicrotróficos	32
4.4.4.	Contagem de bactérias ácido-lácticas.....	33
4.4.5.	Contagem de bolores e leveduras.....	33
4.4.6.	Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	34
4.4.7.	Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	34
4.4.8.	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	34
4.4.9.	Quadro-Resumo de técnicas e métodos para a contagem de microrganismos .	35
4.5.	Análises bioquímicas de bactérias	35
4.5.1.	Coloração de Gram.....	35
4.5.2.	Prova da catalase.....	36
4.5.3.	Sistema API 20E.....	36
4.6.	Análise estatística.....	37
5.	Resultados e Discussão	37
5.1.	Parâmetros microbiológicos	37
5.1.1.	Contagem de microrganismos totais a 30°C.....	37
5.1.2.	Contagem de psicrotróficos	40
5.1.3.	Contagem de bactérias ácido-lácticas.....	43
5.1.4.	Contagem de bolores e leveduras.....	46
5.1.5.	Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	48
5.1.6.	Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	49
5.1.7.	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	49
5.2.	Análise comparativa entre os parâmetros microbiológicos e as atmosferas estudadas	

5.2.1.	Produto embalado em atmosfera modificada	52
5.2.2.	Produto embalado a vácuo	54
5.2.3.	Produto a granel.....	56
6.	Conclusões.....	60
7.	Propostas de trabalho futuro.....	61
8.	Bibliografia	62

Índice de Quadros

Quadro 2.1: Classificação de produtos cárneos.....	5
Quadro 2.2: Microrganismos contaminantes de alimentos	6
Quadro 2.3: Condições de crescimento de <i>Bacillus cereus</i> , na forma vegetativa, associadas à carne e produtos cárneos e medidas preventivas	12
Quadro 2.4: Condições de crescimento de <i>Clostridium perfringens</i> associadas à carne e produtos cárneos e medidas preventivas	14
Quadro 2.5: Valores médios ou intervalos de valores de pH de enchidos	17
Quadro 2.6: Valores médios ou intervalos de valores de aw de enchidos	18
Quadro 2.7: Classificação dos microrganismos segundo diferentes temperaturas(°C)	19
Quadro 2.8: Especiarias e ervas com efeito inibitório no crescimento microbiano	22
Quadro 4.1: Quadro-Resumo de técnicas e métodos para isolamento e contagem de microrganismos.....	35
Quadro 5.1: Concentrações máximas e mínimas dos microrganismos totais a 30°C nas diferentes atmosferas estudadas.....	38
Quadro 5.2: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para microrganismos totais (MT) em diferentes tipos de atmosfera	39
Quadro 5.3: Incremento dos microrganismos totais a 30°C nas diferentes atmosferas estudadas.	39
Quadro 5.4: Concentrações máximas e mínimas dos psicotróficos nas diferentes atmosferas estudadas.	42
Quadro 5.5: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) dos psicotróficos (Psic) para os diferentes tipos de atmosfera (lote1 e lote2)	42
Quadro 5.6: Incremento dos psicotróficos nas diferentes atmosferas estudadas.....	43
Quadro 5.7: Concentrações máximas e mínimas das bactérias ácido-lácticas nas diferentes atmosferas estudadas.	45
Quadro 5.8: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) das bactérias ácido-lácticas (BAL) para os diferentes tipos de atmosfera (lote1 e lote2)	45
Quadro 5.9: Incremento das bactérias ácido-lácticas nas diferentes atmosferas estudadas	46
Quadro 5.10: Concentrações máximas e mínimas de <i>Enterobacteriaceae</i> nas diferentes atmosferas estudadas.	50

Quadro 5.11:Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) de <i>Enterobacteriaceae</i> (Ent) para os diferentes tipos de atmosfera (lote1 e lote2)...	50
Quadro 5.12: Incremento de <i>Enterobacteriaceae</i> nas diferentes atmosferas estudadas.....	51
Quadro 5.13:Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote1 no produto embalado em atmosfera modificada(EAM-1)	53
Quadro 5.14:Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote2 no produto embalado em atmosfera modificada(EAM-2)	53
Quadro 5.15:Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote1 no produto a vácuo (EV-1)	55
Quadro 5.16:Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote2 no produto a vácuo (EV-2)	55
Quadro 5.17:Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote1 no produto a granel (G-1)	57
Quadro 5.18:Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote2 no produto a granel (G-2)	57

Índice de Figuras

Figura 4.1:Colónias típicas de microrganismos totais a 30°C	28
Figura 4.2:Colónias típicas de microrganismos psicotróficos	28
Figura 4.3:Colónias típicas de bactérias ácido-lácticas	28
Figura 4.4:Colónias típicas de bolores e leveduras.	29
Figura 4.5:Colónia típica de <i>Bacillus cereus</i>	29
Figura 4.6:Colónias típicas de <i>Clostridium perfringens</i>	30
Figura 4.7:Colónias típicas de <i>Enterobacteriaceae</i>	31
Figura 5.1:Microorganismos totais a 30°C na morcela de arroz em diferentes atmosferas (granel(G), vácuo (EV), atmosfera modificada (EAM)).....	38
Figura 5.2: Microorganismos psicotróficos na morcela de arroz em diferentes atmosferas (granel(G), vácuo (EV), atmosfera modificada (EAM)).....	41
Figura 5.3: Bactérias ácido-lácticas na morcela de arroz em diferentes atmosferas (granel(G), vácuo (EV), atmosfera modificada (EAM))	44
Figura 5.4: Bolores e leveduras na morcela de arroz a granel (G)	47
Figura 5.5: <i>Bacillus cereus</i> na morcela de arroz a granel (G) e em atmosfera modificada (EAM).....	48
Figura 5.6: <i>Enterobacteriaceae</i> em morcela de arroz em diferentes atmosferas (granel (G); vácuo(EV); atmosfera modificada	49
Figura 5.7:Microorganismos totais (MT); bactérias ácido-lácticas (BAL); psicotróficos (Psic); <i>Enterobacteriaceae</i> (Ent); <i>Bacillus cereus</i> (B.c.) na morcela de arroz em atmosfera modificada.	52
Figura 5.8: Microorganismos totais (MT); bactérias ácido-lácticas (BAL); psicotróficos (Psic); <i>Enterobacteriaceae</i> (Ent); <i>Bacillus cereus</i> (B.c.) na morcela de arroz a vácuo.	54
Figura 5.9: Microorganismos totais (MT); bactérias ácido-lácticas (BAL); psicotróficos (Psic); <i>Enterobacteriaceae</i> (Ent); bolores e leveduras (B/L); <i>Bacillus cereus</i> (B.c.) na morcela de arroz a granel.....	56
Figura 5.10: Gráficos perfil de resposta referentes aos microrganismos a diferentes atmosferas.	58

Índice de Abreviaturas

aW – Actividade da água

BAL- Bactérias Ácido-Lácticas

BCA - *Bacillus cereus* agar base

B/L – Bolores e Leveduras

DTA – Doenças transmitidas por alimentos

EAM – Embalagem em Atmosfera Modificada

EV- Embalagem em Vácuo

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods

ISO - International Organization for Standardization

MRS - Man Rogosa Sharpe agar

MT – Microrganismos Totais a 30°C

M.Y.P - Mannitol Egg Yolk Polymyxin

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCA - Plate Count Agar

RBC - Rose-Bengal Chloramphenicol

TSC - Tryptone Sulfite Cycloserine

VRBD - Violet Red Bile D -Glucose Agar

1. Introdução

A carne é um alimento indispensável na alimentação do Homem devido à sua fonte de proteína necessária para um bom funcionamento do organismo. Contudo, os hábitos das populações mudaram e as pessoas já não procuram apenas carne fresca, mas também querem variar a sua alimentação diária, sendo os produtos cárneos conservados uma ótima opção (Rojas, 2003).

A carne, devido ao seu elevado valor nutricional, torna-se muito sensível ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes. Além disso, a sua actividade de água elevada e o pH favorável, facilitam o crescimento dos mesmos. A redução ou eliminação da actividade microbiana permite aumentar o tempo de vida útil da carne.

De acordo com Vandendriessche (2008), os processos tradicionais para a conservação da carne são a secagem, a salga e a fermentação.

Na salsicharia tradicional portuguesa, os produtos com maior destaque são os enchidos de carne (chouriços, linguiças e salpicões), os enchidos de sangue (morcelas e chouriças), os ensacados de carne (paio e painhos) e os presuntos curados (Esteves, 2005).

Portugal é um país de muitas tradições alimentares, estando os enchidos incluídos nelas. Podem ser produzidos de forma doméstica ou industrial.

As morcelas são produtos muito tradicionais, que podem ser encontrados em toda a Europa com composição ligeiramente diferente. Este produto é um tipo de enchido que pertence ao grupo de produtos cárneos cozidos. É caracterizada pela sua diversidade em ingredientes típicos. Sofre um processo de cozedura, eliminando grande parte dos microrganismos indesejáveis ao produto.

A contaminação da carne ocorre através do seu contacto com a pele, com os pêlo, com as patas, com o conteúdo gastrointestinal, com os equipamentos, com as mãos e a roupa dos operadores, com a água utilizada para lavagem das carcaças e com o ar dos locais de abate e de armazenamento, entre outros. Em todas os processos de abate, armazenamento e distribuição pode ocorrer contaminações. Por isso, é necessário seguir, rigorosamente, as regras de higiene gerais e específicas, em todo o processo de fabrico (Roça, s.d.; Regulamento (CE) n.º 853/2004).

Os microrganismos patogénicos associados à carne e produtos cárneos são, entre outros: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*

O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* (Silva, 2003).

Além dos microrganismos patogénicos, também existe microrganismos deteriorantes, que provocam, como o nome indica, deterioração na carne e nos produtos cárneos. Essas deteriorações estão relacionadas com a atmosfera que envolve os produtos cárneos, bem como com a temperatura de conservação e pH. As principais deteriorações são provocadas por bactérias, bolores e leveduras (Feitosa, 1999; Saraiva, 2008). De acordo com Saraiva (2008), vários trabalhos realizados no âmbito da microbiologia da carne demonstraram que os microrganismos deteriorantes representam apenas uma fracção da microbiota inicial e que, por diversas condições de armazenamento específicas, se convertem nos predominantes.

Segundo Saraiva (2008), a microbiota inicial da carne é muito diversificada e encontra-se constituída na sua maioria por mesófilos aeróbios totais, nomeadamente, *Pseudomonas spp.*, bactérias ácido-lácticas (BAL), *Brochothrix thermosphacta*, *Flavobacterium spp.*, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *micrococos* e *estafilococos*.

De acordo com Mota *et al.* (2009), a vida útil dos alimentos embalados depende das propriedades dos alimentos, tais como: a actividade de água, o pH, a susceptibilidade às enzimas ou microrganismos, sensibilidade ao oxigénio, à luz, ao dióxido de carbono e à humidade. Além disso, depende das características de embalagem. Segundo o mesmo autor, a embalagem é definida como o método de protecção, conservação do produto e meio para proporcionar ao consumidor as informações acerca do próprio produto.

O tempo de vida útil/prazo de validade de um produto alimentar depende não só da natureza do próprio alimento mas também da contaminação inicial que este apresenta. Quanto menor a contaminação inicial no alimento maior será o seu tempo de vida útil/prazo de validade em idênticas condições de conservação. O próprio animal contribui de forma importante para a presença de microrganismos tanto patogénicos como promotores de alterações do produto carne. A contaminação posterior da carne e do produto carne cozido pode resultar da manipulação a que é sujeito este produto. Segundo Allen & Foster (1960), as contaminações dos produtos cárneos podem ser provocadas com a utilização de substâncias no processamento tecnológico e/ou na sua conservação, com produtos químicos que surgem com as migrações de material da embalagem.

A qualidade do produto pode estar em causa sempre que se desenvolvam microrganismos que comprometam o sabor, o cheiro, a consistência e o aspecto do produto. Para prolongar o tempo de conservação dos alimentos é fundamental alterar a composição do meio ambiente, pois esta tem

influência na inibição do desenvolvimento da microbiota, e conseqüentemente, proporciona ao consumidor produtos de boa qualidade, com redução das concentrações de conservantes químicos e baixa intensidade de tratamentos térmicos.

A presença de microrganismos totais a 30^oC e psicotróficos pode afectar as condições sanitárias dos produtos cárneos, bem como os bolores e leveduras.

As bactérias lácticas são produtoras de ácido láctico, o que permite aumentar o período de vida útil do produto. Podem também afectar a qualidade do produto devido à sua capacidade de alterar as suas características organolépticas.

Clostridium perfringens e *Bacillus cereus* são bactérias patogénicas responsáveis por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). A proliferação e/ou produção de toxinas por microrganismos patogénicos podem provocar intoxicações alimentares, mesmo que os microrganismos que lhes deram origem tenham sido eliminados (Baptista & Antunes, 2005; Oliveira *et al.*, 2010).

Algumas bactérias da família *Enterobacteriaceae* são indicadoras de higiene, como por exemplo, *Escherichia coli*, responsáveis pelas alterações dos produtos alimentares. A microbiota dos enchidos tem, por isso, influência na decomposição, afectando assim negativamente a qualidade deste tipo de produtos.

As indústrias de carne, cada vez mais recorrem à tecnologia de embalagem a vácuo e embalagem em atmosfera modificada, pois estas permitem aumentar o tempo de vida útil dos produtos cárneos, com a inibição/redução do crescimento microbiano.

É por isso importante estudar a microbiota ao longo do prazo de validade (44 dias) da morcela de arroz, através da aplicação de duas tecnologias de embalagem: embalagem em atmosfera modificada (EAM) (80%CO₂/20%N₂) e em vácuo (EV), e sem tecnologia de embalagem específica. Com este estudo pretendeu-se saber qual a influência das tecnologias de embalagem no prazo de validade da morcela de arroz, e conseqüentemente, identificar qual o tipo de embalagem mais eficaz para a conservação deste produto cárneo cozido.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Conservação da carne

A origem do processamento da carne, para Souza (2003), surgiu quando o Homem considerou o sal com agente conservante.

Segundo o mesmo autor, os povos da Ásia Menor moíam carnes desidratadas e faziam enchidos, com adição de condimentos. Este feito foi descoberto, mais tarde, pelos chineses, e deste modo foram produzidos diversos tipos de enchidos 2000 anos antes da Era Cristã.

Segundo Vandendriessche (2008), produtos cárneos ou carnes processadas são o resultado da necessidade de preservar a carne desde os tempos antigos. A tecnologia de conservação da carne é conhecida desde a Idade Antiga. O objectivo da conservação da carne, seria o seu aproveitamento e quando a carne caçada não era consumida de imediato. O que permitiu ao exército grego conquistar a maior parte da Europa Ocidental, Oriente Médio e costa de África foi a tecnologia de conservação da carne .

Nos países da Europa do Norte e Centro, o processo de conservação mais importante foi o decréscimo do pH, de 5,6-5,8 para 4,6-4,9, nos produtos fermentados. Nos países mediterrânicos, o processo foi a redução da actividade de água (aw). A tecnologia de conservação da carne pelo abaixamento de ambos os parâmetros (pH e aw) é considerada a mais antiga. A redução da aw pode ser obtida pela salga e/ou fumagem (Vandendriessche, 2008).

Em termos microbiológicos, o processamento de alimentos tem como principal objectivo diminuir ou eliminar a população microbiana nos alimentos. A pasteurização e a esterilização de alimentos tem essa finalidade, contudo o processamento através da fermentação não tem como função eliminar microrganismos presentes nos alimentos. No processo fermentativo, está incluído a adição de microrganismos benéficos, na forma de uma cultura “starter”, ao produto a ser fermentado, em que ocorre a multiplicação dessa cultura, sendo esta presente no produto final. O pós-processamento pode aumentar a diversidade da população microbiana de vários alimentos pois o ser humano manipula-os depois destes serem processados. Portanto, os alimentos que se ingere variam de produtos praticamente estéreis (enlatados) aos produtos que contêm milhões de células microbianas vivas, tais como queijo, enchidos e iogurte (Yousef & Carlstrom, 2003).

2.2. Produtos cárneos

Os produtos cárneos que, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 853/2004, pertencem ao grupo dos preparados à base de carne. Este grupo é constituído pela “carne fresca, incluindo carne que tenha sido reduzida a fragmentos, a que foram adicionados outros géneros alimentícios, condimentos ou aditivos ou que foi submetida a um processamento insuficiente para alterar a estrutura das suas fibras musculares e eliminar assim as características de carne fresca.”

Segundo o Decreto Lei n.º 290 de 20 de Setembro de 1990, os produtos cárneos são “os produtos à base de carne, fabricados a partir de carnes ou com carne que tenham sofrido um tratamento tal que a superfície de corte à vista, permita verificar o desaparecimento das características da carne fresca.”

A produção de produtos cárneos (enchidos) era antigamente considerada uma arte (Souza, 2003).

A qualidade dos produtos cárneos deve-se à matéria-prima e aos processos de fabrico tradicionais.

Os produtos portugueses são produtos únicos que têm origem na região que lhes dá o nome, de tal forma a qualidade do produto é demonstrada pela influência das raças animais, solo, vegetação, clima e tecnologia de fabrico (Silva, 2003).

Segundo Vandendriessche, os produtos cárneos podem ser classificados em quatro categorias (Quadro 2.1).

Quadro 2.1: Classificação de produtos cárneos (Adaptado de: Vandendriessche, 2008)

	Músculo Inteiro	Carne picada
Com tratamento térmico	I- Fiambre cozido	II- enchido cozido (ex: morcela)
Sem tratamento térmico	III- Presunto Curado	IV-Salsicha fermentada

Nos produtos cárneos sujeitos a tratamento térmico, de temperatura superior a 50°C, ocorre uma desnaturação de proteínas miofibrilhares, devido à acção do calor, ao contrário dos produtos cárneos sem tratamento térmico, em que a temperatura é inferior a 50°C (Vandendriessche, 2008).

2.2.1. Morcela de arroz

A *morcela de arroz* é um enchido de sangue cozido, elaborado com carne magra picada, arroz, cebola picada e especiarias, como pimenta, salsa e/ou hortelã. O enchimento é feito em invólucro natural (estômago de porco, bexiga de porco ou tripa de porco ou de bovino fresca salgada), atado com fio de algodão. Sofre um processo de cozedura, que dura cerca de uma hora em caldo mouro com: água, cebolas inteiras, sal, alho, salsa e louro (adaptado de: Silva, 2003).

2.3. Importância dos microrganismos nos alimentos

Os microrganismos que requerem maior atenção podem provocar alterações nos alimentos e na saúde do consumidor. Contudo, têm também um papel determinante na produção de certos alimentos. Deste modo, esses microrganismos são considerados contaminantes ou úteis (Gava *et al.*, 2008). O Quadro 2.2 apresenta exemplos de microrganismos contaminantes.

Quadro 2.2: Microrganismos contaminantes de alimentos (Adaptado de Gava *et al.*, 2008)

Contaminantes	Efeito ou Função	Exemplos
Deteriorantes	Alteram as características organolépticas dos alimentos	<i>Pseudomonas</i> , enterobactérias, <i>Flavobacterium</i> , bactérias ácido-lácticas, <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , bolores e leveduras
Patogénicos	Doenças no homem	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> (produz toxina botulínica); <i>Clostridium perfringens</i> ; <i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>Salmonella spp.</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> (produz toxina estafilocócica); <i>Aspergillus flavus</i> (produz aflotoxina).
Indicadores	Usados para avaliar condições higiénico-sanitárias ou de processamento de um alimento	Bactérias do grupo coliforme; coliformes de origem fecal (<i>Escherichia coli</i>); bolores e leveduras.

Os microrganismos úteis, isto é, benéficos para os alimentos, são utilizados nos processos de produção de determinados alimentos, como é o caso da utilização de leveduras no pão e cerveja, e das bactérias ácido-lácticas, que são utilizadas em diversos alimentos, tais como o queijo, iogurtes, enchidos, entre outros (Gava *et al.*, 2008).

