



Instituto Politécnico de Santarém
2021

Avaliação da microbiota associada ao desenvolvimento de um
chouriço de porco Malhado de Alcobaça e sua estabilidade

Andreia Mota

**Avaliação da microbiota associada
ao desenvolvimento de um chouriço
de porco Malhado de Alcobaça e sua
estabilidade**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre na área
de Tecnologia Alimentar

Andreia Margarida Arroteia Mota

Orientador: Doutora Ana Maria Gomes de Sousa Neves

Coorientador: Doutor Igor Alexandre da Silva Dias

2021, dezembro

Instituto Politécnico de Santarém
Escola Superior Agrária de Santarém

**Avaliação da microbiota associada ao desenvolvimento de um
chouriço de porco Malhado de Alcobaça e sua estabilidade**

**Trabalho realizado com vista à obtenção do Grau
de Mestre em Tecnologia Alimentar**

Nome: Andreia Margarida Arroiteia Mota
Nº 150337004

Orientador: Ana Maria Gomes de Sousa Neves
Grau académico do orientador: Doutoramento

Coorientador: Igor Alexandre da Silva Dias
Grau académico do coorientador: Doutoramento

Santarém
2021

Agradecimentos

Desde já, quero deixar os meus agradecimentos a todos aqueles que de uma forma ou de outra sempre me ajudaram ao longo de toda a minha vida académica.

Aos meus pais, pois a eles devo tudo o que sou e o que consegui alcançar. Foram eles que sempre me ajudaram e apoiaram para alcançar os meus objetivos.

Aos Professores Doutores Ana Neves e Igor Dias por serem os orientadores deste trabalho e pela ajuda durante a realização do mesmo.

Às técnicas do laboratório de microbiologia Luzia Marques e Sofia Albergaria pela ajuda e apoio durante a realização da parte prática deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas que sempre me ajudaram e acompanharam nesta etapa tão importante da minha vida.

Muito obrigada a todos!

Abreviaturas e Símbolos

[d] – Concentração dupla

[s] – Concentração simples

DOP – Denominação de Origem Protegida

DRBC – Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar

ETG – Especialidade Tradicional Garantida

HAP – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

IARC – International Agency for Research on Cancer

IG – Indicação Geográfica para bebidas espirituosas e vinhos aromatizados

IGP – Indicação Geográfica Protegida

ISO – International Organization for Standardization

MKTTn – Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth

MRS – deMan, Rogosa e Sharpe

NP – Norma Portuguesa

PCA – Plate Count Agar

r.p.m – Rotações por minuto

s.d. – Sem data

SPS – Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar

u.f.c/g – Unidade formadora de colónias por grama

VRBGA – Violet Red Bile Glucose Agar

Resumo

Neste trabalho foi realizado um estudo sobre a avaliação da microbiota, para perceber a sua evolução e estabilidade de um novo produto: chouriço de porco Malhado de Alcobaça.

O objetivo foi avaliar a carga microbiana durante o fabrico de chouriço de porco Malhado de Alcobaça, usando microrganismos indicadores de qualidade, higiene e de segurança em amostras de: matéria-prima (carne), massa (mistura da carne e gordura/toucinho com os condimentos e aditivos adicionados), enchidos antes da fumagem, produto final e chouriços embalados sob vácuo após 3 e 6 meses. Para complementar, foram determinados o pH e a atividade de água (a_w), uma vez que, são parâmetros diretamente relacionados com a atividade microbiana.

Na fase em que o produto se encontra pronto para consumo, os resultados não foram satisfatórios relativamente às contagens de microrganismos a 30°C e foram satisfatórios para bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

Palavras-chave: caracterização microbiológica, chouriço, porco Malhado de Alcobaça, segurança alimentar.

Abstract

In this work, a study was carried out on the evolution and microbiological stability of a new product: Malhado de Alcobaça pork chorizo.

The objective was to evaluate the microbial load during the manufacture of sausage from Malhado de Alcobaça pork, using quality, hygiene, and safety indicator microorganisms in samples of raw material (meat), “mass” (mixture of meat and fat/bacon with added seasonings and additives), filled before and after the smoking stage, and vacuum-packed sausages after 3 and 6 months. In addition, pH and water activity (a_w) were determined, since they are parameters directly related to microbial activity.