A deterioração de alimentos envolve qualquer mudança que torna o alimento inaceitável para consumo humano. Pode ocorrer devido a uma série de factores: insectos; danos físicos; actividade de enzimas existentes em tecidos animais e vegetais; actividade metabólica de bactérias, bolores e leveduras (Forsythe, 2000).

2.3.1. Microrganismos totais a 30°C

Os microrganismos totais a 30°C são um conjunto diverso de bactérias e fungos que se podem encontrar dispersos em diferentes meios como: o solo, a água, o ar, a pele, o intestino e cavidades nasais, entre outros (Calixto, 2009).

Este grupo inclui normalmente bactérias com temperaturas favoráveis de crescimento no intervalo de 15/20°C a 40/45°C. Estes microrganismos têm crescimento óptimo à temperatura de 30°C. O grupo é considerado predominante em relação à contaminação das carcaças, sendo por esse motivo considerados como indicadores de qualidade sanitária. Incluídos nesse grupo estão algumas bactérias Gram-positivas como: *Mycrococcus*, *Staphylococcus* e *Coriniformes* (Calixto, 2009).

O número de microrganismos totais é o indicador de qualidade sanitária/higiénica de um alimento e o seu grau de salubridade. As contagens elevadas são sugestivas: em géneros alimentícios perecíveis, de incorrecto processo de armazenamento e incumprimentos relativamente ao binómio tempo/temperatura; em géneros alimentícios não perecíveis, de uso de matéria-prima contaminada ou processamento incorrecto (Calixto, 2009).

Segundo o Regulamento (CE) Nº 1441/2007, os limites microbiológicos mínimos e máximos de microrganismos aeróbios em carnes picadas é de 5×10^5 ufc/g e 5×10^6 ufc/g, respectivamente.

2.3.2. Psicotróficos

Downes & Ito (2001) definiram a palavra "psicotróficos" como microrganismos que crescem a baixas temperaturas, mas com temperaturas óptimas, superiores a 20°C. Psicotróficos são definidos como

microrganismos que crescem visivelmente a $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ entre de 7 a 10 dias, independentemente da sua temperatura óptima de crescimento. Considera-se os psicrotróficos um subgrupo dos mesófilos.

As bactérias psicrotróficas são deteriorantes devido, principalmente, à produção de proteases, lípases e fosfolipases, que hidrolisam a proteína e a gordura dos produtos cárneos cozidos. A maioria das bactérias psicrotróficas não sobrevive à pasteurização, no entanto, muitas das suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes (Arcuri *et al.*, 2008).

Do ponto de vista prático, os microrganismos mais comuns presentes em alimentos refrigerados e responsáveis pela deterioração dos alimentos são os psicrotróficos e psicrófilos (Downes & Ito 2001). De acordo com Sivasankar (2004), as bactérias psicrotróficas podem deteriorar os alimentos, como carnes, peixes, aves, ovos, entre outros. Segundo Perez (2003), dos microrganismos patogénicos psicrotróficos, destacam-se: *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas sp*, que ao serem capazes de crescer a temperaturas inferiores a 7°C podem provocar doenças ao consumidor. Por isso, deve-se usar conservantes, como cloreto de sódio, nitrito de sódio, lactato de sódio, para controlar o crescimento e desenvolvimento de agentes patogénicos (Perez, 2003).

As bactérias psicrotróficas podem ter a forma de bastonetes ou cocos, esporuladas ou não esporuladas, Gram-negativas ou Gram-positivas e aeróbias. Os géneros de bactérias Gram-negativas mais comuns são: *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes*. No que diz respeito aos géneros de bactérias Gram-positivas, podem-se destacar: *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Microbacterium* e *Streptococcus* (Downes & Ito, 2001; Arcuri *et al.*, 2008).

Uma das principais bactérias encontradas em alimentos embalados a vácuo ou sob atmosfera modificada são as bactérias psicrotróficas (Downes & Ito, 2001).

2.3.3. Bactérias ácido-lácticas

Segundo Révillion (s.d.); Felipe (2008); Saraiva (2008); Almeida (2009), as bactérias ácido-lácticas (BAL) são produtoras de ácido láctico, sendo este o principal produto final de fermentação. As BAL são caracterizadas como sendo Gram-positivas; anaeróbias facultativas, mas toleram pequenas quantidades de oxigénio, designando-se por microaerófilas; geralmente catalase negativas; não esporuladas, em forma de cocos, cocobacilos ou bacilos, e geralmente imóveis. Existem subgrupos com estirpes heterofermentativas que produzem, para além de ácido láctico, grandes quantidades

de dióxido de carbono e ácido acético ou etanol. De acordo com Beasley (2004), tais compostos orgânicos são responsáveis pelo aroma e sabor característicos dos produtos fermentados. Também podem ser homofermentativas, em que o produto final é quase exclusivamente ácido láctico. A maioria deste grupo de bactérias é destruída a temperatura de 70°C mas algumas são destruídas a 80°C (Révillion, s.d.).

De acordo com Bastos (2009), as BAL são bactérias mesófilas, podendo crescer a temperaturas inferiores a 5°C e superiores a 45°C. Isto indica que durante a refrigeração, as BAL podem-se desenvolver, tendo origem na matéria-prima. A maioria das BAL crescem em meios ácidos, com um intervalo de pH, entre 4,0 e 4,5, e as restantes podem crescer em meio de pH inferior a 3,2 ou superior a 9,6. Segundo Gonçalves (2009), a tolerância à acidez é uma característica variável entre estirpes.

As BAL constituem, possivelmente, o grupo mais numeroso de bactérias relacionadas com os seres humanos, estando associadas às superfícies das mucosas, nomeadamente nos tractos gastrointestinal, respiratório e genital do Homem e de outros animais (Gonçalves, 2009).

Genericamente, não são patogénicas e são produtoras de substâncias antimicrobianas, designadamente ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio e bacteriocinas (Saraiva, 2008; Gonçalves, 2009).

As BAL são consideradas um grupo importante de bactérias probióticas (Beasley, 2004). O termo probiótico, segundo Fuller (1989), é definido como um suplemento alimentar baseado em organismos vivos e vitais, contribuindo beneficemente sobre o organismo animal e melhoramento do equilíbrio microbiano intestinal.

Segundo Perez (2003); Neto *et al.* (2005); Bastos (2009), o grupo das BAL é composto por 15 géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Atopobium*, *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*.

As BAL são consideradas as principais bactérias responsáveis pelos processos de alteração de produtos cárneos. *Lactobacillus curvatus* é a principal espécie que altera os produtos cárneos embalados em atmosfera anaeróbia. Também se pode destacar lactobacilos heterofermentativos e *Leuconostoc* como sendo responsáveis pelas alterações encontradas em produtos cárneos cozidos embalados a vácuo (Perez, 2003). As BAL ao representarem uma pequena fracção da microbiota contaminante inicial, não possuem elevado potencial deteriorativo, e o seu desenvolvimento pode

ser inibido pela refrigeração. As BAL podem causar deterioração num alimento apenas se o desenvolvimento de outras bactérias deteriorativas estiver inibido (Saraiva, 2008). Segundo o mesmo autor, a deterioração deste grupo de bactérias resulta na formação de viscosidade superficial e de CO₂, diminuindo o pH e desenvolvendo odores desagradáveis.

2.3.4. Bolores e Leveduras

Os bolores são fungos multicelulares, filamentosos, que formam filamentos designados por hifas, que estão distribuídos amplamente pela natureza e podem ser encontrados no solo, em animais, no ar e na água. As hifas formam os micélios, que são responsáveis pela fixação do fungo ao alimento e pela sua reprodução, incluindo a produção de esporos, quer sexuada quer assexuadamente. Além dessas funções, os micélios também são responsáveis pela coloração (em conjunto com os esporos) e pelo aspecto característico das colónias: semelhante ao algodão, secas, húmidas, compactas, gelatinosas (Gava *et al.*, 2008).

Estes microrganismos reproduzem-se à temperatura ambiente e conseguem sobreviver à temperatura de refrigeração (Pereira *et al.*, 2009). No geral, não se adaptam a temperaturas elevadas e conseguem se desenvolver em ambientes com escassez de água. Os bolores são, na sua maioria, aeróbios, e adaptam-se facilmente a ambientes ácidos. Geralmente desenvolvem-se sem dificuldade nos vegetais, sendo responsáveis por diversas doenças de frutos (Gava *et al.*, 2008). A maioria dos bolores é deteriorante. Outros produzem substâncias denominadas micotoxinas, que podem provocar doenças cancerígenas e mutações genéticas, entre outros problemas (Pereira *et al.*, 2009). As micotoxinas podem ser um perigo de consumo directo ou indirecto, através de ingestão de alimentos contaminados por fungos ou por ingestão de produtos de animais alimentados com produtos contaminados por fungos dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, entre outros, respectivamente (Nunes *et al.*, 2005). Podem-se destacar os seguintes fungos produtores de micotoxinas: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* (aflatoxina em amendoim, castanha do Brasil e milho); *Aspergillus clavatus* (patulina em frutas); *Penicillium citrinum* (citrinina no arroz); *Penicillium expansum* (Patulina em frutas, pães e enchidos). Sendo a maior parte das micotoxinas termoestáveis, não são totalmente eliminadas no processo industrial (Gava *et al.*, 2008).

As leveduras são fungos unicelulares, vulgarmente conhecidos como fermentos. Estão distribuídas na água, solo, ar, plantas e animais. Não necessitam de tanta humidade como as bactérias, mas necessitam mais do que os bolores (Gava *et al.*, 2008). As leveduras conseguem se desenvolver a

temperaturas de refrigeração, tal como os bolores (Pereira *et al.*, 2009). Contudo, no geral, preferem temperaturas entre 20-30°C para o seu desenvolvimento (Gava *et al.*, 2008).

As leveduras podem ser fermentativas (desenvolvimento na presença ou ausência de oxigénio) ou oxidativas (desenvolvimento apenas na presença de oxigénio). O seu desenvolvimento pode ser favorecido em meios com pH ácido (Gava *et al.*, 2008), podendo ser capazes de crescer com concentrações de 100% de CO₂ (Saraiva, 2008).

Relativamente à sua multiplicação, as leveduras requerem menos tempo que os bolores e que as bactérias (Gava *et al.*, 2008).

Estes microrganismos podem ser encontrados, sobretudo, em frutas e hortaliças. Algumas espécies podem provocar o aparecimento de doenças no Homem (Gava *et al.*, 2008).

Segundo Almeida (2009), os bolores e as leveduras (B/L) são menos sensíveis a diminuições de actividade da água, sendo por isso conhecidos como os microrganismos dominante em determinados alimentos que apresentem esta característica – xerofilia. Segundo o mesmo autor, as leveduras resistem à baixa actividade da água tanto na presença de sais como de açúcares. As leveduras contaminantes de alimentos pertencem predominantemente ao género *Zygosaccharomyces*, *D. hansenii*, *Candida parapsilosis* e *Pichia membranaefaciens*. As mesmas são espécies também resistentes a elevados teores de sacarose e de NaCl. Em relação ao pH, os bolores e leveduras são, de um modo geral, mais resistentes que a maioria das bactérias a valores baixos de pH, com predominância na microbiota típico de alimentos com pH ácido.

Nos fungos, as temperaturas necessárias para a destruição das células vegetativas e esporos, são 50 ou 60°C, respectivamente (Pampulha & Oliveira, 2004).

2.3.5. *Bacillus cereus*

B. cereus é a espécie de modelo do "grupo de *Bacillus cereus*", também conhecida como *Bacillus cereus sensu lato*, constituída por cinco outras espécies relacionadas: *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, e *Bacillus weihenstephanensis* (Senesi & Ghelardi, 2010).

O género *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia facultativa, formadora de esporos, que pode contaminar alimentos cozinhados, cenoura, carne, produtos lácteos, arroz,

molhos e sopas (Friedman *et al.*, 2006). Pode estar presente em produtos cárneos condimentados porque as especiarias são de fácil contaminação por esta bactéria (Anderson & Pascual, 2000).

Esta bactéria está amplamente distribuída na natureza. No solo os esporos persistem sob condições adversas (Anderson & Pascual, 2000).

Devido à sua capacidade de formar esporos, *B. cereus* pode sobreviver a uma ampla gama de condições de stress (Senesi & Ghelardi, 2010). Os esporos são mais resistentes que as células vegetativas a vários factores, como a temperaturas elevadas, estando sob a forma latente enquanto o meio não tiver as condições necessárias para a multiplicação das células vegetativas.

B. cereus representa um dos patógenos importantes na restauração colectiva, porque a sua eliminação não é garantida por meio de processos de pasteurização e saneamento (Senesi & Ghelardi, 2010).

De acordo com ICMSF (1996), os esporos resistem a todos os processos de fabrico dos alimentos e, por outro lado, *B. cereus* está presente na maioria das matérias-primas necessárias para a fabricação de produtos alimentares.

É fundamental ter-se conhecimento das temperaturas, pH e actividade de água (*aw*) de crescimento de *Bacillus cereus*, por forma a tomar medidas preventivas e de controlo. No Quadro 2.3 encontram-se discutidas os valores para os parâmetros acima mencionados.

Quadro 2.3: Condições de crescimento de *Bacillus cereus*, na forma vegetativa, associadas à carne e produtos cárneos e medidas preventivas (Adaptado de: Silva, 2003)

Temperatura (°C)	pH	aw	Medidas preventivas e de controlo
10-48	4,9-9,3	0,91	Condições apropriadas de aquecimento/arrefecimento

Em condições normais e quando o seu número é limitado, não é considerada patogénica. No entanto, pode ser prejudicial ao Homem, se o alimento estiver consideravelmente contaminado (valores próximos e acima de 10^6 ufc/g); se as condições de temperatura de conservação do alimento forem adequadas para o desenvolvimento do microrganismo, ou seja, temperaturas compreendidas entre 10 e 48°C; se o tratamento térmico que se dá a um determinado alimento não for suficiente para destruir os esporos (Anderson & Pascual, 2000; Silva, 2003). Os esporos bacterianos são inactivados, geralmente, a temperaturas acima dos 100°C, enquanto que a maior parte das células vegetativas

bacterianas são destruídas a temperaturas de 60-70°C durante 10 minutos (Pampulha & Oliveira, 2004).

Esta bactéria é responsável por intoxicações alimentares, caracterizada por uma diarreia e desconforto abdominal ou náuseas e vômitos (Senesi & Ghelardi, 2010) devido à produção de dois tipos de toxina - diarreica e emética. É durante a fase exponencial de multiplicação da bactéria no alimento que são produzidas as toxinas (Almeida *et al.*, 2011).

O síndrome diarreico assemelha-se à toxinfecção alimentar causada por *Clostridium perfringens*, mas há diferenças entre eles: *B. cereus* esporula facilmente em alimentos e está envolvido em incidentes de intoxicação alimentar mais frequentemente do que *Clostridium perfringens*. Os sintomas do síndrome diarreico duram 8 a 16 horas. A toxina diarreica é produzida no intestino delgado do hospedeiro e inativada pela tripsina e pronase, bem como a exposições de 30 minutos a temperaturas de 56°C (Anderson & Pascual, 2000; Almeida *et al.*, 2011; Tobar, 2011).

Relativamente ao síndrome emética, este ocorre após a ingestão da toxina formada no alimento. Tem características semelhantes às intoxicações causadas pela enterotoxina estafilocócica. Os sintomas duram entre 1 a 6 horas e são causados por uma enterotoxina estável originada durante o crescimento de estirpes de *B. cereus* enterotoxigênicas no alimento. A toxina resiste a altas temperaturas, 120°C durante 90 minutos, à exposição à tripsina, à pepsina e a pH extremos. Resiste dois meses a temperaturas de armazenamento de 4°C (Anderson & Pascual, 2000; Martinelli, 2007).

O alimento responsável por esta doença nos Estados Unidos é o arroz cozido (Martinelli, 2007). *Bacillus cereus* está presente no arroz cru, e como os seus esporos são termoresistentes, há uma grande possibilidade de eles resistirem à cocção, levando à produção da toxina quando o arroz é mantido à temperatura ambiente depois do processo de cocção (Martinelli, 2007).

O binómio tempo/temperatura elevados provoca a activação dos esporos e conseqüentemente o desenvolvimento vegetativo e produção de toxinas. Os alimentos devem ser imediatamente refrigerados ou mantidos acima de 60°C para impedir o crescimento das células (ECOLAB, 2011). Além disso são necessários cuidados de higiene na manipulação dos alimentos.

2.3.6. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é uma bactéria em forma de bacilo, anaeróbia Gram-positiva, imóvel e formadora de esporos (Juneja *et al.*, 2010).

De acordo com Juneja & Thippareddi (2004), os esporos de *C. perfringens* estão amplamente distribuídos no solo e na água e, muitas vezes contaminam a carne crua e aves durante as operações de abate. Os surtos causados por *Clostridium perfringens* surgem principalmente devido ao consumo de alimentos manipulados de forma incorrecta depois do processo de cozedura. Os esporos desta bactéria, presentes em matérias-primas utilizadas na preparação de produtos cárneos, podem sobreviver a temperaturas elevadas durante os processos utilizados na indústria de carne.

Esta bactéria é encontrada em produtos de origem vegetal, em outras matérias-primas e alimentos processados. A bactéria é encontrada frequentemente em carnes, geralmente por contaminação fecal de carcaças; contaminação de outros ingredientes, tais como especiarias; ou contaminação pós-processamento (Juneja & Thippareddi, 2004). Segundo Juneja & Sofos (2010) cerca de 50% de carne crua ou congelada contém *Clostridium perfringens*. Através de diferentes pesquisas sobre a incidência de *C. perfringens* em alimentos crus e processados, detectaram-se níveis de incidência de 30 a 80% (Juneja & Sofos, 2010).

O intervalo de temperatura óptimo de crescimento para o organismo é de 43-45°C, embora o crescimento possa ocorrer entre 15-50°C (Juneja & Sofos, 2010). A temperatura é o factor mais importante para o controlo desta bactéria, no entanto há outros factores, como o pH e aw, que controlam o seu crescimento. No Quadro 2.4 estão representados os valores de pH e aw favoráveis ao desenvolvimento desta bactéria.

Quadro 2.4: Condições de crescimento de *Clostridium perfringens* associadas à carne e produtos cárneos e medidas preventivas (Adaptado de: Silva, 2003)

pH	aw	Medidas preventivas e de controlo
5,5-8,0	0,95	Condições apropriadas de aquecimento/arrefecimento e de cozedura (tempo/temperatura)

2.3.7. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae é uma família heterogénea de bactérias Gram-negativas, que podem fazer parte da microbiota intestinal normal de humanos e animais, mas também do solo, água e vegetação e ainda outros que podem estar associados em vários processos patogénicos. Podem ser móveis com flagelos peritricos ou imóveis; têm distribuição ubiqüitária; não formam esporos; são aeróbias ou anaeróbias facultativas; podem crescer em diversos meios não selectivos (p. e. agar sangue) e selectivos (p. e. agar Mac-Conkey); fermentam a glucose; algumas fermentam a lactose; reduzem os nitratos a nitritos; são oxidase negativas e catalase positivas. A ausência de actividade citocromo-oxidase é uma característica importante que permite distinguir as enterobactérias de outros bacilos Gram-negativos (Murray *et al.*, 2005).

Os géneros mais comuns são: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Edwardsiella*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Hafnia*, *Erwinia* (Corry *et al.*, 2003).

Nenhuma família de microrganismos foi tão importante para os cientistas estudarem como a família das *Enterobacteriaceae* (Janda & Abbott, 2006).

Este grupo de bactérias engloba muitos géneros de origem não fecal e, deste modo, a contagem de enterobactérias é usada mais regularmente como indicador da qualidade higieno-sanitária dos alimentos do que como indicador de contaminação fecal (Castro, 2008).

Escherichia coli. é uma das bactérias mais importantes da família *Enterobacteriaceae*, que pertence à microbiota intestinal dos mamíferos e que poderá ser a maior causadora de infecções intestinais (Janda & Abbott, 2006).

Os géneros *Salmonella* e *Shigella* são bactérias coliformes, patogénicas de origem intestinal, responsáveis por infecções intestinais como: desintéria bacteriana, febre tifóide e algumas toxinfecções alimentares. Outros géneros relacionados ao grupo das bactérias coliformes, mas de ecologia diferente são: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* e *Erwinia* (Yokoya *et al.*, (s.d.); Cunha (2006)). Segundo Cunha (2006), as três primeiras, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes na vegetação, no solo e na água. Para Yokoya *et al.* (s.d.), as bactérias *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* têm origem no solo e na água, enquanto que a *Erwinia* é uma bactéria patogénica das plantas (Yokoya *et al.*, s.d.).

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

A maior aplicação de *Enterobacteriaceae* e de outros microrganismos indicadores consiste na avaliação da qualidade global de um alimento e das condições de higiene durante o seu processamento (Castro, 2008).

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

2.4. Factores que influenciam a microbiota em alimentos

Além dos factores que influenciam a microbiota em alimentos, os próprios microrganismos podem interferir entre si. De entre diferentes microrganismos, como as bactérias, bolores e leveduras, um deles predominará e provocará uma alteração no alimento. Se as condições forem favoráveis para todos, as bactérias crescem mais rapidamente que as leveduras e estas mais que os bolores. As leveduras só se destacarão das bactérias quando estão em maior número, ou se as condições não permitirem o crescimento bacteriano. Contudo, poderá existir ajuda mútua entre os diferentes microrganismos ou poderá crescer simultaneamente sem favorecimento ou inibição entre si. Além disso, ainda existe outra situação em que um determinado microrganismo pode oferecer boas condições para o desenvolvimento de outro, através de fermentações e decomposição dos alimentos (Gava *et al.*, 2008).

2.4.1. pH

O pH é um parâmetro usado para verificar se um alimento é ácido ou não. É um factor que influencia a actividade microbiana pois um meio ácido (pH baixo) pode inibir o crescimento de microrganismos, e isso é possível através da adição de ácidos fracos ou através da fermentação láctica.

Como a morcela tem um pH quase neutro (Silva, 2003), promove mais facilmente a actividade e o crescimento de diversos microrganismos, do que um produto com um pH ácido.

Segundo Baptista & Venâncio (2003), as bactérias desenvolvem-se mais facilmente em ambientes com pH neutro, sendo que a maior parte delas suportam ambientes com pH entre 4,5 a 9,0.

Os fungos, conseguem desenvolver-se em ambientes com pH entre 2,5 a 9,5 (Baptista & Venâncio, 2003).

Os valores de pH de diferentes enchidos estão representados no Quadro 2.5.

Quadro 2.5: Valores médios ou intervalos de valores de pH de enchidos(Adaptado de:Silva, 2003)

Produto	pH
Enchidos fumados	>4,5
Chouriço cru	4.9-5,2
Morcelela	6,2-7,0

Deste modo, ao se comparar o pH da morcela com o pH em que os microrganismos se conseguem desenvolver, pode-se afirmar que tanto as bactérias como os fungos têm a capacidade de se desenvolver nesse produto.

2.4.2. Actividade da água (aw)

A actividade da água de um alimento é um factor que influencia o desenvolvimento dos microrganismos, pois quanto maior for a actividade da água mais facilmente os microrganismos se desenvolvem, menor será a estabilidade do produto e, conseqüentemente, menor é o tempo de conservação do mesmo.

As bactérias desenvolvem-se facilmente em ambientes com uma actividade de água elevada (Baptista & Venâncio, 2003).

Ambientes com $aw < 0,60$, os esporos dos fungos não conseguem germinar. No entanto, conseguem-se manter e assim que a aw aumente, os fungos retomam o seu crescimento. Além disso, também conseguem se desenvolver em alimentos com $aw > 0,70$ e, alguns estão aptos a se desenvolverem em alimentos com uma actividade de água que as bactérias não resistem (Baptista & Venâncio, 2003).

O Quadro 2.6 apresenta os valores médios ou intervalos de valores de pH e aw de dois tipos de enchidos.

Quadro 2.6: Valores médios ou intervalos de valores de aw de enchidos (Adaptado de Silva, 2003)

Produto	aw
Enchidos fumados	<0,90
Morcela	0,96-0,98

No Quadro 2.6 observa-se que a morcela é o produto que apresenta valores de aw superiores aos enchidos fumados, permitindo que os microrganismos se desenvolvam mais rapidamente, tendo, portanto, um menor poder de conservação. Assim sendo, é necessário assegurar a sua conservação, através de factores que serão mencionados posteriormente.

A morcela ao ter um intervalo de aw entre 0,96-0,98, poderá favorecer o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Bacillaceae*, *Lactobacillaceae*, *Micrococaceae*) se o pH e conservantes não interferirem no crescimento (Gava *et al.*, 2008).

2.4.3. Temperatura

A temperatura é dos factores que mais afecta a actividade e o desenvolvimento microbiano, pois esta influencia a actividade das enzimas microbianas e de enzimas dos tecidos. As enzimas presentes nos alimentos continuam a sua actividade durante o armazenamento e a sua actividade é tanto menor quanto menor for a temperatura de armazenamento. No geral, às temperaturas de refrigeração, os microrganismos têm dificuldade de se desenvolver, o que diminui fortemente a produção de toxinas, levando a um aumento da conservação dos produtos e a uma preservação das características organolépticas e nutricionais do alimento. Contudo, a refrigeração não permite destruir os microrganismos, ao contrário de temperaturas elevadas, o que leva ao seu desenvolvimento quando a temperatura lhes é favorável. Além disso, não permite eliminar a acção nociva de algumas toxinas. (Gava *et al.*, 2008)

O processo de refrigeração reduz o crescimento da maior parte dos agentes patogénicos, mas os microrganismos com temperaturas óptimas baixas continuam a desenvolver-se.

A temperatura de refrigeração utilizada para uma conservação adequada varia com o tipo de produto e com tempo em que o mesmo fica armazenado. Segundo ARESP (s.d.), as temperaturas de refrigeração devem, no geral, oscilar entre 1 e 4°C.

A utilização de elevadas temperaturas é considerado um dos métodos mais eficazes na destruição dos microrganismos. É comum a utilização de calor húmido ou calor seco, no entanto, o calor húmido destrói as células mais rapidamente a temperaturas mais baixas. O método de esterilização elimina os microrganismos patogénicos e deteriorantes, durante 15 minutos a 121°C, por acção de calor húmido. Por outro lado, no uso de calor seco é necessário uma temperatura de 160-180°C durante 1,5 - 3 horas (Pampulha & Oliveira, 2004).

Segundo as diferentes temperaturas óptimas, máximas e mínimas de crescimento, os microrganismos podem ser classificados como: mesófilos, termófilos, psicrófilos e psicrotróficos. No Quadro 2.7 estão presentes as temperaturas relativas a cada um destes microrganismos.

Quadro 2.7: Classificação dos microrganismos segundo diferentes temperaturas(°C) (Gava *et al.*, 2008)

Grupo	Temperatura(°C)		
	Mínima	Óptima	Máxima
Mesófilos	5 – 15	30 – 45	35 – 47
Termófilos	40 – 45	55 – 75	60 – 90
Psicrófilos	-5 – +5	12 – 15	15 – 20
Psicrotróficos	-5 – +5	25 – 30	30 – 35

2.4.4. Disponibilidade de oxigénio

O poder oxidante ou redutor do alimento influencia no crescimento de microrganismos, determinando quais os microrganismos que se podem desenvolver (Gava, 1984).

Como já foi mencionado anteriormente, os microrganismos podem ser classificados conforme o aproveitamento de oxigénio livre. Podem ser aeróbios, anaeróbios e facultativos. Os microrganismos aeróbios são os que necessitam de oxigénio para o seu desenvolvimento; os microrganismos anaeróbios são os que se desenvolvem na ausência de oxigénio; os microrganismos facultativos são os que podem crescer na ausência ou presença de oxigénio (Gava, 1984).

Os microrganismos aeróbios têm a capacidade de oxidar a glucose para CO₂ e H₂O, devido ao seu sistema enzimático, sendo o oxigénio o receptor final de electrões (Gava, 1984).

Ao microrganismos anaeróbios, ao contrário dos anteriores, não possuem um sistema enzimático necessário para obterem energia. Deste modo, do ácido pirúvico podem-se formar ácido láctico, álcool, entre outros., obtendo assim energia (Gava, 1984).

As bactérias podem ser aeróbias, anaeróbias e facultativas, enquanto que os bolores são estritamente aeróbios e as leveduras são aeróbias e anaeróbias facultativas (Gava, 1984).

2.4.5. Matéria – prima e especiarias

O próprio alimento tem características fundamentais no desenvolvimento das bactérias, pois além de lhes fornecer energia, é importante para a estrutura das bactérias. Existem elementos químicos essenciais ao metabolismo bacteriano. Esses elementos são: carbono, hidrogénio, oxigénio, azoto, enxofre, fósforo, ferro, potássio, magnésio e cálcio, além de outro necessário em menores quantidades (Hayes, 1992).

Os carboidratos e os aminoácidos são elementos orgânicos utilizados pelas bactérias. Existem três nutrientes fundamentais para o desenvolvimento das bactérias, tais como: aminoácidos, para a síntese das proteínas; purinas e pirimidinas, para a síntese de DNA e RNA; vitaminas, para a síntese de enzimas (Hayes, 1992).

A carne constitui a matéria-prima principal da maioria dos produtos cárneos transformados. É essencialmente de origem suína, excepto as alheiras onde são introduzidas carnes de caça e brancas, como de aves. No geral, a sua composição química contém 75% de água, 18% de proteínas, 3.5% de substâncias não proteicas solúveis e 3% de gordura (Silva, 2003).

O produtor deverá assegurar que a matéria - prima tem boas condições de salubridade, como o transporte e armazenagem, em que a temperatura não deverá exceder os 4°C. A segurança dos produtos passa pelo controlo de qualidade da matéria-prima (Silva, 2003).

De acordo com Matos (2010), as matérias-primas cárneas são o sangue e os “trimmings” (pedaços de carne que resultam de operações de preparação), onde estão incluídos as vísceras – baço, pulmão, língua, fígado, entre outros; pele; toucinho. A matéria-prima auxiliar é o arroz.

As especiarias adicionadas, que também podem ser consideradas de matérias-primas auxiliares, juntamente com o arroz, são sobretudo o cominho, o cravinho, a noz-moscada e o vinho tinto (Matos, 2010). Mas também podem fazer parte o alho, o sal, a pimenta, salsa e/ou hortelã, entre

outros. As especiarias e ervas são responsáveis pelas características organolépticas desejáveis e apreciáveis, contribuindo para a tipicidade dos produtos. Além disso, são fundamentais para a inibição da actividade dos microrganismos patogénicos e de degradação. A adição de sal em quantidades muito elevadas ou muito baixas poderá provocar o crescimento de bactérias ácido-lácticas indesejáveis, interferindo negativamente nas características finais do produto (Almeida, 2009). O alho, em particular, possui uma substância, a alicina, capaz de inibir o crescimento de algumas bactérias deterioradoras. Por outro lado, podem favorecer o crescimento de bactérias ácido-lácticas promovendo a fermentação láctica (Silva, 2003).

A acção dos agentes antimicrobianos é, sobretudo, exercida ao nível da membrana celular da bactéria, provocando danos estruturais e funcionais. As substâncias activas das plantas permitem alterar a estrutura fosfolipídica da membrana celular, inibindo a actividade enzimática, que por sua vez prejudica o material genético da bactéria e forma compostos tóxicos, como por exemplo, o peróxido de hidrogénio (Anónimo, 2010).

No Quadro 2.8 estão mencionados diversas especiarias e ervas que exercem efeitos inibitórios sobre determinados microrganismos.

Quadro 2.8: Especiarias e ervas com efeito inibitório no crescimento microbiano (Adaptado de: Silva, 2003; Anónimo, 2010)

Especiarias/ervas	Microrganismos
Alho	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus</i> (micotoxina), <i>Candida albicans</i>
Pimenta	<i>Aspergillus</i> (micotoxina)
Cebola	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>
Cravinho	<i>Aspergillus</i> (micotoxina)
Oregãos	<i>Aspergillus</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Salva	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Cominho	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Coentros, Oregãos e Salsa	Bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo <i>Listeria monocytogenes</i>

2.4.6. Cozedura

A cozedura é um tratamento térmico que pode permitir em muitos casos eliminar os microrganismos indesejáveis. Contudo, para não alterar as características nutricionais e organolépticas do produto deve-se controlar o binómio tempo/temperatura.

As temperaturas de cozedura não são suficientes para a destruição de esporos de alguns microrganismos.

Este processo contribui para alterar fisicamente os ingredientes, com a mudança de cor e modificações químicas (Almeida, 2009).

De acordo com Matos (2010), neste processo, a temperatura no centro térmico do produto deve atingir os 90°C. A fervura faz com que o oxigénio dissolvido se liberte.

2.4.7. Embalagens alimentares

Para retardar os processos de deterioração dos produtos cárneos utilizam-se vários métodos, baseados maioritariamente na aplicação de baixas temperaturas, às quais se podem ainda associar a modificação da atmosfera. Assim, a conservação dos produtos cárneos pode ser feita numa câmara de refrigeração a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ em que o produto alimentar pode ser embalado em atmosfera modificada (EAM), sob vácuo, com ausência de embalagem específica (granel), entre outros.

A embalagem de produtos alimentares tem como uma das funções, conservar o produto ao longo do seu período de vida-útil, de forma a prolongá-lo. Deste modo, deve manter as características físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais dos produtos alimentares. A barreira a gases, ao vapor de água e à luz são pontos determinantes e essenciais para que o produto tenha um período de vida-útil prolongado (Poças & Moreira, 2003).

Existem diversos tipos de embalagem, e uma das diferenças entre elas é a sua composição em gases, que é escolhida consoante o produto que se pretende conservar.

2.4.7.1. Embalagem em atmosfera modificada (EAM)

Neste tipo de tecnologia de embalagem expulsa-se o ar que está no interior da embalagem e introduz-se uma mistura de gases: dióxido de carbono (CO_2), oxigénio (O_2), azoto (N_2) ou uma combinação de dois gases (Toldrá, 2010).

Segundo Mota *et al.* (2009), o objectivo do método de embalagem em atmosfera modificada é reduzir o O_2 e aumentar o CO_2 , relativamente ao ar, sendo este composto por 78% de azoto e 21% de oxigénio, 0,035% de dióxido de carbono, outros gases em menor quantidade e vapor de água. A alteração dos teores de O_2 e CO_2 dentro dos limites especificados mantém a qualidade original do produto e prolonga o seu prazo de validade.

O O_2 tem como principal função manter a cor habitual do produto; o CO_2 tem uma acção bacteriostática, aumentando o período de vida útil do produto; o N_2 , é um gás inerte, não tendo efeito directo nos microrganismos e nos produtos, por isso é usado como substituinte do oxigénio,

inibindo assim a oxidação das gorduras. Além disso, permite manter a forma da embalagem, pois é um gás pouco solúvel em água e evita o colapso quando o CO₂ é dissolvido no alimento (Perez, 2003; Oliveira, 2010; Toldrá, 2010). A composição deste tipo de embalagem pode variar consoante o tipo de produto (Lund *et al.*, 2000).

Existem microrganismos mais e menos sensíveis em relação ao efeito inibitório do CO₂. Os microrganismos especialmente sensíveis à acção do CO₂ são as bactérias aeróbias psicrotróficas, como *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, entre outros e os bolores. Os microrganismos menos sensíveis à acção do CO₂ são as BAL, as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* e as leveduras (Perez, 2003).

A composição deste tipo de atmosfera pode variar consoante o tipo de produto. As composições da embalagem modificada que se costumam utilizar são de 50%CO₂/50%N₂, 70%CO₂/30%N₂ ou 80%CO₂/20%N₂ (composição da embalagem utilizada no caso em estudo). A temperaturas entre 0-2°C, o CO₂ permite manter o produto inalterado durante um prazo de validade de 14 dias (Montebello & Araujo, 2006). Também reduz e muitas vezes elimina a necessidade de utilização de conservantes químicos, proporcionando ao consumidor produtos mais "naturais" e "saudáveis".

A eliminação do oxigénio em algumas formas de EAM, leva à alteração da microbiota de deterioração, impedindo o crescimento de aeróbios estritos e retardando o crescimento de anaeróbios facultativos (Lund *et al.*, 2000).

O controlo da temperatura é essencial para a eficácia de EAM, pois a função do CO₂ é bem sucedida quando a temperatura é baixa (Lund *et al.*, 2000).

Lopes *et al.* (2004) concluíram que, sob o ponto de vista microbiológico, as embalagens enriquecidas com CO₂ demonstraram ser o melhor método de conservação.

O CO₂ é bastante eficaz contra as bactérias Gram-negativas, ao contrário das bactérias Gram-positivas em que o seu efeito é menor (Santos *et al.*, 2005).

A utilização de EAM para a conservação dos alimentos aumenta substancialmente o tempo de vida útil do produto alimentar, juntamente com a refrigeração. Isto pode ser devido ao efeito bacteriostático do dióxido de carbono sobre os microrganismos existentes na fase aquosa dos alimentos (Pestana, 2007). Segundo Perez (2003), a tecnologia de embalagem em atmosfera modificada melhora a qualidade do produto final.

Esta tecnologia tem sido bem sucedida, pois favorece a qualidade e frescura do produto mais tempo antes de este ser comercializado (Gava *et al.*, 2008).

Contudo, para a utilização de EAM, é necessário equipamento especializado, de elevado custo e operadores qualificados. Devido a esses factores os produtos embalados sob atmosfera modificada serão mais caros para os consumidores. Outra desvantagem deste tipo de embalagem é o seu volume (Han, 2005).

2.4.7.2. Embalagem a vácuo

A tecnologia de embalagem a vácuo pode ser considerada um tipo de embalagem em atmosfera modificada (Perez, 2003) e tem sido cada vez mais utilizada nos últimos anos, dado que garante o aumento do tempo de vida útil do alimento, bem como a sua qualidade (Man & Jones, 2000).

Esta tecnologia surgiu sobretudo para que os alimentos prontos-a-comer mantenham a sua qualidade por muito mais tempo (Man & Jones, 2000).

É o método de embalagem mais utilizado para o armazenamento e distribuição de grandes peças de carne. Não é adequado para produtos moles pois faz com que o produto sofra uma deformação irreversível (Paine & Paine, 1992).

A EV exige materiais adequados para a conservação de produtos alimentares, sendo por isso conhecida pela sua resistência a gases e ao vapor de água e pela sua resistência mecânica (Paine & Paine, 1992).

A embalagem é um filme de baixa permeabilidade ao oxigénio. As condições de vácuo são correctas quando o nível de oxigénio é reduzido para menos de 1%. As propriedades de barreira do filme utilizado restringe a entrada de oxigénio (Blakistone, 1999). A quantidade residual que fica no interior da embalagem é rapidamente consumido devido à actividade microbiana e à respiração muscular. O oxigénio residual é transformado então em CO₂, com a formação entre 10-30% do teor em CO₂ (Perez, 2003).

De acordo com Mota *et al.* (2009), a embalagem a vácuo evita o contacto do produto com o exterior, sobretudo com o oxigénio, que favorece o crescimento de microrganismos aeróbios deteriorantes.

A remoção de oxigénio na tecnologia de embalagem a vácuo favorece o crescimento de bactérias ácido-lácticas, evitando a oxidação e permitindo o prolongamento do tempo de vida útil do produto (Toldrá, 2010).

A embalagem em vácuo (EV) prolonga a vida útil de carnes refrigeradas, mantendo o interior da embalagem deficiente em O₂. EV tem um efeito conservante pelo desenvolvimento de um ambiente anaeróbio no interior da embalagem (Toldrá, 2010).

A tecnologia de EV, além de remover o oxigénio do interior da embalagem, pode atrasar as reacções oxidativas e o crescimento de microrganismos aeróbios (Han, 2005).