The results were not satisfactory for microorganism counts at 30°C and were satisfactory for molds and yeasts, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes*.

Key words: chorizo, food safety, Malhado de Alcobaça pork, microbiological characterization.

Índice

Agradecimentos	i
Abreviaturas e Símbolos.....	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice de quadros.....	vii
Índice de figuras	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Objetivo	2
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Enchidos tradicionais e sua relevância	3
2.2. O porco Malhado de Alcobaça e a produção de chouriço	8
2.3. Produção de chouriço.....	9
2.3.1. Ingredientes essenciais ao fabrico de chouriço	9
2.3.2. Processo tecnológico	10
2.4. Microbiota dos chouriços.....	11
2.4.1. Influência dos parâmetros intrínsecos e extrínsecos na microbiota dos chouriços	11
2.4.2. Origem e evolução da microbiota nos chouriços	12
2.5. Microrganismos indicadores e controlo microbiológico	15
2.5.1. Indicadores de qualidade.....	15
2.5.2. Indicadores de higiene e segurança.....	17
2.5.3. Controlo microbiológico e prevalência de alguns grupos microbianos em enchidos.....	19

3. Material e Métodos	21
3.1. Material	21
3.2. Análises microbiológicas	22
3.2.1. Preparação das amostras e diluições	23
3.2.2. Contagem de microrganismos a 30°C	23
3.2.3. Contagem de bactérias lácticas	23
3.2.4. Contagem de bolores e leveduras	24
3.2.5. Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	24
3.2.6. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	24
3.2.7. Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores	24
3.2.8. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	24
3.2.9. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	25
3.3. Análises físico-químicas	25
3.3.1. Preparação da amostra.....	25
3.3.2. pH.....	25
3.3.3. Atividade de água.....	26
4. Resultados e Discussão.....	27
6. Trabalhos futuros.....	41
7. Bibliografia.....	42
Anexos	48

Índice de quadros

Quadro 1 - Ingredientes e quantidades (em gramas e percentagem) utilizadas na formulação da massa dos chouriços.	22
Quadro 2 - Descrição das condições de produção nas respetivas etapas.	22
Quadro 3 - Resultados obtidos na análise da matéria-prima cortada manualmente.....	27
Quadro 4 - Resultados obtidos para as populações totais e microrganismos indicadores de higiene durante o processo I.	28
Quadro 5 - Resultados obtidos para microrganismos indicadores de segurança durante o processo I.....	29
Quadro 6 - Resultados obtidos para as populações totais e microrganismos indicadores de higiene durante o processo II.....	29
Quadro 7 - Resultados obtidos para microrganismos indicadores de segurança durante o processo II.	30
Quadro 8 - Resultados obtidos para as populações totais e microrganismos indicadores de higiene durante o processo III.	30
Quadro 9 - Resultados obtidos para microrganismos indicadores de segurança durante o processo III.	31
Quadro 10 - Resultados de pH e a_w , obtidos na etapa pós-fumeiro.	31

Índice de figuras

Figura 1 - Símbolos da União Europeia para DOP, IGP/IG e ETG.	4
Figura 2 - Número de produtos registados por cada país europeu na base de dados eAmbrosia da Comissão Europeia.	5
Figura 3 - Número de produtos portugueses registados por categoria na base de dados eAmbrosia da Comissão Europeia.	6
Figura 4 - Número de produtos registados por cada país europeu na categoria "produtos de carne" na base de dados eAmbrosia da Comissão Europeia.	6
Figura 5 - Consumo total de carnes e miudezas em Portugal entre os anos 2014 e 2019.	7
Figura 6 - Consumo por tipo de carne em Portugal entre os anos 2014 e 2019.	7
Figura 7 - Porco da raça Malhado de Alcobaça.	8
Figura 8 - Fluxograma do processo de produção de chouriço.	21
Figura 9 - Stomacher® 400 Circulator.	23
Figura 10 - Potenciómetro.	25
Figura 11 - Medidor de atividade de água.	26
Figura 12 - Evolução das populações microbianas totais (M30, microrganismos a 30°C; LAC, bactérias lácticas; B+L, bolores e leveduras) ao longo do processo I.	32
Figura 13 - Evolução das populações microbianas totais (M30, microrganismos a 30°C; LAC, bactérias lácticas; B+L, bolores e leveduras) ao longo do processo II.	33
Figura 14 - Evolução das populações microbianas totais (M30, microrganismos a 30°C; LAC, bactérias lácticas; B+L, bolores e leveduras) ao longo do processo III.	33
Figura 15 - Evolução das populações de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> ao longo do processo I.	36
Figura 16 - Evolução das populações de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> ao longo do processo II.	37
Figura 17 - Evolução das populações de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> ao longo do processo III.	37