3. Objectivos

Este trabalho teve como objectivo estudar a microbiota da morcela de arroz ao longo do seu prazo de validade (44 dias), com aplicação de duas tecnologias de embalagem: vácuo e EAM (80% CO₂/20% N₂), e sem tecnologia de embalagem específica (granel). E consequentemente, identificar qual a atmosfera com maior poder de conservação, sob o ponto de vista microbiológico, ao longo do prazo de validade da morcela de arroz.

4. Material e métodos

4.1. Equipamento de Laboratório

O equipamento de laboratório, descrito a seguir, encontra-se instalado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade do Algarve.

- Autoclave eléctrica (P-SELECTA, AUTESTER-E);
- Estufa para esterilização (Venticell, MMM-Medcenter);
- Estufa de incubação (incucell, MMM-Mendcenter);
- “Stomacker” (IUL – Instruments, MASTICATOR).;
- Frigoríficos (White-Westinghouse);
- Câmara de fluxo laminar (KOJAIR[®], Finland);
- Microscópio (Leica ATC 2000).

4.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura (sólidos, líquidos ou semi-sólidos), contêm todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos e são utilizados para cultivar e manter os microrganismos viáveis no laboratório, sob a forma de culturas puras.

Os meios de cultura dividem-se em meios sólidos e líquidos, com agar e sem agar, respectivamente. Ambos os meios são preparados com água desionizada, aquecidos até à dissolução e fusão dos seus componentes e posteriormente esterilizados por autoclavagem, consoante indicação do fabricante (Abelho, 2010).

Os meios podem classificar-se em:

Selectivos – meios sólidos, que favorecem o crescimento de grupos de bactérias de interesse, impedindo o crescimento de outras bactérias (Henriques, 2010).

Diferenciais – meios sólidos, que são elaborados com o objectivo de distinguir colónias de bactérias de interesse, que crescem no mesmo meio de cultura de outras bactérias com características diferentes (Nascimento, 2009).

Indicadores – meios líquidos, que servem para manifestar uma característica bioquímica, mas não para diferenciar as colónias (Henriques, 2010).

Os meios de cultura preparados neste trabalho foram sólidos, diferenciais e selectivos.

A contagem de microrganismos totais a 30°C foi feita através da utilização do meio de cultura PCA-Plate Count Agar, Merck, Germany. Este meio de cultura é não-selectivo de forma a não ocorrer qualquer tipo de inibição do crescimento de microrganismos, isto é, de forma a permitir o desenvolvimento de todos os microrganismos viáveis capazes de se multiplicarem nas condições de ensaio. Este meio apresenta substâncias nutritivas, factores de crescimento e fontes de energia que favorecem o crescimento da maior parte dos microrganismos, incluindo bactérias, bolores e leveduras (Figura 4.1)

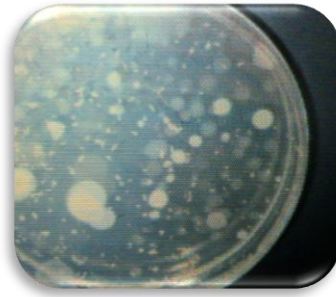


Figura 4.1:Colónias típicas de microrganismos totais a 30°C

A contagem de microrganismos psicrotróficos foi realizada através da utilização meio de cultura PCA-Plate Count Agar, Merck, Germany (Figura 4.2).



Figura 4.2:Colónias típicas de microrganismos psicrotróficos

A contagem de bactérias ácido-lácticas foi feita através da utilização do meio MRS-Man, Rogosa and Sharpe, Merck, Germany. MRS foi projectado para estimular o crescimento das bactérias ácido-lácticas, que inclui espécies dos seguintes géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. O acetato de sódio, o sulfato de magnésio e o sulfato de manganês actuam como inibidores dos principais grupos microbianos. Estas substâncias podem ser utilizadas em diferentes concentrações e combinações, mas, inevitavelmente, um compromisso tem que ser alcançado entre selectividade e produtividade do organismo(s) procurado(s). Na Figura 4.3 estão apresentadas colónias típicas das bactérias ácido-lácticas.

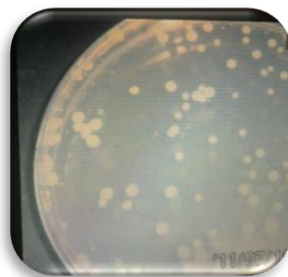


Figura 4.3:Colónias típicas de bactérias ácido-lácticas

O meio de cultura utilizado para a contagem e pesquisa de bolores e leveduras foi o meio RBC-Rose-Bengal Chloramphenicol Agar, Merck, Germany. Trata-se de um meio selectivo para a enumeração de bolores e leveduras a partir de uma ampla variedade de géneros alimentícios. RBC também controla o tamanho das colónias de fungos, como *Neurospora* e *Rhizopus spp.* A Figura 4.4 apresenta colónias típicas de bolores e leveduras.



Figura 4.4:Colónias típicas de bolores e leveduras.

Fonte: www.frilabo.pt

O meio de cultura utilizado para a contagem e pesquisa de *Bacillus cereus* foi o M.Y.P. Agar - Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar, Oxoid, UK. O meio de cultura M.Y.P. Agar é um meio selectivo devido à adição de Polimixina B, que utiliza o extracto de carne e de peptona de caseína para favorecer o crescimento deste microrganismo. O sistema de diferenciação de colónias deste meio baseia-se na capacidade que a maioria destas estirpes apresentam em produzirem fosfolipase C e não utilizarem o manitol. Este meio inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas (www.oxoid.com). As colónias típicas de *Bacillus cereus* são de cor rosa avermelhado, com um halo à volta da colónia. A Figura 4.5 apresenta uma colónia típica de *Bacillus cereus*.

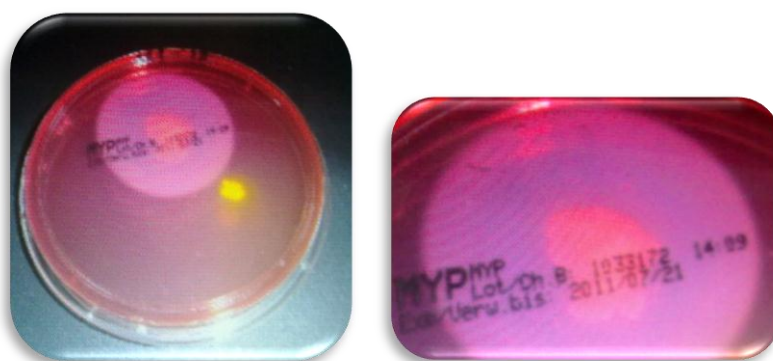


Figura 4.5:Colónia típica de *Bacillus cereus*

O meio de cultura T.S.C. Agar - Tryptone Sulfite Cycloserine Agar, Oxoid, UK foi utilizado na contagem de *C. perfringens*. A presença de sulfito de sódio neste meio selectivo permite aos microrganismos redutores de sulfito, reduzi-lo a sulfureto, que ao reagir com citrato de ferro forma sulfureto de ferro,

levando ao desenvolvimento de colónias negras. Este meio contém D-Cicloserina, que tem efeito inibidor de crescimento(Lacaz - Ruiz, 2008).

Além do meio T.S.C., também se utilizou agar para criar condições de anaerobiose, através de uma camada colocada após inoculação do meio T.S.C. O agar é um polissacárido complexo produzido a partir de vários géneros de algas vermelhas, e tem várias propriedades que o tornam um agente solidificante ideal: fica transparente no ponto de ebulição da água; não é um nutriente para a maior parte dos microrganismos ; alguns microrganismos degradam o agar de forma enzimática, sendo uma característica importante para o diagnóstico diferencial dos microrganismos (Lacaz - Ruiz, 2008).

Na Figura 4.6 estão representadas colónias típicas de *Clostridium perfringens*.

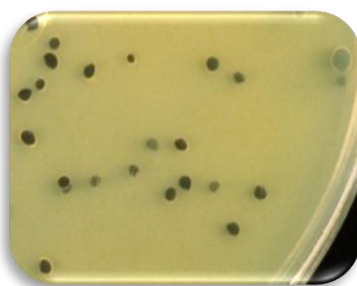


Figura 4.6:Colónias típicas de *Clostridium perfringens*

Fonte: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/995h27.php>

Para a contagem de *Enterobacteriaceae* utilizou-se o meio de cultura sólido VRBD agar- *Violet Red Bile D-Glucose Agar*, Merck, Germany. A presença no meio de sais biliares e cristal violeta inibe as bactérias Gram-positivas e algumas bactérias Gram-negativas (García-Rodríguez & Picazo, 1999). A fermentação da glucose é detectada pela viragem do indicador de pH, de vermelho neutro para rosa intenso (Figura 4.7).

Além da utilização do meio VRBD, também se utilizou o meio Agar, que cobriu o inóculo, com o objectivo de tornar o meio anaeróbio.



Figura 4.7: Colónias típicas de *Enterobacteriaceae*

4.3. Reagentes

As pastilhas de Ringer (Oxoid, UK) permitem preparar uma solução osmoticamente controlada a ser usada em suspensões e diluições de amostras de alimentos para contagens microbianas.

Foram necessários reagentes para as análises bioquímicas. Para a coloração de Gram foram utilizados a safranina, soluto de lugol, álcool (96%) e cristal violeta. Para a prova da catalase recorreu-se à água oxigenada a 3%. Para a identificação bacteriana através do sistema API 20E, utilizou-se os reagentes VP 1 e 2, reagente do Indole, conforme recomendado pelo fabricante (BioMerieux, France).

4.4. Análises Microbiológicas

Numa análise microbiológica a alimentos é essencial que não ocorra contaminação das amostras por microrganismos presentes no ambiente. Além disso, é importante assegurar que as regras gerais utilizadas na execução destes ensaios sejam o mais idêntico possível em todos os laboratórios, ajudando assim a obter resultados comparáveis. Deste modo foram respeitadas as regras de Boas Práticas de Laboratório.

A análise microbiológica das amostras foi realizada em dois lotes. Cada um dos lotes sofreu um processo de amostragem com a duração de 44 dias, o que corresponde ao prazo de validade da morcela de arroz. Para cada dia de amostragem, foram analisadas três amostras para cada tipo de atmosfera, excepto no dia 1, em que se analisaram três amostras apenas para a situação a granel. Foram analisadas 48 amostras de morcela de arroz por cada lote estudado.

4.4.1. Preparação das amostras

Vinte e cinco gramas de cada morcela foram retiradas em três zonas (pontas e meio) e suspenderam-se em 225 ml de soluto Ringer (Merck). A suspensão obtida foi homogeneizada no “Stomacker” (IUL – Instruments, MASTICATOR) durante 90 segundos.

4.4.2. Preparação de diluições

Partindo da suspensão mãe - diluição 10^{-1} , retirou-se 1 ml e adicionou-se ao 1º tubo que continha 9ml de Solução de Ringer (SR) e homogeneizou-se no agitador de tubos (“Vortex” –Gravimeta, Yellowline TTS). O 1º tubo tem uma diluição de 10^{-2} . Partiu-se do 1º tubo e repetiu-se o mesmo procedimento até se obter a diluição que se pretende para cada microrganismo.

4.4.3. Contagem de microrganismos totais a 30°C e psicrotróficos

As técnicas e métodos para as contagens de microrganismos totais a 30°C e psicrotróficos foram realizados segundo as NP-4405:2002 e NP-2307:1987, respectivamente.

A técnica de inoculação utilizada para a contagem de microrganismos totais a 30°C e psicrotróficos foi a de incorporação simples. Retirou-se 1ml da suspensão-mãe (diluição 10^{-1}) e distribuiu-se nas placas de Petri esterilizadas e identificadas como a diluição 10^{-1} . No caso de uma diluição 10^{-2} , retirou-se 1 ml do tubo, que continha 9 ml de solução de Ringer e 1ml da amostra diluída (10^{-1}) e adicionou-se à placa identificada com a diluição 10^{-2} . Fez-se o mesmo procedimento para as diluições seguintes, sendo que cada diluição foi realizada em triplicado. Após essa adição, juntou-se 15-17ml de meio PCA (Merck, Germany) ao inóculo. No final, agitou-se: cinco círculos no sentido dos ponteiros do relógio, outros cinco em sentido contrário e movimentos rectilíneos segundo duas direcções cruzadas, cinco vezes cada. As placas preparadas para a contagem de microrganismos totais a 30°C foram invertidas e incubadas a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 72 horas. Em relação às placas para a contagem de psicrotróficos, foram invertidas e incubadas a $6,5^{\circ}\text{C}$, durante 10 dias. Após o período de incubação, seleccionou-se as placas de acordo com as regras da norma NP-4405:2002, relativa aos microrganismos totais a 30°C e NP-2307:1987, relativa aos psicrotróficos. No processo de contagem em placa foram consideradas todas as colónias presentes, independentemente da sua morfologia. O número total de microrganismos obteve-se multiplicando o número de colónias pelo factor de diluição.

4.4.4. Contagem de bactérias ácido-lácticas

As regras gerais para a contagem de bactérias ácido-lácticas (BAL) foram cumpridas de acordo com a norma ISO 15214:1998.

O espalhamento à superfície foi a técnica de inoculação utilizada para a contagem de BAL. Retirou-se 100 µl directamente do saco no qual estava a suspensão-mãe (10^{-1}) e colocou-se sobre o meio MRS sólido (Merck, Germany). Para a inoculação da diluição 10^{-2} , retirou-se 100 µl do tubo que continha a diluição 10^{-2} e adicionou-se ao meio sólido. De seguida, fez-se um espalhamento à superfície, de forma circular, com esferas estéreis em todas as placas previamente identificadas. Fez-se triplicados para cada diluição. As placas foram arrefecidas em superfície fria e de seguida invertidas e incubadas durante 2-3 dias a 30°C. Depois do período de incubação, as unidades formadoras de colónias por placa foram contadas de acordo com a norma ISO 15214:1998. O número total de bactérias obtém-se multiplicando o número de colónias pelo factor de diluição e por 10, pois o inóculo foi de 100 µl da suspensão inicial.

4.4.5. Contagem de bolores e leveduras

As técnicas e métodos para a contagem de bolores e leveduras foram seguidas através da NP 3277-2:1987

O espalhamento à superfície foi a técnica de inoculação utilizada para a contagem de bolores e leveduras. Retirou-se 100 µl directamente do saco no qual estava a suspensão-mãe (10^{-1}) e colocou-se sobre o meio sólido CRB (Merck, Germany), preparado previamente. Os testes foram realizados em triplicado. De seguida, fez-se um espalhamento à superfície, de forma circular, com esferas estéreis em todas as placas previamente identificadas. Os meios inoculados foram arrefecidos em superfície fria e de seguida invertidos e incubados durante 72 ± 2 horas a 37 ± 1 °C. Depois do período de incubação, foram seleccionadas as placas de Petri segundo a NP3277-2:1987. O número total de microrganismos obteve-se multiplicando o número de colónias pelo factor de diluição e por 10, pois foram inoculados 100 µl da suspensão inicial.

4.4.6. Contagem de *Bacillus cereus*

Para a contagem de *Bacillus cereus* cumpriu-se as regras da norma ISO 7932:2004.

A técnica de inoculação foi a de espalhamento à superfície. Retirou-se 100 µl directamente do saco em que continha a suspensão-mãe (10^{-1}) e colocou-se sobre o meio sólido M.Y.P (Oxoid, UK). Fez-se o mesmo procedimento para as três placas de Petri com meio de cultura. De seguida, fez-se um espalhamento à superfície, de forma circular, com esferas estéreis em todas as placas previamente identificadas. Após a inoculação do meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas durante 48 horas a 30 ± 1 °C. Depois do período de incubação, foram seleccionadas as placas de acordo com a norma ISO 7932:2004. O número total de bactérias obteve-se multiplicando o número de colónias pelo factor de diluição e por 10, pois foram inoculados 100 µl da suspensão inicial.

4.4.7. Contagem de *Clostridium perfringens*

Segundo a NP-4395: 2002, a técnica recomendada de inoculação relativamente à pesquisa de *Clostridium perfringens* é a incorporação em dupla camada. Contudo, como o meio TSC-agar (Oxoid, UK) já veio preparado, utilizou-se a técnica de espalhamento à superfície, como foi explicado anteriormente, e de seguida adicionou-se agar para tornar a cultura anaeróbia. De acordo com a mesma norma, as placas inoculadas foram invertidas e incubadas durante 24 horas a 37 ± 1 °C. Depois desse período, foram seleccionadas as placas contáveis.

4.4.8. Contagem de *Enterobacteriaceae*

A técnica utilizada para a contagem de enterobactérias foi a incorporação em dupla camada, de acordo com a NP-4137:1991. É uma inoculação semelhante à da incorporação simples, diferindo apenas na adição de Agar ao meio VRBD solidificado (Merck, Germany) já contendo o inóculo. Preparou-se, no máximo, triplicados com a diluição 10^{-3} . Segundo a mesma norma, após a inoculação do meio de cultura, as placas inoculadas foram invertidas e incubadas a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Depois desse período, foram seleccionadas as placas contáveis. O número total de bactérias obteve-se multiplicando o número de colónias pelo factor de diluição. A confirmação bioquímica foi efectuada recorrendo às galerias miniaturizadas API 20E (bioMérieux), interpretadas segundo o descrito pelo fabricante.

4.4.9. Quadro-Resumo de técnicas e métodos para a contagem de microrganismos

Quadro 4.1: Quadro-Resumo de técnicas e métodos para isolamento e contagem de microrganismos

Parâmetros microbiológicos	Meio de cultura	Diluições estudadas	Técnica inoculação	Temp./Tempo de Incubação	Referências
Microrg. totais	PCA	10 ⁻¹ -10 ⁻⁵	a	30±1°C/72h	NP-4405:2002
Psicrotróficos	PCA	10 ⁻¹ -10 ⁻⁵	a	6,5°C/10d	NP-2307:1987
Bact. ácido-lácticas	MRS	10 ⁻¹ -10 ⁻²	b	30°C/2-3d	ISO 15214:1998
Bolores e Leveduras	CRB	10 ⁻¹	b	37°C±1°C /72±2h	NP 3277-2:1987
<i>Bacillus cereus</i>	MYP	10 ⁻¹	b	30°C±1°C/48h	ISO 7932:2004
<i>Clostridium perfringens</i>	TSC-Agar	10 ⁻¹	b	37°C±1/24h	NP-4395:2002
<i>Enterococcus</i>	VRBD	10 ⁻¹ -10 ⁻³	c	37°C±1/24h	NP-4137:1991

a-incorporação simples; b-espalhamento à superfície; c-incorporação em camada dupla.

4.5. Análises bioquímicas de bactérias

Depois da contagem de bactérias, recorreu-se a várias análises bioquímicas para confirmar o tipo de bactéria que se observou. A seguir serão descritas as análises bioquímicas que se recorreu.

4.5.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é utilizada para a identificação/diferenciação de bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas. As células de bactérias Gram-negativas, que são coradas com determinados corantes básicos, podem ser facilmente descoradas com solventes orgânicos (etanol, acetona), enquanto que células das espécies Gram-positivas resistem a esta descoloração. A capacidade das células reterem ou perderem o corante demonstra diferenças na estrutura fundamental da parede celular, pelo que a resposta à coloração de Gram é uma característica taxonómica importante, usada numa fase inicial da identificação das bactérias (Abelho, 2010). As bactérias Gram-positivas distinguem-se das Gram-negativas microscopicamente pela diferença de cor, sendo as primeiras roxas e as segundas rosa.

A coloração de Gram foi aplicada na confirmação de bactérias lácticas, *Bacillus cereus* e *Enterobacteriaceae*, sendo identificado o género da última através do sistema API 20E, referido de seguida.

4.5.2. Prova da catalase

Esta prova tem como objectivo detectar a produção de catalase em bactérias, e consequentemente diferenciar estafilococos de estreptococos.

Algumas bactérias contêm flavoproteínas com capacidade de reduzir o O₂, dando origem ao peróxido de hidrogénio ou superóxido. As bactérias terão de se proteger destas substâncias pois estas são bastante tóxicas, constituindo poderosos agentes oxidantes. Deste modo, as bactérias têm enzimas que as protegem contra estas substâncias (Pampulha & Oliveira, 2004).

Na prova da catalase repica-se uma colónia e coloca-se numa lâmina. De seguida adiciona-se uma gota de H₂O₂ (peróxido de hidrogénio) sobre a colónia. Se a catalase estiver presente observa-se a formação de bolhas, ou seja, libertação de O₂. A ausência de formação de bolhas revela um teste catalase negativa (Pampulha & Oliveira, 2004).

4.5.3. Sistema API 20E

O API 20E é um sistema estandardizado e comercializado (bioMérieux, France) para a identificação dos membros da família *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram negativas, sendo uma versão em miniatura dos procedimentos bioquímicos convencionais. O sistema é constituído por uma galeria que contém vinte câmaras, sendo cada uma constituída por um microtubo e uma cúpula, onde se realizam simultaneamente vinte e três testes bioquímicos estandardizados.

As galerias são incubadas 18-24h a 35-37°C. Após esse tempo de incubação, a leitura dos testes bioquímicos da galeria é feita através da observação da alteração de cor. O resultado é representado por um número de perfil com sete dígitos. Para a identificação de bactérias recorre-se a tabelas ou sistemas automatizados, fornecidos pela casa comercial (Quinn, 1994; Pampulha & Oliveira, 2004).

4.6. Análise estatística

Os resultados obtidos no presente trabalho foram submetidos a análise estatística, tendo-se calculado a média, o coeficiente de correlação e a significância através do teste T de Student. Procedeu-se a um estudo comparativo, com a utilização de médias das amostras representadas em quadros e gráficos. Para a realização da análise estatística descritiva e realização dos gráficos utilizou-se o programa Microsoft Excel 2010 e o programa SPSS Statistics, versão 18.

5. Resultados e Discussão

Nos pontos a seguir apresentam-se os resultados obtidos nas diversas análises microbiológicas efectuadas neste estudo.

Em ambos os lotes utilizou-se amostras independentes em cada dia de amostragem. Deste modo, não se pode analisar a variação ao longo do tempo por não se tratar de uma monitorização da mesma amostra.

Considerando que no único da amostragem só estavam disponíveis amostras a granel, as concentrações microbianas obtidas para a amostra do dia 1 foram consideradas os valores iniciais para as outras atmosferas.

5.1. Parâmetros microbiológicos

5.1.1. Contagem de microrganismos totais a 30°C

Através dos resultados obtidos, foram construídos os gráficos do lote1 e do lote2, relativos às concentrações de microrganismos totais a 30°C (MT) em amostras recolhidas ao longo do tempo.(Figura 5.1).

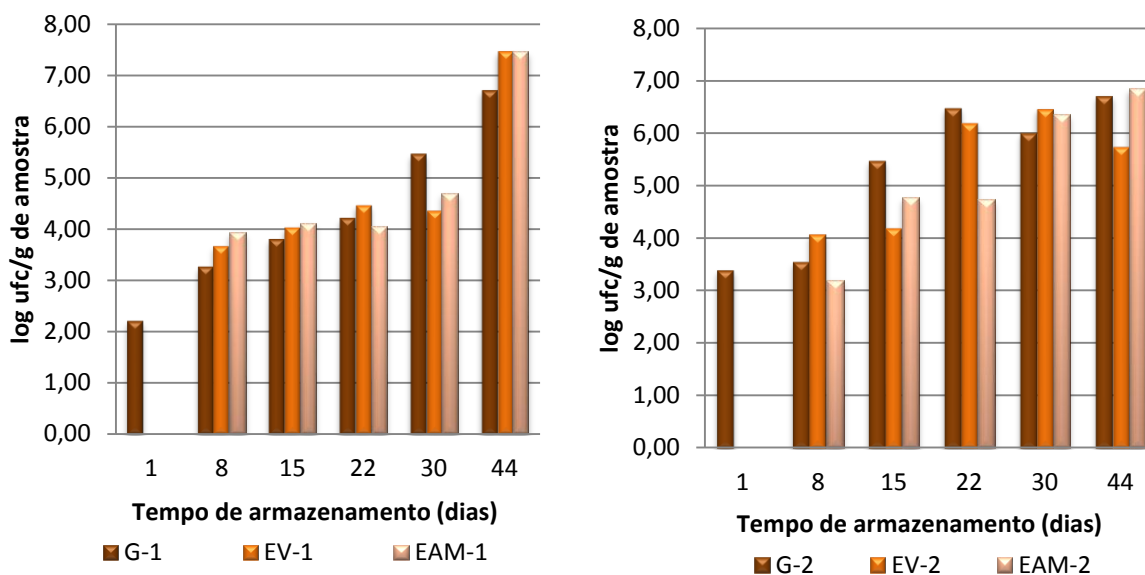


Figura 5.1: Microorganismos totais a 30°C na morcela de arroz em diferentes atmosferas (granel(G), vácuo (EV), atmosfera modificada (EAM))
1-lote1;2-lote2

Analisando os gráficos referentes à concentração de microrganismos totais a 30°C (Figura 5.1) observou-se que os dois lotes apresentaram diferentes resultados relativos às amostras de diferentes atmosferas estudadas. No lote1, registou-se concentrações semelhantes nas amostras de diferentes atmosferas (dias 8,15,22), sendo que as amostras do dia 44 apresentaram uma maior concentração de MT. No lote2, não se registou concentrações semelhantes entre as amostras de diferentes atmosferas. Quando comparado o primeiro dia em que houve isolamento com o último dia de amostragem constatou-se que as amostras de diferentes atmosferas do lote1 registaram aumentos superiores em relação às amostras do lote2.

De seguida serão apresentados as concentrações máximas e mínimas dos microrganismos totais a 30°C relativas às diferentes atmosferas. (Quadro 5.1).

Quadro 5.1: Concentrações máximas e mínimas dos microrganismos totais a 30°C nas diferentes atmosferas estudadas.

Atmosferas	Microrganismos totais a 30°C (log ufc/g)			
	Lote1		Lote2	
	máxima	mínima	máxima	mínima
Granel	6,71	2,22	6,71	3,39
Vácuo	7,48	2,22	6,46	3,39
Atmosfera modificada	7,47	2,22	6,85	3,39

Perante as concentrações máximas e mínimas de MT em diferentes atmosferas, não foi possível afirmar qual a atmosfera em que os MT apresentaram uma maior concentração.

Através dos resultados representados nos gráficos da Figura 5.1, determinou-se as correlações entre as três atmosferas, bem como a sua significância. No Quadro 5.2 estão apresentados esses valores.

Quadro 5.2: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para microrganismos totais (MT) em diferentes tipos de atmosfera

MT-1	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada	MT-2	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada
Granel	1,00	0,93**	0,90**	Granel	1,00	0,75**	0,66**
Vácuo	0,93	1,00	0,97**	Vácuo	0,86	1,00	0,88**
Atmosfera modificada	0,94	0,99	1,00	Atmosfera modificada	0,87	0,78	1,00

Nota: P =Probabilidade; P>0,05(**)

De acordo com os valores registados no Quadro 5.2, pode-se afirmar que todas as atmosferas estudadas apresentaram uma boa correlação entre si, principalmente no lote1. Por outro lado, verificou-se que todas as atmosferas não são significativamente diferentes (P>0,05).

No estudo de Santos *et al.* (2005), verificou-se que as concentrações de microrganismos totais a 30°C nas amostras a vácuo e a granel foram mais próximas entre si relativamente às concentrações da amostra embalada em atmosfera modificada, embora também não difiram significativamente entre si (P>0,05).

Para se entender a influência das atmosferas estudadas no crescimento dos microrganismos totais a 30°C, comparou-se a média dos valores obtidos nos diferentes dias de amostragem com o primeiro dia em que houve isolamento deste grupo de microrganismos. No Quadro 5.3 estão apresentados os resultados obtidos.

Quadro 5.3: Incremento dos microrganismos totais a 30°C nas diferentes atmosferas estudadas.

Parâm.microb.	ufc/g /Atmosfera/ Lote					
	Lote1			Lote2		
	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada
Microrg.totais	1,10x10 ⁶	6,01x10 ⁶	5,88x10 ⁶	1,89x10 ⁶	1,00x10 ⁶	1,88x10 ⁶

Os resultados obtidos, relativos aos dois lotes, não permitem afirmar qual o tipo de atmosfera em que o crescimento dos microrganismos totais a 30°C foi menor. No entanto, se se analisar os lotes

em separado pode-se verificar que na amostra a granel, do lote1, registou-se um menor crescimento de microrganismos totais a 30°C. Este resultado pode ser justificado pela desidratação observada nas amostras a granel, ao longo do tempo de armazenamento. Como os microrganismos totais a 30°C são um grupo heterogénio, poderão existir determinadas espécies sensíveis à diminuição da actividade de água. No lote 2, a amostra a vácuo foi a que obteve menor crescimento.

O isolamento de microrganismos totais a 30°C nas amostras embaladas em diferentes atmosferas, está relacionado com as condições de higiene ao longo do processo de fabrico, bem como ao binómio tempo/temperatura em que o produto esteve armazenado. De acordo com Baptista & Venâncio (2003), as bactérias desenvolvem-se mais facilmente em ambientes com pH neutro, sendo que a maior parte delas suportam ambientes com pH entre 4,5 a 9,0.

Dado que não foram encontrados, no presente trabalho, limites microbiológicos relativos à morcela de arroz na literatura consultada, serão aqui comparados os valores obtidos com os limites dos microrganismos aeróbios (5×10^5 ufc/g a 5×10^6 ufc/g) referentes a carnes picadas (Regulamento (CE) Nº 1441/2007). Verificou-se que todas as amostras do lote1 apresentaram concentrações de MT fora dos limites seleccionados. Por outro lado, no lote2, as amostras a granel (dias 15,22 e 30), as amostras a vácuo (dias 22,30 e 44) e na amostra em atmosfera modificada do dia 44 obtiveram-se concentrações de MT dentro dos limites considerados.

5.1.2. Contagem de psicotróficos

A partir dos resultados obtidos, foram elaborados gráficos do lote1 e do lote2, relativos às concentrações de psicotróficos em amostras recolhidas ao longo do tempo(Figura 5.2).

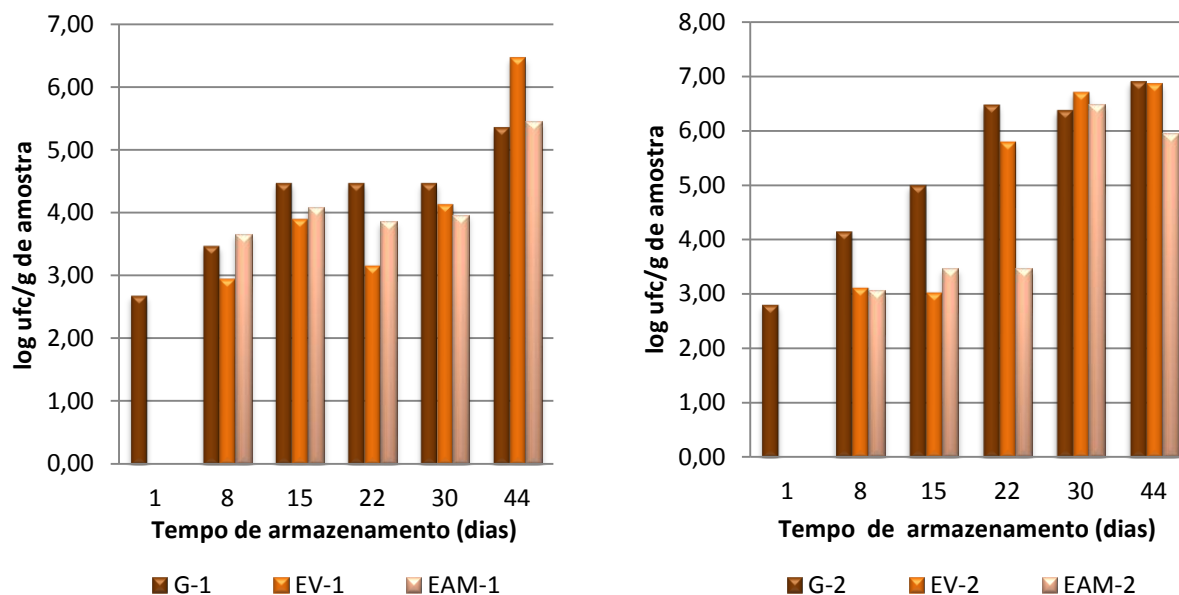


Figura 5.2: Microrganismos psicrotróficos na morcela de arroz em diferentes atmosferas (granel(G), vácuo (EV), atmosfera modificada (EAM))
1-lote1;2-lote2

Analisando os gráficos referentes à concentração de microrganismos psicrotróficos (Figura 5.2) registou-se que as três atmosferas estudadas apresentaram resultados diferentes nos dois lotes.

No lote1, as concentrações de psicrotróficos das amostra relativas às três atmosferas foram mais próximas entre si que no lote2. Em ambos os lotes não se registou concentrações $> 10^7$ ufc/g.

Quando comparado o primeiro dia em que houve isolamento de psicrotróficos com o último dia de amostragem constatou-se que na amostra a granel do lote1 o aumento foi inferior em relação à amostra a granel do lote2. Relativamente à amostra a vácuo, houve um aumento semelhante em ambos os lotes e quanto à amostra em atmosfera modificada do lote2 registou-se um aumento superior em relação à amostra em atmosfera modificada do lote1.

De seguida serão apresentados as concentrações máximas e mínimas dos microrganismos psicrotróficos relativas às diferentes atmosferas (Quadro 5.4).

Quadro 5.4: Concentrações máximas e mínimas dos psicrotróficos nas diferentes atmosferas estudadas.

Atmosferas	Psicrotróficos (log ufc/g)			
	Lote1		Lote2	
	máxima	mínima	máxima	mínima
Granel	5,36	2,68	6,91	2,80
Vácuo	4,48	2,68	6,88	2,80
Atmosfera modificada	5,96	2,68	6,50	2,80

Através dos resultados obtidos no Quadro 5.4, não é possível afirmar qual a atmosfera em que os psicrotróficos obtiveram maior concentração.

Através dos resultados representados nos gráficos da Figura 5.2, determinou-se as correlações entre as três atmosferas e a sua significância. Esses valores estão mencionados no Quadro 5.5

Quadro 5.5: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) dos psicrotróficos (Psic) para os diferentes tipos de atmosfera (lote1 e lote2)

Psic-1	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada	Psic-2	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada
Granel	1,00	0,71**	0,71**	Granel	1,00	0,60**	0,27**
Vácuo	0,83	1,00	0,93**	Vácuo	0,90	1,00	0,62**
Atmosfera modificada	0,93	0,93	1,00	Atmosfera modificada	0,74	0,86	1,00

Nota: P =Probabilidade; P>0,05(**)

De acordo com os valores registados no Quadro 5.5, pode-se afirmar que os microrganismos psicrotróficos em todas as atmosferas estudadas apresentam uma boa correlação entre si. Por outro lado, verificou-se que em todas as atmosferas, as contagens não foram significativamente diferentes (P>0,05).

Para se entender a influência das atmosferas estudadas no crescimento dos microrganismos psicrotróficos, comparou-se a média dos valores obtidos nos diferentes dias de amostragem com o primeiro dia em que se observou crescimento deste grupo de microrganismos. No Quadro 5.6 estão apresentados os resultados obtidos.

Quadro 5.6: Incremento dos psicrotróficos nas diferentes atmosferas estudadas.

Parâm.microb	ufc/g /Atmosfera/Lote					
	Lote1			Lote2		
	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada
Psicrotróficos	$6,39 \times 10^4$	$6,04 \times 10^5$	$6,44 \times 10^4$	$2,71 \times 10^6$	$2,68 \times 10^6$	$8,03 \times 10^5$

Ao se comparar os resultados obtidos nas diferentes atmosferas, em ambos os lotes, não é possível verificar qual o tipo de atmosfera em que o crescimento dos microrganismos psicrotróficos é menor. Mas se se analisar os lotes em separado, pode-se verificar que na amostra a granel obteve-se menor crescimento no lote1 e maior crescimento no lote2. Os diferentes resultados podem ser justificados pelo facto dos lotes e das amostras serem independentes entre si.

Comparando estes resultados com os do estudo de Perez (2003) relativamente ao fiambre cozido embalado a vácuo, pode-se verificar que o fiambre, armazenado a temperaturas compreendidas entre 2,3-6,5 °C, obteve concentrações de psicrotróficos entre 7,00-8,00 log ufc/g, ao fim de 35 dias de armazenamento, enquanto que a morcela analisada no presente estudo, obteve valores <7,00 log ufc/g, em ambos os lotes, ao fim de 44 dias de armazenamento a $\pm 4^\circ\text{C}$.

A concentração de microrganismos psicrotróficos no produto cárneo estudado, está relacionado com as condições de higiene ao longo do processo de fabrico e com o binómio tempo/temperatura de armazenamento do mesmo.

Ao se comparar os valores obtidos com os limites microbiológicos (5×10^5 ufc/g e 5×10^6 ufc/g) dos microrganismos aeróbios referentes a carnes picadas (Regulamento (CE) Nº 1441/2007), observa-se que apenas a amostra em atmosfera modificada do dia 44 obteve concentrações de microrganismos aeróbios pertencentes ao grupo dos psicrotróficos dentro dos limites estabelecidos. No lote2, verifica-se que as amostras a granel dos dias 22 e 30, a amostra a vácuo do dia 22 e as amostras em atmosfera modificada dos dias 30 e 44 obtiveram concentrações dentro dos limites estabelecidos.

5.1.3. Contagem de bactérias ácido-lácticas

Através dos resultados obtidos, foram construídos gráficos do lote1 e do lote2, relativos às concentrações de bactérias ácido-lácticas (BAL) em amostras recolhidas ao longo do tempo (Figura 5.3).

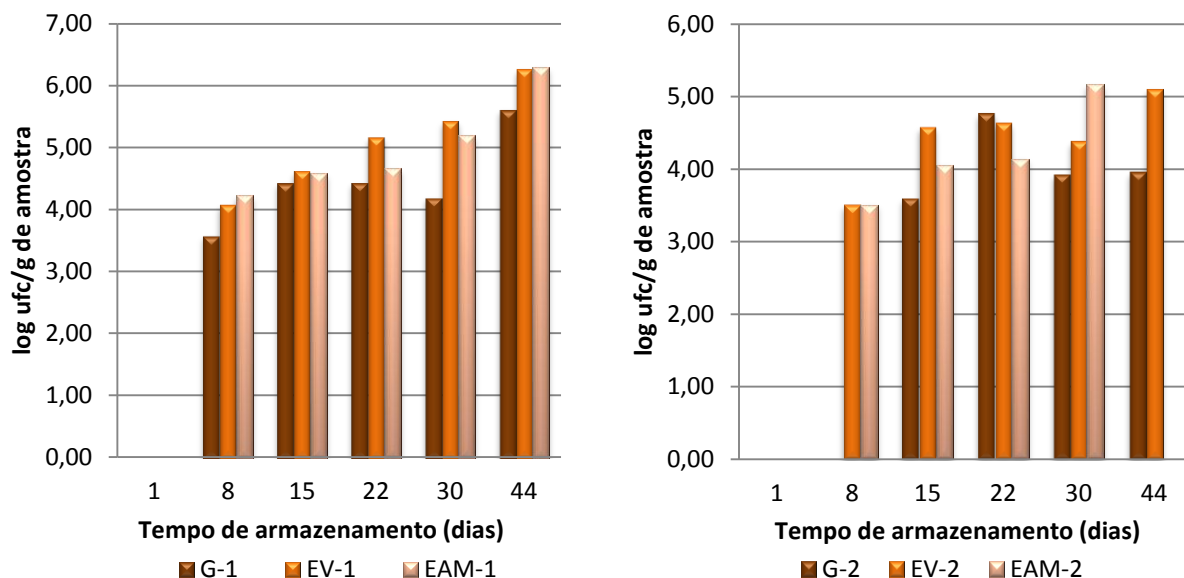


Figura 5.3: Bactérias ácido-lácticas na morcela de arroz em diferentes atmosferas (granel(G), vácuo (EV), atmosfera modificada (EAM))
1-lote1;2-lote2

Analisando os gráficos da Figura 5.3, verificou-se que não foi possível isolar colônias relativas a bactérias ácido-lácticas em amostra a granel do dia 1 (lote1) e em amostras a granel dos dias 1 e 8 (lote2). Este resultado poderá ser explicado pela baixa concentração de BAL no início do processo de armazenamento (dia1). Tratando-se de um alimento sólido, a amostra mais concentrada corresponde a uma diluição de 1/10. Por outro lado, as BAL também não foram isoladas no último dia de amostragem do lote2. Este resultado é aceitável considerando que as amostras estudadas são independentes. Caso se tivesse analisado a mesma amostra em todos os dias de amostragem, provavelmente as BAL mostrariam uma tendência crescente ao longo do tempo de armazenamento, sendo a amostra em atmosfera modificada um ambiente propício ao crescimento das mesmas.