1. Introdução

1.1. Enquadramento

A carne é um importante elemento da dieta humana e um dos mais consumidos, é rica em proteínas, vitaminas e minerais, no entanto, é um produto bastante perecível e, por isso, há muitos anos é submetida a diferentes métodos de conservação (Holck *et al.*, 2017).

Um dos métodos de conservação consiste em cortar a carne, misturá-la com outros ingredientes, colocá-la dentro de tripas e secá-la, obtendo assim os muito apreciados enchidos, esta é uma das formas mais antigas de preservar a carne (Mohan, 2014; Holck *et al.*, 2017).

Os enchidos são produzidos em diversas áreas geográficas como a América, Mediterrâneo, Europa do Norte, Europa de Leste, Médio Oriente, África, Leste Asiático e Oceânia. Os enchidos têm variedade de diâmetros, formas, tamanhos, condimentos, características sensoriais e designações, que variam de acordo com a origem geográfica (Toldrá *et al.*, 2015; Rocha & Elias, 2016).

A produção de enchidos poderá ajudar no desenvolvimento rural devido à criação de emprego e independência económica, visto que, são produtos tradicionais que podem ser identificadores de determinadas regiões e as suas particularidades e qualidade são influenciadas pelos animais que lhes dão origem, os ingredientes utilizados, o clima da região onde é produzido e a tecnologia de fabrico (Fernandes *et al.*, 2016).

Os consumidores são cada vez mais exigentes e preocupados com a origem dos produtos, preferindo produtos tradicionais e regionais de elevada qualidade (Laranjo & Elias, 2015).

É importante que os enchidos sejam seguros e que a qualidade dos mesmo esteja sempre a melhorar para que o mercado deste tipo de produtos cresça. O crescimento deste mercado terá benefícios, como o incentivo à indústria da carne, à produção de produtos tradicionais, aumentando a sua variedade e qualidade e produção de raças autóctones (Rocha & Elias, 2016).

Segundo os dados das estatísticas agrícolas disponibilizados pelo INE (2019), em 2017 a atividade de “abate de animais, preparação e conservação de carne e de produtos à base de carne” foi a mais valorizada com 18,5% do total do valor de vendas. No ano 2016 foram produzidas 60 111 toneladas de enchidos e foram vendidas 59 326 toneladas, valores

inferiores aos registados em 2017 onde foram produzidas 64 300 toneladas e vendidas 60 111 toneladas.

Existem uma série de estratégias que quando combinadas permitem preservar/conservar os enchidos e torná-los estáveis, nomeadamente, a redução do pH e da atividade de água (a_w), inibição do crescimento de bactérias aeróbias através da criação de um ambiente anaeróbio, inibição do crescimento microbiano devido à adição de nitratos e nitritos e através da fumagem que inibe o crescimento à superfície. No entanto, este tipo de produtos são produzidos de forma artesanal e por isso não há garantia de que sejam seguros (Holck *et al.*, 2017).

Em alimentos processados como o chouriço, a microbiota consiste em microrganismos que sobreviveram às condições a que o produto foi submetido durante seu processamento e armazenamento, assim como, de microrganismos que possam ter sido introduzidos pelos operadores, equipamentos e utensílios (Húngaro *et al.*, 2014).