Este grupo de bactérias foi isolado nas amostras a granel pois, apesar de serem anaeróbias facultativas, toleram pequenas quantidades de oxigênio (Felipe, 2008).

No lote1, obteve-se concentrações superiores ao lote2. De seguida serão apresentados as concentrações máximas e mínimas de bactérias ácido-lácticas nas diferentes atmosferas (Quadro 5.7).

Quadro 5.7: Concentrações máximas e mínimas das bactérias ácido-lácticas nas diferentes atmosferas estudadas.

Atmosferas	Bactérias ácido-lácticas (log ufc/g)			
	Lote1		Lote2	
	máxima	mínima	máxima	mínima
Granel	5,61	3,58	4,77	3,60
Vácuo	6,26	4,08	5,09	3,51
Atmosfera modificada	6,30	4,23	6,17	3,51

De acordo com os resultados do Quadro 5.7, foi possível verificar que as bactérias ácido-lácticas apresentaram maior concentração nas amostras em atmosfera modificada, em ambos os lotes. Este resultado pode ser justificado pelo facto das BAL serem um dos microrganismos menos sensíveis à acção do CO₂ (Perez, 2003).

Apesar de se observar isolamentos de BAL nas amostras a granel, as concentrações de BAL são menores em relação às amostras embaladas a vácuo e em atmosfera modificada pois apenas toleram pequenas quantidade de oxigénio (Saraiva, 2008).

Através dos resultados obtidos, determinou-se as correlações entre as três atmosferas e a sua significância. Esses valores estão mencionados no Quadro 5.8.

Quadro 5.8: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) das bactérias ácido-lácticas (BAL) para os diferentes tipos de atmosfera (lote1 e lote2)

BAL-1	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada	BAL-2	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada
Granel	1,00	0,22**	0,30**	Granel	1,00	0,21**	0,92**
Vácuo	0,90	1,00	0,82**	Vácuo	0,21	1,00	0,28**
Atmosfera modificada	0,99	0,95	1,00	Atmosfera modificada	0,92	0,28	1,00

Nota: P =Probabilidade; P >0,05(**)

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 5.8, verifica-se que a correlação entre as diferentes atmosferas foi melhor no lote1 que no lote2. Em ambos os lotes não houve diferenças significativas (P>0,05).

Para se verificar qual o tipo de atmosfera em que o crescimento das BAL foi menor, comparou-se a média dos valores obtidos nos diferentes dias de amostragem com o primeiro dia em que se observou crescimento deste grupo bactérias. No Quadro 5.9 estão mencionados os resultados obtidos.

Quadro 5.9: Incremento das bactérias ácido-lácticas nas diferentes atmosferas estudadas

Parâm. microb.	ufc/g/Atmosfera/Lote					
	Lote1			Lote2		
	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada
Bact. ácido-lácticas	$1,16 \times 10^5$	$5,59 \times 10^5$	$5,39 \times 10^5$	$2,14 \times 10^4$	$2,45 \times 10^3$	$4,01 \times 10^4$

Através dos diferentes resultados obtidos nos dois lotes (Quadro 5.9), não se pode afirmar qual o tipo de atmosfera em que o crescimento das BAL é menor. No lote1, o crescimento das BAL foi menor na amostra a granel ao longo do tempo de armazenamento, enquanto que no lote2, o crescimento das BAL foi menor na amostra mantida a vácuo durante 44 dias de conservação. Estes resultados vão de encontro à afirmação de Almeida (2009), em que os valores das contagens de bactérias ácido-lácticas podem ser bastante variáveis.

Segundo Santos *et al.* (2005), as bactérias ácido-lácticas contribuem activamente na deterioração da morcela de Burgos, sendo consideradas como o principal grupo microbiano deteriorante, ocorrendo principalmente no produto embalado a vácuo e em atmosfera modificada. No entanto, segundo Saraiva (2008), podem inibir o crescimento dos seus competidores.

5.1.4. Contagem de bolores e leveduras

Conforme os resultados obtidos, foi elaborado apenas um gráfico (Figura 5.4) correspondente ao lote1, pois apesar de bolores e leveduras terem sido isolados nas amostras a granel, em ambos os lotes, apenas no lote1 foram obtidas concentrações dentro do intervalo óptimo de contagem (NP 3277-2:1987)

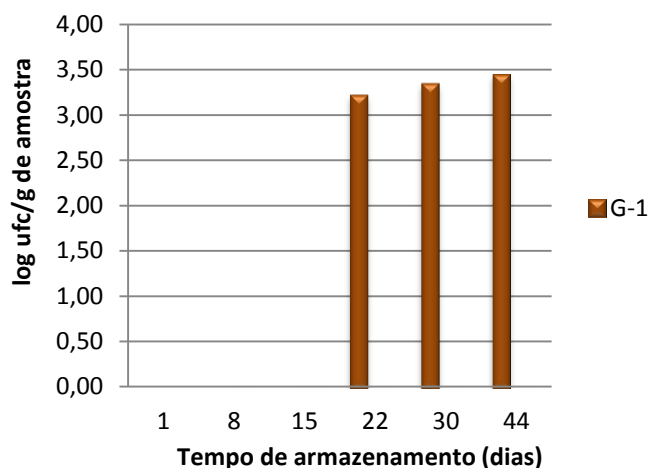


Figura 5.4: Bolores e leveduras na morcela de arroz a granel (G)
1-lote1

Através dos resultados apresentados na Figura 5.4, pode-se verificar que as amostras a granel foram as que favoreceram o crescimento de bolores e leveduras. Este resultado pode ser justificado pelo facto deste grupo de microrganismos estar integrado e encontrar-se em concentrações muito baixas no início da amostragem

No estudo de Santos *et al.* (2005), bolores e leveduras foram isolados no produto a vácuo e a granel, sendo que no produto a granel obtiveram concentrações 7,00 log ufc/g e no produto a vácuo apresentaram concentrações 3,00 log ufc/g. No produto a granel, analisado no presente estudo, foi registado concentrações < 3,50 log ufc/g. Através destes resultados, pode-se afirmar que a morcela de arroz analisada no presente estudo obteve concentrações de bolores e leveduras inferiores ao produto estudado por Santos *et al.* (2005).

Tratando-se de microrganismos que se encontram no ambiente sob a forma de esporos, o seu isolamento pode ser devido à falta de condições de higiene ao longo do processamento do produto cárneo cozido. Além disso, os bolores são estritamente aeróbios e as leveduras são aeróbias e anaeróbias facultativas (Gava, 1984; Gava *et al.*, 2008). O isolamento de bolores e leveduras na morcela de arroz pode ser também devido ao facto destes grupo microbiano conseguir desenvolver-se em ambientes com pH entre 2,5 a 9,5 (Baptista & Venâncio, 2003), estando os valores de pH da morcela de arroz incluídos nesse intervalo. (Silva, 2003).

5.1.5. Contagem de *Bacillus cereus*

Segundo os resultados obtidos, bactérias da espécie *Bacillus cereus* foram apenas detectadas no lote2. (Figura 5.5).

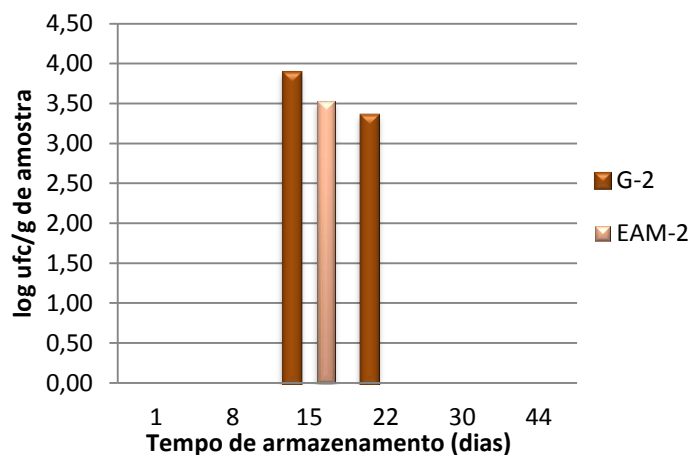


Figura 5.5: *Bacillus cereus* na morcela de arroz a granel (G) e em atmosfera modificada (EAM) 2-lote2

Através dos resultados representados na Figura 5.5, é possível verificar que *Bacillus cereus* foi isolado na amostra a granel e na amostra em atmosfera modificada. É de mencionar que no dia 44 houve isolamento de *B. cereus*, $<2,18 \log \text{ ufc/g}$, que de acordo com a ISO 7932:2004, não foi contabilizado por estar abaixo do intervalo óptimo de contagem. Na amostra a granel obteve-se concentrações de *B. cereus* próximas de 10^4 ufc/g .

O isolamento de *Bacillus cereus* nas amostras a granel e em atmosfera modificada, poderá ser devido, principalmente, à sua presença, sob a forma de esporos, no arroz cru (Anderson & Pascual, 2000; Martinelli, 2007). Segundo ICMSF (1996), os cereais são os produtos alimentares utilizados na maioria dos estudos em que a espécie *B.cereus* incide. Como o produto em estudo é submetido apenas a uma pasteurização, poderá o binómio tempo/temperatura não ser suficiente para inactivar os esporos de *Bacillus cereus*, visto que apenas são destruídos a temperaturas superiores a 100°C (Pampulha & Oliveira, 2004). Além disso, a não lavagem do arroz antes da sua cozedura também poderá aumentar a probabilidade de isolamento dos esporos.. Outro aspecto importante são as condições de aquecimento/arrefecimento (Silva, 2003).

O crescimento de *B. cereus* foi maior na amostra a granel pois trata-se de uma bactérias aeróbia facultativa. A atmosfera constituída por O_2 , além de ser responsável pela rancificação do produto, é também um factor que contribui para o crescimento de bactérias patogénicas.

Em ambas as atmosferas, obtiveram-se concentrações $>10^3$ ufc/g. Estas concentrações não ultrapassaram os valores considerados como passíveis de provocar doença no Homem, por Anderson & Pascual (2000). Estes autores consideram que o alimento só poderá constituir um risco para o consumidor quando *Bacillus cereus* atingir valores próximos e acima de 10^6 ufc/g.

5.1.6. Contagem de *Clostridium perfringens*

Nas análises microrbiológicas realizadas em amostras de morcela de arroz, não se observou a presença de *Clostridium perfringens* em nenhuma amostra analisada.

5.1.7. Contagem de *Enterobacteriaceae*

Neste estudo efectuou-se a contagem de *Enterobacteriaceae* bem como a identificação da bactéria do género *Serratia*, através da galeria do sistema API 20E.

Conforme os resultados obtidos, foram elaborados gráficos do lote1 e do lote2, relativos às diferentes concentrações de *Enterobacteriaceae* ao longo do tempo de armazenamento (Figura 5.6).

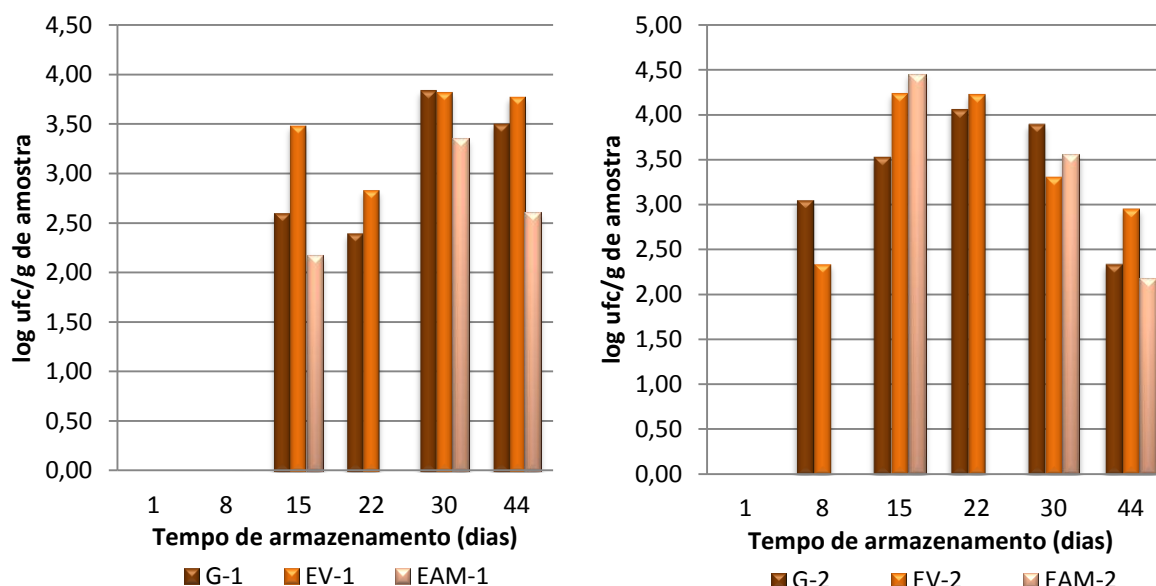


Figura 5.6: *Enterobacteriaceae* em morcela de arroz em diferentes atmosferas (granel (G); vácuo (EV); atmosfera modificada) 1-lote1; 2-lote2

Através dos resultados apresentados nos gráficos da Figura 5.6, observou-se, no geral, que as enterobactérias obtiveram maiores concentrações nas amostra do lote2 que nas amostra do lote1.

Também se observou que não houve isolamento de enterobactérias nos dias 1 e 8, em ambos os lotes, que já foi justificado no ponto 5.1.3. O isolamento deste grupo de bactérias ocorreu em menos dias de amostragem nas amostra em atmosfera modificada que nas restantes.

De seguida serão apresentados as concentrações máximas e mínimas de *Enterobacteriaceae* relativas às diferentes atmosferas. (Quadro 5.10).

Quadro 5.10: Concentrações máximas e mínimas de *Enterobacteriaceae* nas diferentes atmosferas estudadas.

Atmosferas	<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/g)			
	Lote1		Lote2	
	máxima	mínima	máxima	mínima
Granel	3,84	2,40	4,06	3,05
Vácuo	3,83	2,83	4,24	2,34
Atmosfera modificada	3,35	2,18	4,46	2,18

Conforme os resultados obtidos no Quadro 5.10, não é possível afirmar qual o tipo de atmosfera em que as enterobactérias obtêm maiores concentrações.

Através dos resultados obtidos, determinou-se as correlações entre as três atmosferas e a sua significância. Esses valores estão mencionados no Quadro 5.11.

Quadro 5.11: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) de *Enterobacteriaceae* (Ent) para os diferentes tipos de atmosfera (lote1 e lote2)

Ent-1	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada	Ent-2	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada
Granel	1,00	0,76**	0,41**	Granel	1,00	0,95**	0,20**
Vácuo	0,97	1,00	0,28**	Vácuo	0,63	1,00	0,20**
Atmosfera modificada	0,82	0,77	1,00	Atmosfera modificada	0,05	0,34	1,00

Nota: P =Probabilidade; P >0,05(**)

De acordo com os resultados registados no Quadro 5.11, observa-se que no lote1 obteve-se melhores correlações entre os três tipos de atmosfera que no lote2, no qual não se obteve uma boa correlação entre a amostra a granel e a amostra em atmosfera modificada. Em ambos os lotes, não se registaram diferenças significativas (P>0,05).

Em todas as atmosferas, as concentrações das enterobactérias foram > 2,00 log ufc/g, o que significa que ultrapassaram o limite microbiológico para produtos cárneos cozidos, sugerido por Anderson &

Pascual (2000). Ao se comparar os resultados obtidos nos estudo sobre a caracterização microbiológica da alheira (Ferreira *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007) verifica-se que na alheira se obteve concentrações de enterobactérias superiores ($> 7,5 \log \text{ufc/g}$) aos obtidos na morcela de arroz analisada no presente estudo.

Para se entender a influência das atmosferas estudadas no crescimento de *Enterobacteriaceae*, comparou-se a média dos valores obtidos nos diferentes dias de amostragem com o primeiro dia em que as enterobactérias foram isoladas. Os resultados obtidos estão apresentados no Quadro 5.12.

Quadro 5.12: Incremento de *Enterobacteriaceae* nas diferentes atmosferas estudadas.

Parâm.microb.	ufc/g/Atmosfera/Lote					
	Lote1			Lote2		
	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada	Granel	Vácuo	Atmosfera modificada
<i>Enterobacteriaceae</i>	$3,30 \times 10^3$	$1,36 \times 10^3$	$7,33 \times 10^2$	$4,66 \times 10^3$	$8,99 \times 10^3$	$-2,74 \times 10^4$

Através dos resultados apresentados no Quadro 5.12, pode-se afirmar que a embalagem em atmosfera modificada foi aquela onde se registou menor crescimento (lote1) e um decréscimo de *Enterobacteriaceae* (lote2).

As maiores concentrações de enterobactérias foram observadas na amostra a vácuo e na amostra a granel. A maior redução observada nas amostra embalada em atmosfera modificada, poderá ser devido ao facto deste grupo ser aeróbio e anaeróbio facultativo (Murray *et al.*, 2005).

Segundo Felipe (2008), a maior parte destas bactérias, patogénicas ou não, causam deterioração em carnes refrigeradas embaladas a vácuo, por serem mesófilos com características psicrotróficas e anaeróbios facultativos.

O isolamento de *Enterobacteriaceae* no produto cárneo cozido estudado, deve-se à falta de higiene durante a sua manipulação após o tratamento térmico, pois o processo de pasteurização é suficiente para eliminar este tipo de bactérias prejudiciais ao consumidor. Pode ocorrer contaminação cruzada que, segundo Silva (2003), os condimentos e aditivos podem estar contaminados devido ao incorrecto acondicionamento durante o transporte, ao contacto com produtos contaminados ou devido ao local húmido de armazenamento. No entanto, considerando o tratamento térmico sofrido pela morcela de arroz, esses microrganismos contaminantes seriam destruídos por acção da temperatura elevada. Segundo Saraiva (2008), como as enterobactérias são ubiqúitárias, podem ser

encontradas no pêlo e tracto digestivo do animal, sendo por isso indicadoras de possível contaminação fecal, processamento inadequado ou contaminação após o processamento.

Quanto às bactérias aeróbias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, não se observou concentrações dentro dos limites microbiológicos (5×10^5 ufc/g a 5×10^6 ufc/g) estabelecidos para carnes picadas (Regulamento (CE) Nº 1441/2007).

5.2. Análise comparativa entre os parâmetros microbiológicos e as atmosferas estudadas

De seguida irá comparar-se as concentrações dos diferentes microrganismos estudados em cada atmosfera.