A sobrevivência dos microrganismos nos alimentos depende de fatores como a temperatura de armazenamento, composição dos alimentos, pH, microrganismos concorrentes, disponibilidade de oxigénio, entre outros (Húngaro *et al.*, 2014).

1.2. Objetivo

O objetivo foi avaliar a carga microbiana durante o fabrico de chouriço de porco Malhado de Alcobaça, usando microrganismos indicadores de qualidade, higiene e de segurança em amostras de: matéria-prima (carne), massa (mistura da carne e gordura/toucinho com os condimentos e aditivos adicionados), enchidos antes da fumagem, produto final e chouriços embalados sob vácuo após 3 e 6 meses. Para complementar, foram determinados o pH e a atividade de água (a_w), uma vez que, são parâmetros diretamente relacionados com a atividade microbiana.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Enchidos tradicionais e sua relevância

A produção de enchidos é uma atividade de grande relevância no meio rural com influência nos domínios socioeconómico e cultural, uma vez que, permite a impulsão da economia local e do setor agropecuário evitando assim o abandono e desertificação de zonas rurais e a continuação da transmissão de práticas, confeções e saberes dos nossos antepassados. Produtos tradicionais como os enchidos possuem sabores, aromas e texturas únicas cujo processo de produção foi aperfeiçoado ao longo de inúmeras gerações (Fernandes *et al.*, 2016).

A agricultura não se resume à produção de bens alimentares, esta desempenha um papel de extrema importância na ocupação de territórios, no turismo, artesanato, gastronomia, manutenção de paisagens, preservação de tradições e raças pecuárias autóctones que sem o devido investimento poder-se-ão perder com o tempo (Fernandes *et al.*, 2016).

As raças autóctones foram, ao longo dos anos, aprimoradas consoante as necessidades alimentares, de vestuário e de trabalho das populações. Portugal é um país com uma grande diversidade de raças pecuárias autóctones, são 50 as raças que podem ser encontradas, entre bovinos, ovinos, caprinos, suínos, asininos, equinos e galináceos. Esta diversidade advém da enorme variedade de habitats e das diversas condições orográficas, climáticas, edáficas e de manejo (Dantas & Espadinha, s.d.).

As raças autóctones permitem a produção de produtos de qualidade diferenciada, devido às características particulares de cada raça, e de alto valor económico, além de aumentarem a rentabilidade de explorações agrícolas devido ao facto de poderem ser aproveitados recursos forrageiros que de outra maneira não seriam utilizados (Dantas & Espadinha, s.d.).

Em meados do século XX, os efetivos de raças autóctones estavam a diminuir, levando mesmo ao desaparecimento de algumas raças. Para travar esta diminuição, o Estado Português em colaboração com associações de criadores, iniciaram a inventariação e registo zootécnico das raças. Posteriormente, em meados dos anos 90, de modo a proteger o nome dos produtos resultantes das raças autóctones iniciou-se a regulamentação de vários produtos. A partir desse momento vários produtos obtiveram certificação e consequente atribuição de marcas como Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG) (Dantas & Espadinha, s.d.).

O processo de certificação com as marcas DOP, IGP/IG e ETG (**Figura 1**) é de grande importância, visto que, dá garantia aos consumidores da qualidade, proveniência das matérias-primas, condições de higiene e respeito pelos métodos tradicionais de fabrico, assegurado assim, a autenticidade e origem dos produtos. Produtos com estas denominações ficam protegidos legalmente de imitações e utilização abusiva na União Europeia ou em países com um acordo específico de proteção. As marcas DOP e IGP são destinadas a produtos alimentares e agrícolas, e vinhos; a marca IG (mesmo símbolo que a marca IGP) é destinada a bebidas espirituosas e vinhos aromatizados; já a marca ETG é destinada a produtos alimentares e agrícolas que não estão associados a áreas geográficas delimitadas (Comissão Europeia, s.d. b; Fernandes *et al.*, 2016).



Figura 1 - Símbolos da União Europeia para DOP, IGP/IG e ETG.