5.2.1. Produto embalado em atmosfera modificada

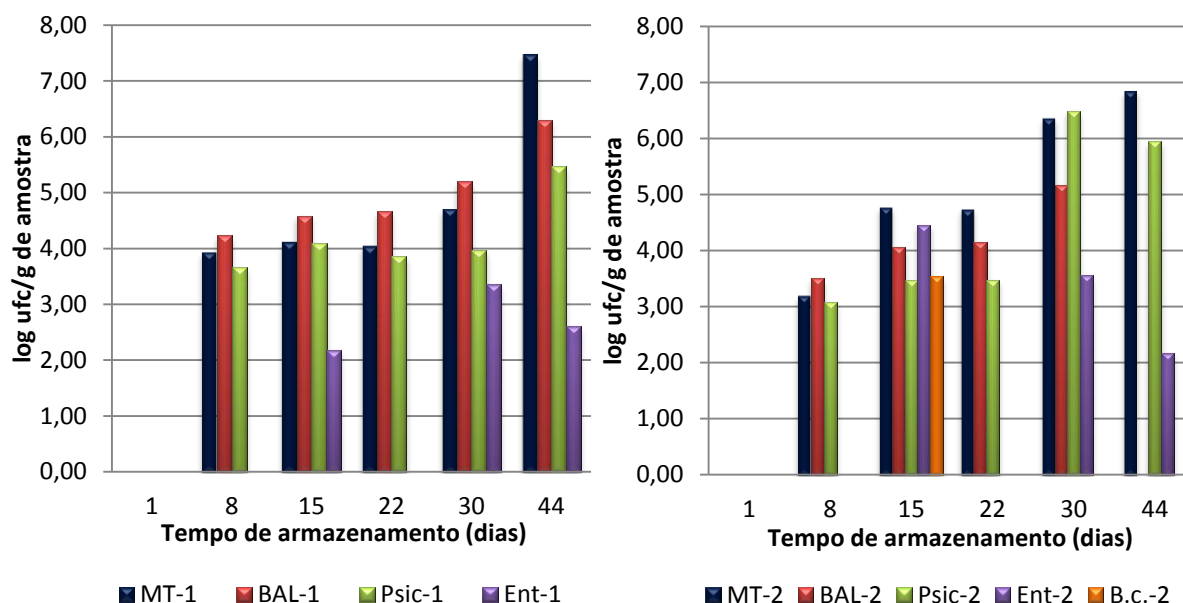


Figura 5.7: Microrganismos totais (MT); bactérias ácido-lácticas (BAL); psicrotróficos (Psic); *Enterobacteriaceae* (Ent); *Bacillus cereus* (B.c.) na morcela de arroz em atmosfera modificada.

1-lote1; 2-lote2

Através dos resultados apresentados na Figura 5.7, observa-se que as bactérias ácido-lácticas predominaram sobre os restantes microrganismos, no lote1, excepto no último dia de amostragem, em que os microrganismos totais a 30°C foram os predominantes. No lote2, os microrganismos totais

que crescem a 30°C predominaram em mais dias de amostragem. As enterobactérias e *B. cereus* foram as bactérias que ao longo do período de armazenamento, se observaram as menores concentrações.

Quadro 5.13: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote1 no produto embalado em atmosfera modificada(EAM-1)

EAM-1	Microrg. totais	Psicrotróficos	Bact. ácido-lácticas	Entero
Microrg. totais	1,00	0,41**	0,86**	0,01*
Psicrotróficos	0,98	1,00	0,14**	0,02*
Bact. ácido lácticas	0,97	0,93	1,00	0,00*
Entero	0,51	0,49	0,64	1,00

Nota: P =Probabilidade; P <0,05(*); P >0,05(**)

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 5.13, verificou-se que nas amostras em atmosfera modificada, os microrganismos estudados apresentaram uma boa correlação entre microrganismos estudados.

Verificou-se que as enterobactérias diferiram significativamente dos restantes microrganismos (P<0,05).

Quadro 5.14: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote2 no produto embalado em atmosfera modificada(EAM-2)

EAM-2	Microrg. totais	Psicrotróficos	Bact. ácido-lácticas	Entero	<i>B. cereus</i>
Microrg. totais	1,00	0,96**	0,54**	0,17**	0,07**
Psicrotróficos	0,91	1,00	0,36**	0,12**	0,04*
Bact. ácido-lácticas	-0,38	-0,23	1,00	0,04*	0,02*
Entero	0,51	0,44	0,13	1,00	0,60**
<i>B. cereus</i>	-0,16	-0,36	0,52	0,67	1,00

Nota: P =Probabilidade; P <0,05(*); P >0,05(**)

Através dos resultados apresentados no Quadro 5.14, verificou-se que houve correlações negativas entre as bactérias ácido lácticas e os microrganismos totais e psicrotróficos, bem como *B. cereus* e os microrganismos totais e psicrotróficos. Também se observou que as concentrações entre bactérias-lácticas e as enterobactérias são significativamente diferentes (P<0,05). Deve-se ao facto de as BAL inibirem o crescimento das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* pois, de acordo com Saraiva (2008); Gonçalves (2009), o principal mecanismo em que as BAL podem inibir o

crescimento dos seus competidores resulta da formação de ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogénio e bacteriocinas.

A inexistência de diferenças significativas entre os microrganismos totais a 30°C, psicrotróficos e BAL deve-se ao facto das BAL fazerem parte do grupo dos MT (ISO 15214, 1998) e psicrotróficos serem considerados um subgrupo dos MT (Downes & Ito, 2001).

5.2.2. Produto embalado a vácuo

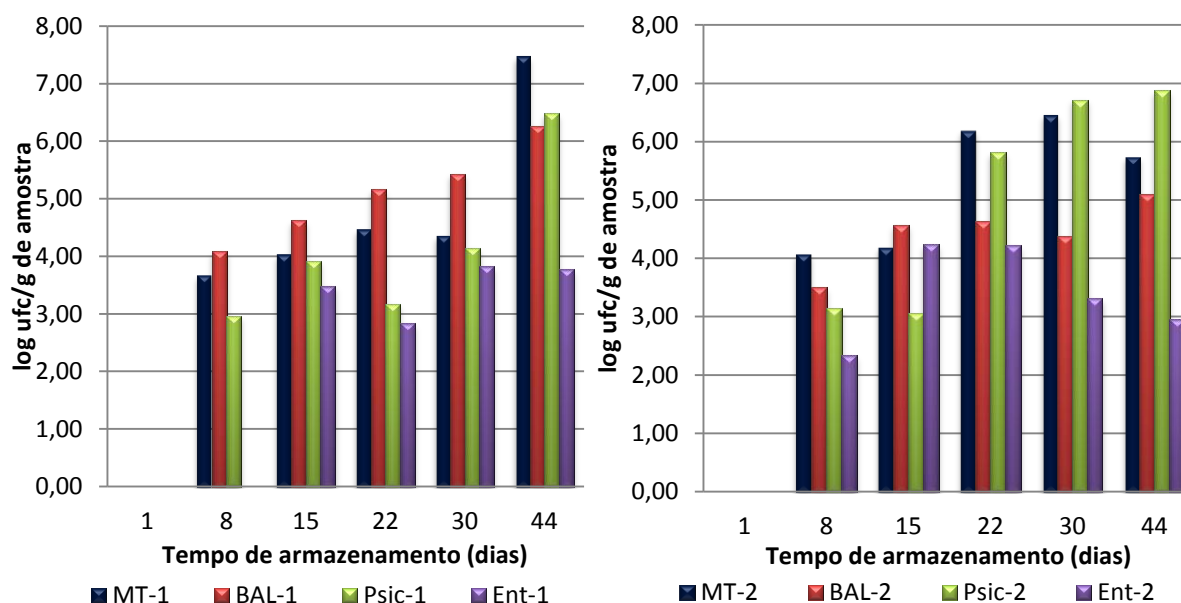


Figura 5.8: Microrganismos totais (MT); bactérias ácido-lácticas (BAL); psicrotróficos (Psic); *Enterobacteriaceae* (Ent); *Bacillus cereus* (B.c.) na morcela de arroz a vácuo. 1-lote1; 2-lote2

As concentrações dos microrganismos estudados foram diferentes nos dois lotes. Enquanto que no lote1, nas bactérias ácido-lácticas, comparativamente com os restantes microrganismos, obtiveram-se maiores concentrações em todos os dias de armazenamento, excepto no último, no lote2, os microrganismos totais a 30°C e os psicrotróficos apresentaram maiores concentrações nos três últimos dias de amostragem. As enterobactérias foram o grupo em que se obteve menores concentrações, em ambos os lotes.

Quadro 5.15: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote1 no produto a vácuo (EV-1)

EV-1	Microrg. totais	Psicrotróficos	Bact. ácido-lácticas	Entero
Microrg. totais	1,00	0,49 ^{**}	0,71 ^{**}	0,07 ^{**}
Psicrotróficos	0,94	1,00	0,22 ^{**}	0,19 ^{**}
Bact. ácido-lácticas	0,88	0,86	1,00	0,03 [*]
Entero	0,49	0,60	0,75	1,00

Nota: P =Probabilidade; P <0,05(*); P >0,05(**)

No Quadro 5.15, verifica-se que todos os microrganismos tiveram boas correlações entre si. Não houve diferenças significativas entre os microrganismos estudados, excepto entre as bactérias ácido-lácticas e as enterobactérias.

Quadro 5.16: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote2 no produto a vácuo (EV-2)

EV-2	Microrg. totais	Psicrotróficos	Bact. ácido-lácticas	Entero
Microrg. totais	1,00	0,83 ^{**}	0,15 ^{**}	0,02 [*]
Psicrotróficos	0,94	1,00	0,46 ^{**}	0,12 ^{**}
Bact. ácido-lácticas	0,53	0,63	1,00	0,04 [*]
Entero	0,22	0,00	0,51	1,00

Nota: P =Probabilidade; P <0,05(*); P >0,05(**)

No lote2 verificou-se que as enterobactérias diferiram significativamente dos microrganismos totais a 30°C e das bactérias ácido-lácticas (P<0,05), igualmente identificado no estudo de Santos *et al.* (2005) para o produto a vácuo. Este resultado poderá ser atribuído ao efeito inibitório de produtos da actividade das bactérias ácido-lácticas nas enterobactérias (Saraiva, 2008). Outro aspecto relevante é o facto das bactérias ácido-lácticas integrarem-se no grupo dos microrganismos que crescem a 30°C (ISO 15214:1998). Segundo Felipe (2008), a deterioração do produto carne embalado a vácuo aumenta quando há interacção metabólica entre as BAL e as enterobactérias, o que prejudica a qualidade do produto.

Pode-se observar que em ambos os lotes os microrganismos totais a 30°C, as bactérias ácido-lácticas e os psicrotróficos não diferiram entre si ($P>0,05$). Santos *et al.* (2005), também obtiveram os mesmos resultados no produto a vácuo.

5.2.3. Produto a granel

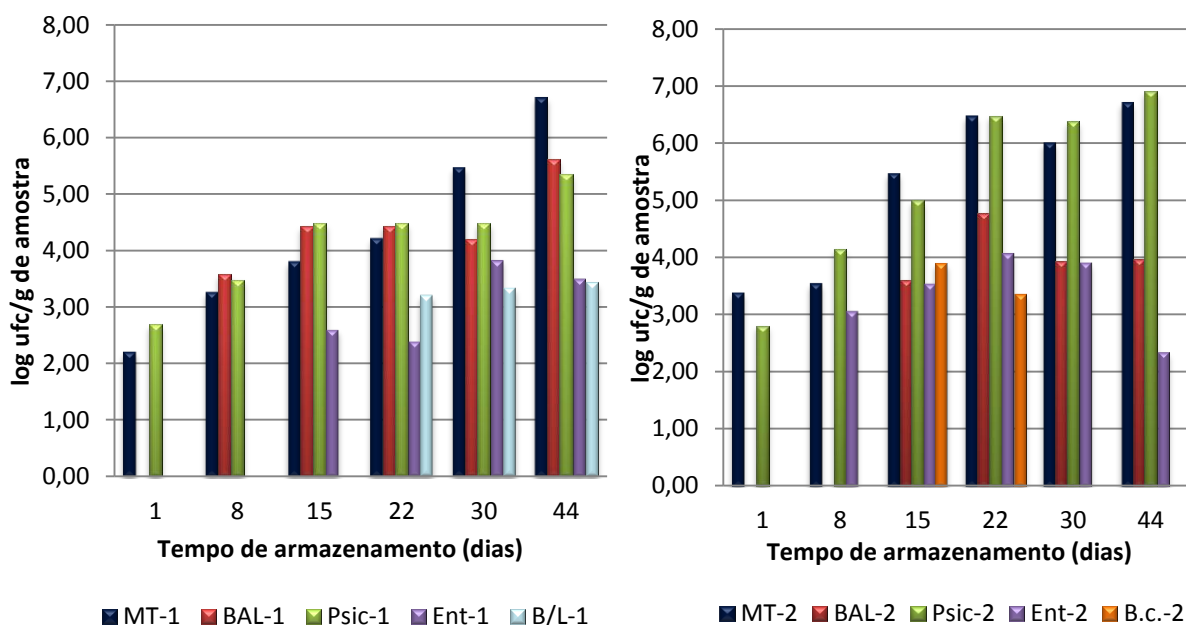


Figura 5.9: Microrganismos totais (MT); bactérias ácido-lácticas (BAL); psicrotróficos (Psic); *Enterobacteriaceae* (Ent); bolores e leveduras (B/L); *Bacillus cereus* (B.c.) na morcela de arroz a granel. 1-lote1; 2-lote2

Ao se analisar os gráficos representados na Figura 5.9, e os anteriores, observou-se que, unicamente, nas amostras a granel foram isolados bolores e leveduras. *Bacillus cereus* foram apenas detectados em amostras embaladas em atmosfera modificada e a granel no lote2 (Figura 5.7 e Figura 5.9). Observou-se que o número de isolamentos de bolores e leveduras e *Bacillus cereus* foram em menor número que os restantes microrganismos. No entanto, estes microrganismos apareceram sobretudo nesta atmosfera, possivelmente devido à facilidade em se desenvolverem em ambientes aeróbios, dado que *Bacillus cereus* é uma bactéria aeróbia facultativa (Friedman *et al.*, 2006). Por outro lado, a maioria dos bolores são aeróbios e as leveduras podem ser microrganismos fermentativos, que se desenvolvem na presença ou ausência de oxigénio, ou oxidativos, desenvolvendo-se apenas na presença de oxigénio (Gava *et al.*, 2008).

O facto das bactérias ácido-lácticas baixarem o pH do meio, pode justificar o crescimento de bolores e leveduras, apenas nos últimos dias de amostragem, visto que estes microrganismos têm a

capacidade de se adaptarem a ambientes ácidos. Os bolores e leveduras conseguem resistir melhor que a maioria das bactérias a valores baixos de pH (Gava *et al.*, 2008; Almeida, 2009).

Quadro 5.17: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote1 no produto a granel (G-1)

G-1	Microrg. totais	Psicrotróficos	Bact. ácido-lácticas	Enteroc	Bol. e Lev
microrg. Totais	1,00	0,87 ^{**}	0,84 ^{**}	0,04 [*]	0,02 [*]
Psicrotróficos	0,91	1,00	0,58 ^{**}	0,02 [*]	0,01 [*]
bact. ácido-lácticas	0,83	0,97	1,00	0,02 [*]	0,01 [*]
Enteroc	0,87	0,89	0,68	1,00	0,70 ^{**}
Bol. e Lev	0,83	0,73	0,57	0,78	1,00

Nota: P = Probabilidade; P < 0,05(*); P > 0,05(**)

Nas amostras a granel do lote1, observou-se uma boa correlação entre os microrganismos mencionados no Quadro 5.17. As enterobactérias diferiram significativamente dos microrganismos totais a 30°C, dos psicrotróficos e das bactérias ácido-lácticas (P < 0,05). Este resultado poderá ser devido ao facto das bactérias ácido-lácticas formarem ácidos orgânicos e bacteriocinas (Saraiva, 2008; Gonsalves, 2009), podendo inibir o crescimento dos seus competidores pela redução do pH. Por outro lado, as BAL estão incluídas no grupo dos microrganismos que crescem a 30°C (ISO 15214:1998), que por sua vez podem ser constituídos por microrganismos psicrotróficos (Downes & Ito, 2001). Igualmente às enterobactérias, os bolores e leveduras também diferem significativamente dos três grupos de microrganismos (P < 0,05).

Quadro 5.18: Valores de correlação de Pearson (diagonal inferior) e significância (diagonal superior) para os parâmetros microbiológicos do lote2 no produto a granel (G-2)

G-2	Microrg. totais	Psicrotróficos	Bact. ácido-lácticas	Enteroc	B.cereus
Microrg. totais	1,00	0,99 ^{**}	0,04 [*]	0,02 [*]	0,00 [*]
Psicrotróficos	0,96	1,00	0,04 [*]	0,02 [*]	0,00 [*]
Bact. ácido-lácticas	0,97	0,90	1,00	0,92 ^{**}	0,22 ^{**}
Enteroc	0,60	0,70	0,68	1,00	0,13 ^{**}
B.cereus	0,36	0,19	0,52	0,49	1,00

Nota: P = Probabilidade; P < 0,05(*); P > 0,05(**)

No lote2, as correlações entre os microrganismos estudados também foi boa. Ao contrário das outras atmosferas, nesta atmosfera registaram-se diferenças significativas entre os microrganismos totais a 30°C e as bactérias ácido-lácticas ($P < 0,05$). Este resultado poderá ser devido ao facto das bactérias ácido-lácticas tolerarem pequenas quantidades de oxigénio, e por isso terem crescido em menor número que os microrganismos totais a 30°C.

A não existência de diferenças significativas entre os microrganismos totais a 30°C e os psicrotróficos também foi constatado no estudo de Santos *et al.* (2005), tendo sido obtido valores próximos e iguais ao longo do tempo de armazenamento.

B. cereus diferiu significativamente dos microrganismos totais a 30°C e dos psicrotróficos, o que poderá ser justificado pelo crescimento de *B. cereus* em apenas dois dias de amostragem.

Apesar do número insuficiente de amostras para efectuar testes estatísticos paramétricos foi feita uma análise de variância cujos resultados correspondem às médias dos diferentes dias de amostragem (Figura 5.10).

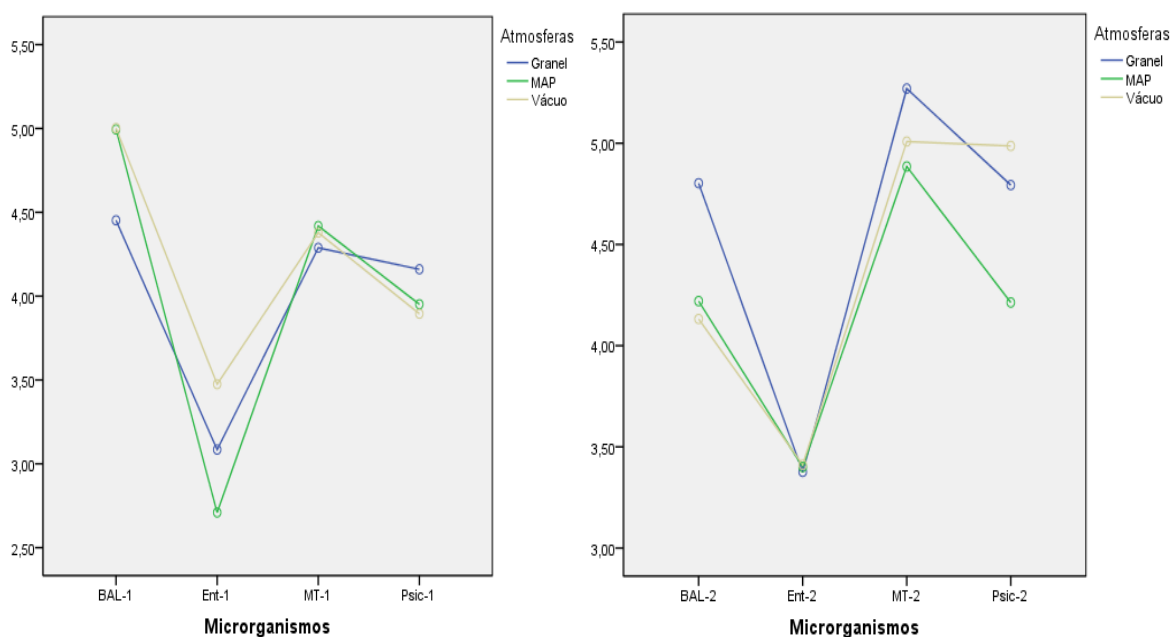


Figura 5.10: Gráficos perfil de resposta referentes aos microrganismos a diferentes atmosferas.