Na base de dados eAmbrosia (Comissão Europeia, s.d. a), é possível consultar todos os produtos registados e os países de origem. No total estão registados 3457 produtos, 3330 produtos oriundos de países europeus e 127 de países com um acordo específico de proteção, como a China, que é o país não europeu com mais registos (110 produtos registados), Tailândia, Camboja, Estados Unidos, África do Sul, Índia, entre outros.

Relativamente a países europeus, estão registados 31 países com 3330 produtos, 263 com a marca IG, 1228 com a marca IGP e 1839 com a marca DOP. Na **Figura 2**, pode ser observado o número de registos por cada país. Os países com mais registos são Itália com 872 registos, França com 746 registos, Espanha com 358 registos, Grécia com 275 registos, Portugal é o quinto país com mais registos, 190 produtos registados, seguido da Alemanha com 171 registos.

Dos 190 produtos que Portugal tem registados, 11 têm a marca IG, 86 têm a marca IGP e 93 têm a marca DOP, estes produtos estão divididos em 14 categorias (**Figura 3**), como vinhos, aguardentes, carne fresca, produtos de carne, produtos de origem animal, óleos e gorduras ou queijos, entre outros.

Na categoria “produtos de carne”, Portugal tem registados 41 produtos, sendo o segundo país com mais registos, é apenas ultrapassado pela Itália com 43 registos (**Figura 4**). Dos 41 produtos que Portugal tem registados (**Anexo 1**), 34 são enchidos tradicionais certificados com a denominação IGP, alguns exemplos de produtos com esta certificação são a alheira de Mirandela, a alheira de Vinhais, o painho de Portalegre, a chouriça de carne de Melgaço a farinha de Estremoz e Borba, o paio de Beja e o salpicão de Barroso-Montalegre (Comissão Europeia, s.d. a; Fernandes *et al.*, 2016). Segundo o Regulamento (UE) N° 1151/2012, IGP é um nome geográfico que identifica “um produto originário de um local ou região determinados, ou de um país, que possui uma determinada qualidade, reputação ou outras características que podem ser essencialmente atribuídas à sua origem geográfica e, em relação ao qual pelo menos uma das fases de produção tem lugar na área geográfica delimitada”.

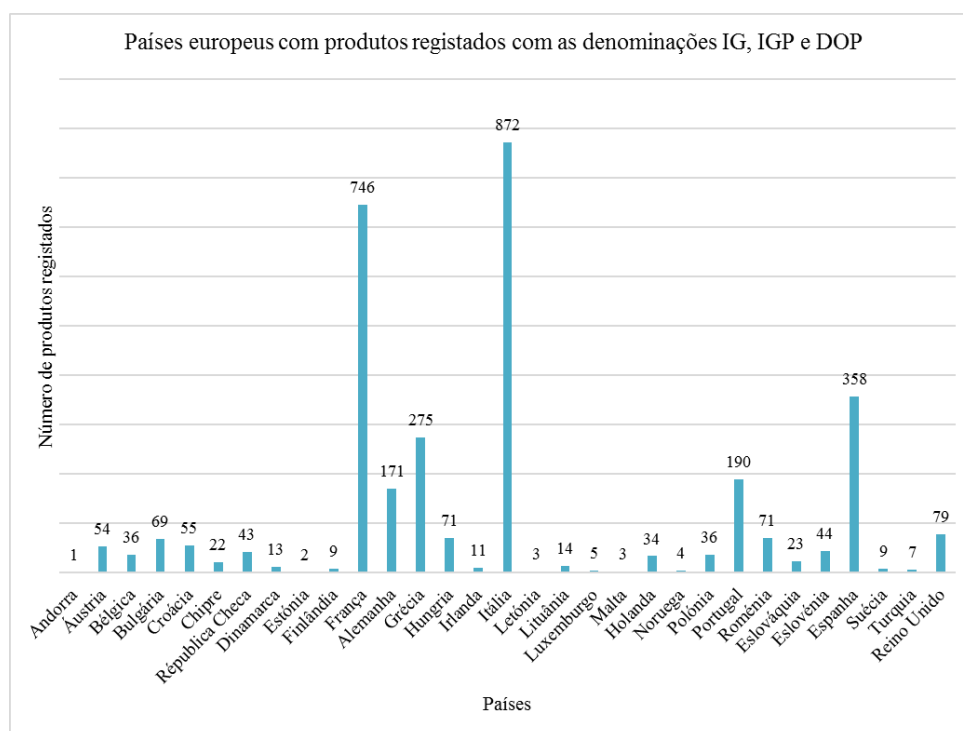


Figura 2 - Número de produtos registados por cada país europeu na base de dados eAmbrosia da Comissão Europeia (s.d. a).

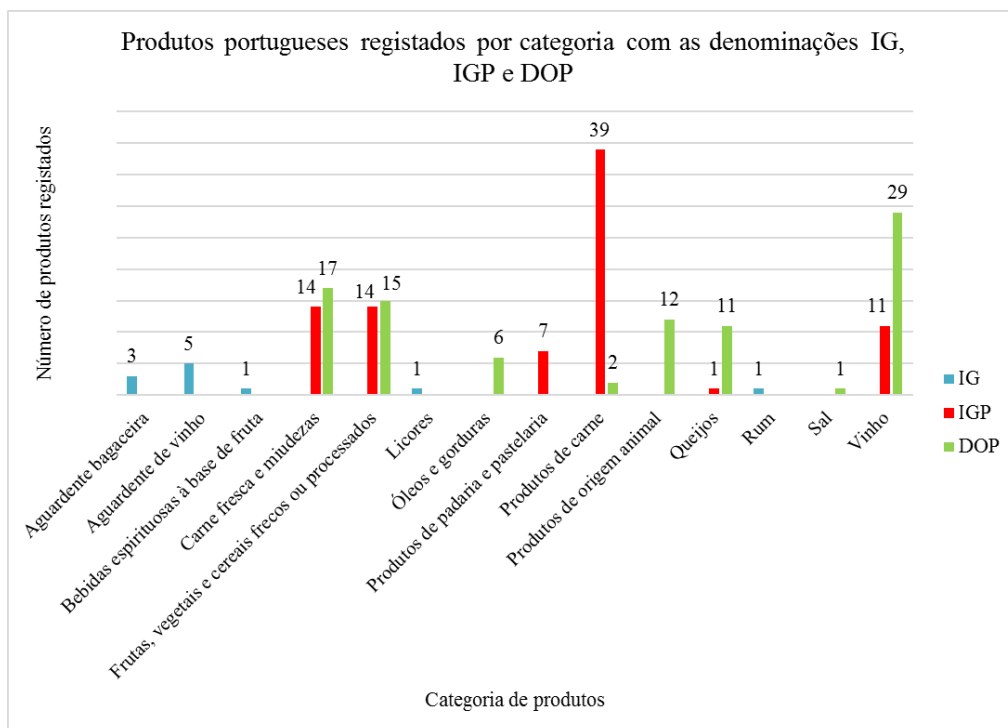


Figura 3 – Número de produtos portugueses registados por categoria na base de dados eAmbrosia da Comissão Europeia (s.d. a).