Pode-se observar que os lotes são visivelmente diferentes. No lote1, a amostra em que se obteve menor concentração de BAL foi a amostra a granel, sendo que no lote 2, a amostra a vácuo foi a que obteve menor concentração de BAL. Na amostra em atmosfera modificada do lote1, obteve-se menor concentração de enterobactérias, enquanto que no lote 2, existiu pouca diferença entre as concentrações de enterobactérias entre as três atmosferas. No entanto a amostra considerada com

menor concentração deste grupo de bactérias foi a amostra a granel. Quanto aos microrganismos totais a 30°C, a amostra a granel do lote 1 foi aquela em que se obteve menor concentração e a amostra em atmosfera modificada do lote2 foi a que se obteve menor concentração. Na amostra a vácuo do lote1 foi a que obteve menor concentração de psicotróficos e na amostra em atmosfera modificada do lote2 foi onde se obteve menor concentração.

Nas amostras a vácuo e em atmosfera modificada, em ambos os lotes, obteve-se concentrações mais próximas entre si que em relação à amostra a granel. No lote1, nas amostras a granel, vácuo e em atmosfera modificada observou-se que as concentrações relativas aos microrganismos totais a 30°C e aos psicotróficos foram mais próximas que no lote2. Verificou-se que nas amostras a granel, vácuo e em atmosfera modificada, do lote2, obtiveram-se concentrações iguais de enterobactérias, ao contrário do que foi observado no lote1.

Em ambos os lotes, as concentrações de enterobactérias foram menores relativamente aos restantes microrganismos, cuja explicação já foi dada nos pontos 5.2.1., 5.2.2. e 5.2.3.

Os resultados obtidos no presente trabalho não sugerem a existência de uma atmosfera onde se consiga obter uma menor concentração dos microrganismos estudados.

6. Conclusões

Os resultados do estudo da microbiota de um produto cárneo cozido, com a aplicação de duas tecnologias de embalagem: atmosfera a vácuo e atmosfera modificada (80%CO₂ e 20%N₂), e sem tecnologia de embalagem específica, permitiram constatar que, apesar da tecnologia de embalagem a vácuo ter um efeito conservante por desenvolver um ambiente anaeróbio no interior da embalagem, evitando o crescimento de microrganismos aeróbios deteriorantes, foi neste tipo de embalagem que se detectou a presença de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

A elevada concentração de psicotróficos no produto a vácuo, poderá contribuir para a sua deterioração.

A presença de diversos microrganismos no produto a granel, sobretudo *Bacillus cereus*, bolores e leveduras e bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, permite concluir que o meio aeróbio facilita o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogénicos, limitando o prazo de validade do produto.

Através do decréscimo de *Enterobacteriaceae* no produto embalado em atmosfera modificada do lote2, poderá concluir-se que a tecnologia de embalagem em atmosfera modificada foi a mais eficaz na inibição de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

Neste estudo não se detectou a presença de *Clostridium perfringens* que, geralmente, está relacionada com a contaminação fecal de carcaças; contaminação por outros ingredientes, tais como especiarias; ou contaminação pós-processamento.

A predominância de microrganismos totais a 30°C, onde se incluem as bactérias ácido-lácticas, e alguns psicotróficos, nos três tipos de atmosfera poderá ser atribuído à sua presença na microbiota inicial da carne. Tratando-se a morcela de arroz de um produto processado termicamente, é de esperar que os microrganismos mencionados na frase anterior sejam destruídos. Assim, a presença destes microrganismos nas amostras estudadas poderá ser atribuída à manipulação pós-processamento deficiente e à contaminação ambiental. Para além disso, também poderá ser atribuída às condições incorrectas de armazenamento e ao incumprimento relativo ao binómio tempo/temperatura.

Assim os resultados obtidos neste estudo, sugerem deficiência no fabrico e manipulação que carecem de correcção. O isolamento dos microrganismos estudados, excepto *Clostridium perfringens*,

também deve-se ao facto da morcela de arroz ter um pH neutro e uma actividade da água elevada, sendo favorecido o crescimento de fungos e bactérias.

O escasso número de amostras estudadas não permitiu identificar o tipo de atmosfera que mais contribui para a conservação e qualidade do produto cárneo cozido durante o seu período de vida útil.

7. Propostas de trabalho futuro

No processo de amostragem do presente trabalho foi assumido que as diferentes morcelas eram representativas do lote a estudar.

Como trabalho futuro poderia alterar-se o processo de amostragem assim deveria aplicar-se um processo que permitisse a monitorização da amostra ao longo do período de conservação a diferentes atmosferas. Também se poderia realizar análises microbiológicas à morcela de arroz sem invólucro (tripa) com o objectivo de identificar qual a origem da contaminação microbiana.

8. Bibliografia

- ABELHO, M. (2010). *Protocolos de Microbiologia Ambiental, Parte 1: métodos básicos em microbiologia*. Coimbra: ESAC, 10pp.
- ALLEN, J. R., & FOSTER, E. M. (1960). Spoilage of vacuum-packed sliced processed during refrigerated storage. *Food Science*, 25, 19-25.
- ALMEIDA, D., ALMEIDA, A., & VENTURA D. (2011). *Perigos biológicos - Bacillus cereus*. Coimbra: Escola Superior Agrária de Coimbra, 14pp.
- ALMEIDA, I. F. (2009). *Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras*. Dissertação em Medicina Veterinária. Lisboa: UTL, Faculdade de Medicina Veterinária, 90pp.
- ANDERSON, M. d., & PASCUAL, V. C. (2000). *Microbiología Alimentaria* (2 ed.). Madrid: Díaz de Santos, S.A, 291pp.
- ANÓNIMO (2010). Agentes antimicrobianos, químicos e naturais. *Food Ingredients*, 36-42.
- ARCURI, E. F., SILVA, P. D., BRITO, M. A., BRITO, J. R., LANGE, C. C., & MAGALHÃES, M. M. (2008). Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrófilas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, 38, 2250-2255.
- ARESP. (s.d.). *Código de Boas Práticas para o Transporte de Alimentos*. GPPAA, 47pp.
- BAPTISTA, P., & ANTUNES, C. (2005). *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração*. Guimarães: Forvisão-Consultoria em Formação Integrada, S.A, 138pp.
- BAPTISTA, P., & VENÂNCIO, A. (2003). *Os Perigos para a Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos*. Guimarães: Forvisão-Consultoria em Formação Integrada, Ida, 125pp.
- BASTOS, P. A. (2009). *Sobrevivência de Escherichia coli O157:H7 em iogurtes* Tese para a obtenção do grau de Doutor. Rio de Janeiro: UFF, Faculdade de Veterinária, 85pp.
- BEASLEY, S. (2004). *Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota*. Dissertação em Microbiologia. Helsinki : University of Helsinki, 57pp.
- BLAKISTONE, B. A. (1999). *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods* (2 ed.). New York: Springer, 302pp.
- CALIXTO, L. E. (2009). *PACE e a Higiene dos Processos: Possibilidade de Redução/Reorientação dos controlos com Base nos Indicadores de Higiene dos Processos nos matadouros da Guarda*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Lisboa: UTL, Faculdade de Medicina Veterinária, 92pp.
- CASTRO, S. A. (2008). *Boas práticas de higiene: um pilar para a produção de alimentos seguros*. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: UTL, Faculdade de Medicina Veterinária, 106pp.

- CORRY, J. E., Curtis, G. D., & Baird, R. M. (2003). *Handbook of culture media for food microbiology* (2 ed.). Amsterdam: Elsevier, 662pp.
- CUNHA, M. A. (2006). Métodos de detecção de microrganismos indicadores. *Saúde & Ambiente*, 1, 9-13.
- Decreto-Lei n.º 290/90, de 20 de Setembro, Diário da República nº 218 de 20-09-1990, I Série.
- DOWNES, F. P., & ITO, K. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4 ed.). Washington: American Public Health Association, 323pp.
- ECOLAB. (Junho de 2003). Acedido em 02 de Junho de 2011, de <http://www.ecolab.com/PublicHealth/BCereus.asp>.
- ESTEVES, A. S. (2005). *Perigos microbiológicos em alheira. Principais vias de contaminação por Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens e Salmonella spp.* Tese para obtenção do grau de Doutor. Vila Real: UTA, 281pp.
- FADDIN, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3 ed.). Montevideo, Uruguay: Ed. Médica Panamericana, 850pp.
- FEITOSA, T. (1999). *Contaminação, conservação e alteração da carne.* Fortaleza: Embrapa, 26pp.
- FELIPE, L. M. (2008). *Associação de bactérias da família Enterobacteriaceae e Clostridium estertheticum com a deterioração "Blown Pack" em cortes cárneos embalados a vácuo.* Dissertação para obtenção do grau de Mestre. São Paulo: UEP "Julio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 86pp.
- FERREIRA, V., BARBOSA, J., SILVA, J., FELÍCIO M. T., MENA, C., HOGG, T., *et al.* (2007). Characterisation of alheiras, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. *Food Control*, 18, 436-440.
- FERREIRA, V., BARBOSA, J., VENDEIRO, S., MOTA, A., SILVA, F., MONTEIRO, M. J., *et al.* (2006). Chemical and microbiological characterization of alheira: A typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Science*, 73, 570-575.
- FORSYTHE, S. J. (2010). *The microbiology of safe food* (2 ed.). USA: Wiley-Blackwell, 496pp.
- FRIEDMAN, M., HENIKA, P., LEVIN, C., MANDRELL, R., KOZUKUE, N., & USDA, A. (2006). Atividades antimicrobianas das catequinas do chá e teaflavinas e extractos de chá contra Bacillus cereus. *Jornal da Proteção de Alimentos*, 69, 354-361.
- FULLER. (1989). A review: Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. A., & PICAZO, J. J. (1999). *Compendio de Microbiologia Medica.* Elsevier: Espanha, 817pp.
- GAVA, A. J. (1984). *Princípios de Tecnologia de Alimentos.* São Paulo: Nobel, 286pp.

- GAVA, A. J., SILVA, C. A., & FRIAS, J. R. (2008). *Tecnologia de alimentos - Princípios e aplicações* (3 ed.). São Paulo: Nobel, 512pp.
- GONÇALVES, S. M. (2009). *Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto carne fermentado tradicional e do ambiente fabril*. Dissertação de mestrado em Segurança alimentar. Lisboa: UTL, Faculdade de Medicina Veterinária, 94pp.
- HAN, J. H. (2005). *Innovations in food packaging*. Amsterdam: Elsevier, 517pp.
- HAYES, P. R. (1992). *Food microbiology and hygiene* (2 ed.). Great Yarmouth: Springer, 540pp.
- HENRIQUES, M. M. (2010). *Comparação de métodos para identificação de bactérias filamentosas responsáveis pelo fenómeno de bulking numa ETAR*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Lisboa: UNL, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 106pp.
- HORIKINI. (1 de Março de 2009). *Prova de Voges-Proskauer- VP*. Acedido em 26 de Julho de 2011, de <http://microbiologiabrasil.blogspot.com/2009/01/prova-de-voges-proskauer-vp.html>
- ICMSF. (1996). *Microorganisms in foods 5: microbiological specifications of food pathogens* (Vol. 5). Londres: Springer, 513pp.
- ISO 15214 (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 °C*. Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 7932 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus – Colony-count technique at 30°C*. Switzerland: International Organization for Standardization.
- JANDA, J. M., & ABBOTT, S. L. (2006). *The Enterobacteria* (2 ed.). Washington: ASM Press, 411pp.
- JUNEJA, V. K., & SOFOS, J. N. (2010). *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington, USA: ASM Press.
- JUNEJA, V., & THIPPAREDDI, H. (2004). Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 155 – 163.
- LACAZ-RUIZ, R. (2008). *Manual práctico de microbiología básica*. São Paulo: EdUSP, 136pp.
- LOPES, M. M., MÁRSICO, E. T., SOBREIRO, L. G., SILVA, L. P., CONTE-JÚNIOR, C. A., PARDI, H. S., et al. (2004). Efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99, 207-210.
- LUND, B. M., BAIRD-PARKER, T. C., & GOULD, G. W. (2000). *The microbiological safety and quality of food* (Vol. 2). Gaithersburg, Maryland: Springer, 1731pp.
- MAN, D., & JONES, A. (2000). *Shelf-life evaluation of foods* (2 ed.). Gaithersburg, Maryland: Springer, 272pp.

- MARTINELLI, C. (2007). *Avaliação Microbiológica de Produtos Cárneos Distribuídos aos Pacientes em um Hospital Particular de Volta Redonda*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Rio de Janeiro: UFRRJ, Instituto de Tecnologia, 90pp.
- MATOS, T. d. (2010). *Sebenta de Tecnologia da Carne e do Pescado*. Lisboa: UTL, Instituto Superior de Agronomia, 125pp.
- MONTEBELLO, N. d., & ARAUJO, W. M. (2006). *Carne & cia*. Brasília: Senac, 324pp.
- MONTEIRO, D. C., COGO, D. L., GALARDA, D., & FILHO, F. C. (2009). *Microbiologia Médica - Manual Teórico- Prático de Procedimentos Básicos em Microbiologia Médica*. Curitiba: UFPR, 205pp.
- MOTA, S. L., SILVA, G. D., AGNANI, J. A., MENEZES, E. L., DEMETRIO, A. A., SHINOHARA, N. K., *et al.* (2009). *Embalagens utilizadas em produtos cárneos*. Recife: UFRP, 3pp.
- MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., & PFALLER, M. A. (2006). *Microbiologia Médica* (5 ed.). Madrid: Elsevier, 976pp.
- NASCIMENTO, W. d. (Setembro de 2009). *RELATÓRIO DE PRÁTICA 02: ELABORAÇÃO DE AGAR NUTRIENTE*. Obtido em 22 de Julho de 2011, de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAYoEAL/elaboracao-a-gar-nutriente>
- NETO, L. G., SOUZA, M. R., NUNES, A. C., NICOLI J. R., & SANTOS, W. L. (2005). Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57, 245-250.
- NP 2307. (1987). *Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos psicotróficos*. Lisboa: Instituto Português de Qualidade.
- NP 3277-2. (1987). *Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 2: Incubação a 37°C*. Lisboa: Instituto Português de Qualidade.
- NP 4137. (1991). *Microbiologia alimentar. Regras gerais para a determinação de Enterobacteriaceae sem revitalização. Técnicas do número mais provável (NMP) e de contagem de colónias*. Lisboa: Instituto Português de Qualidade.
- NP 4395. (2002). *Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de Clostridium perfringens a 37°C. Método corrente*. Caparica: Instituto Português de Qualidade.
- NP 4405. (2002). *Microbiologia alimentar - Regras gerais para a contagem de microrganismos, contagem de colónias a 30°C*. Lisboa: Instituto Português da Qualidade.
- NUNES, M. L., BATISTA, I., BESSA, R., CANDEIAS, M., FERREIRA, M. E., NUNES, A. F., *et al.* (2005). *Caracterização do Consumo Alimentar em Portugal e Principais Pergigos Associados*. Portugal: Ministério de Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas - INIAP, 64pp.
- OLIVEIRA, A. B., PAULA, C. M., CAPALONGA, R., CARDOSO, M. R., & TONDO, E. C. (2010). Doenças transmitidas por alimentos, Principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Rev HCPA*, 30, 279-285.

- OLIVEIRA, T. F. (2010). *Evolução ao longo do tempo de vida útil do teor microbiológico de queijos frescos mantidos sob refrigeração doméstica*. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: UTL, Faculdade de Medicina Veterinária, 101pp.
- PAINE, F. A., & PAINE, H. Y. (1992). *A handbook of food packaging* (2 ed.). Cambridge: Springer, 497pp.
- PAMPULHA, M. E., & OLIVEIRA, A. (2004). *Microbiologia - trabalhos práticos*. Lisboa: UTL, Instituto Superior de Agronomia, 45pp.
- PEREIRA, L., PINHEIRO, A. N., & SILVA, G. C. (2009). *Manipulação Segura de alimentos* (2 ed.). Rio de Janeiro: Senac Nacional, 86pp.
- PEREZ, M. D. (2003). *Desarrollo y Validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos*. Tese para obtenção do grau de Doutor. Córdoba: UC, Faculdade de Veterinaria, 297pp.
- PESTANA, C. M. (2007). *Conservação de filetes de sardinha, *Sardina pilchardus*, sujeitos a estabilização com gás solúvel (SGS), embalados em ar, vácuo e atmosfera modificada*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Lisboa: UL, Faculdade de Farmácia, 92pp.
- POÇAS, M. d., & MOREIRA, R. (2003). *Segurança Alimentar e Embalagem*. Porto: ESB/UCP, 36pp.
- QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B., & CARTER, G. R. (1994). *Clinical veterinary microbiology*. USA: Elsevier, 648pp.
- Regulamento (CE) N.º 853/2004 de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal
- Regulamento (CE) N.º 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, Portugal, 18pp.
- RÉVILLION, J. P. (s.d.). Microbiologia. Obtido em 24 de Junho de 2011, de http://www.ufrgs.br/alimentus/laticinios/micro/micro_inicio.htm
- ROÇA, R. D. (s.d.). Microbiologia da carne. São Paulo: UNESP, 12pp.
- ROJAS, A. T. (2003). *Guía de procesos para la elaboración de productos cárnicos* (5 ed.). Bogotá: Siglo Del Hombre Editores S.A, 32pp.
- SANTOS, E. M., JAIME, I., ROVIRA, J., LYHS, U., KORKEALA, H., & BJÖRKROTH, J. (2005). Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos”. *International Journal of Food Microbiology - Elsevier*, 97, 285-296.
- SANTOS E. M., DIEZ, A. M., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., JAIME, I., & ROVIRA, J. (2005). Microbiological and sensory changes in “Morcilla de Burgos” preserved in air, vacuum and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, 71, 249-255.

- SARAIVA, C. M. (2008). *Influência do pH final e tipo de embalagem na conservação de carne de bovino da raça maronesa - Parâmetros microbiológicos, físico-químicos, sensoriais e fração volátil*. Vila Real: Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, 297pp.
- SENESE, S., & GHELARDI, E. (2010). Production, Secretion and Biological Activity of Bacillus cereus Enterotoxins. *Toxins*, 2, 1690-1703.
- SILVA, M. V. (2003). *Segurança alimentar de produtos cárneos tradicionais, enchidos e produtos curados*. Porto: AESBUC/UCP, 34pp.
- SIVASANKAR, B. (2004). *Food Processing and Preservation*. New Delhi: PHI Aprender Unip. Ltd.464pp.
- SOUZA, V. G. (2003). *Efeito da atmosfera modificada e do ácido láctico sobre a vida útil da linguiça frescal de frango*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Niterói - RJ: UFF, Faculdade de Veterinária, 59pp.
- TOBAR, K. (2011). Bacillus cereus Intoxicação Alimentar. Obtido em 02 de Junho de 2011, de <http://www.textbookofbacteriology.net/B.cereus.html>
- TOLDRÁ, F. (2010). *Handbook of Meat Processing*. USA: John Wiley and Sons, 584pp.
- VANDENDRIESSCHE, F. (2008). Meat products in the past, today and in the future. *Meat Science*, 78, 104–113.
- YOKOYA, D. F., CANHOS, D. P., & DURRANT, D. R. (s.d.). *Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana*. Obtido em 26 de Julho de 2011, de <http://www.unicamp.br/fea/lsvm/index.html>
- YOUSEF, A. F., & CARLSTROM, C. (2003). *Food Microbiology: A Laboratory Manual*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc, 277pp.