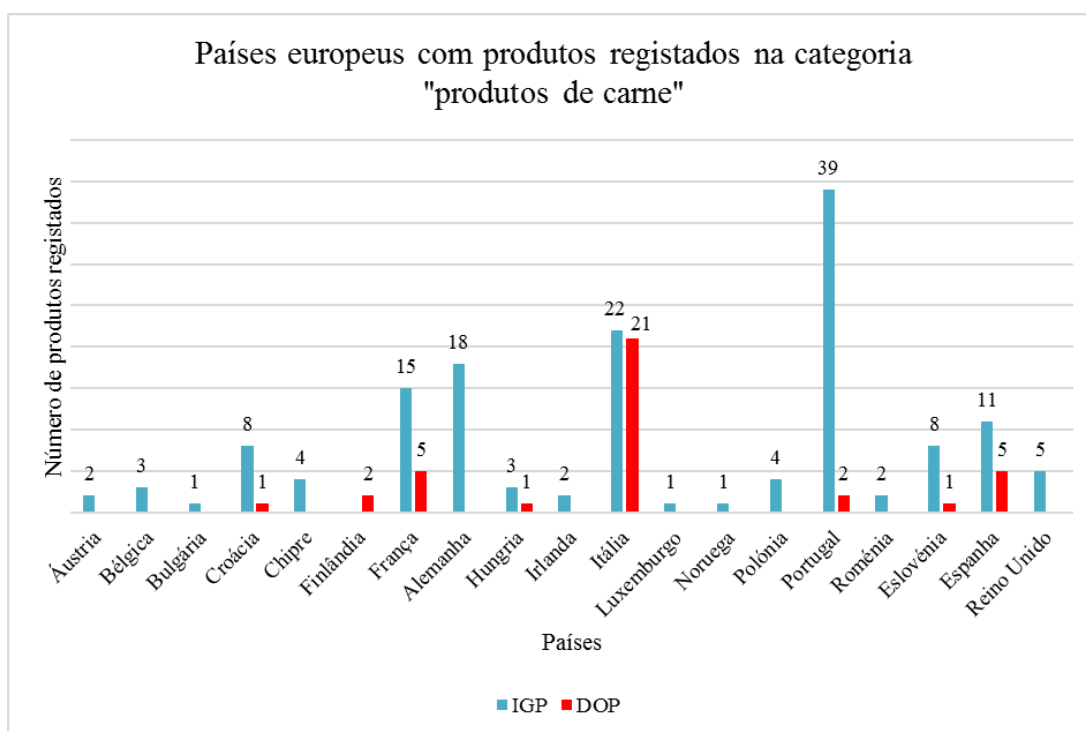


Figura 4 - Número de produtos registados por cada país europeu na categoria "produtos de carne" na base de dados eAmbrosia da Comissão Europeia (s.d. a).

Segundo os dados disponibilizados pelo Instituto Nacional de Estatística (2020), o consumo de carne e miudezas em Portugal tem vindo a aumentar desde o ano de 2014 (**Figura 5**), e os tipos de carne preferidos dos portugueses são as carnes de suíno e de animais de capoeira (**Figura 6**).

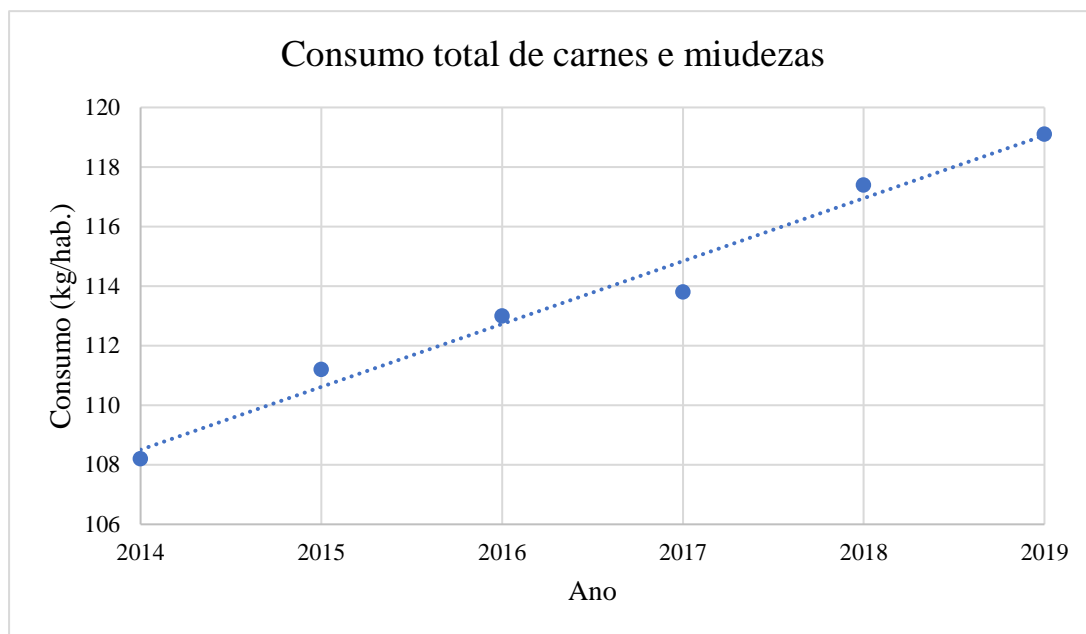


Figura 5 - Consumo total de carnes e miudezas em Portugal entre os anos 2014 e 2019 (INE, 2020).

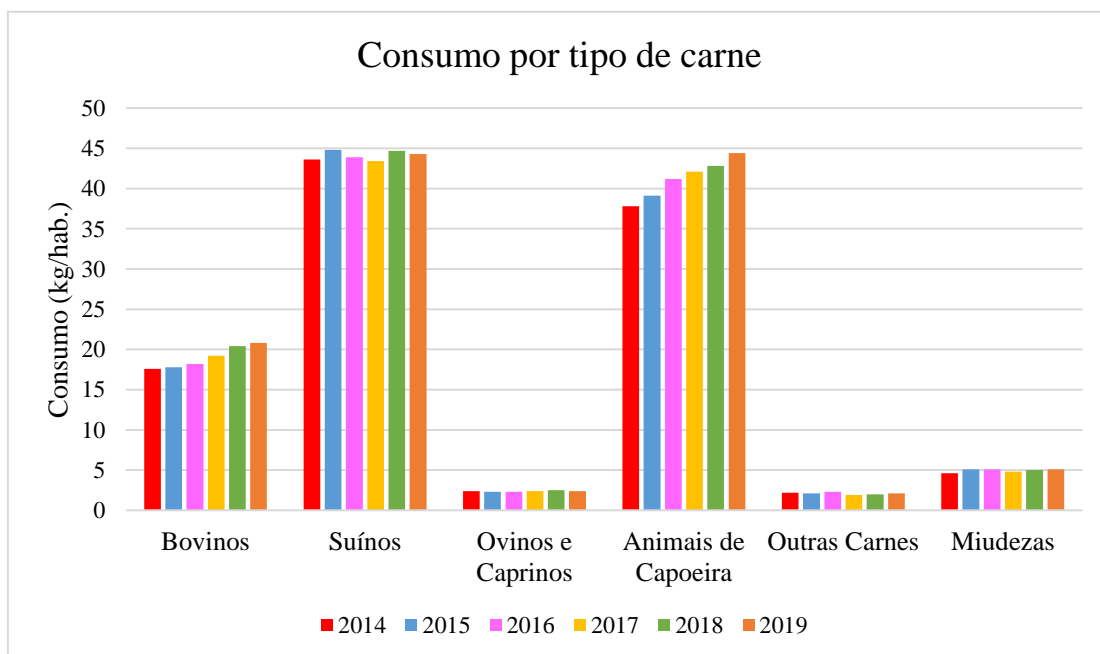


Figura 6 - Consumo por tipo de carne em Portugal entre os anos 2014 e 2019 (INE, 2020).

2.2. O porco Malhado de Alcobaça e a produção de chouriço

O porco Malhado de Alcobaça (**Figura 7**) é uma das três raças autóctones portuguesas, juntamente com o porco Alentejano e Bísaro, e resulta de cruzamentos entre o porco Bísaro e porcos ingleses das raças *Berkshire* e *Yorkshire* (Vicente, 2013).

Esta raça é caracterizada por serem animais de grande desenvolvimento e elevado peso quando adultos, boa qualidade da carne, boa percentagem de músculo, temperamento dócil, bom comportamento maternal e boa rusticidade (SPREGA, 2020).

Estes animais podem ser encontrados principalmente na região centro oeste de Portugal e em 2020 estavam inscritas no livro genealógico 211 fêmeas e 12 varrascos distribuídos por 11 criadores (SPREGA, 2020).

É uma raça que se encontra em vias de extinção, como tal, o desenvolvimento de novos produtos como o chouriço, poderiam ajudar a dar visibilidade e, conseqüente, interesse em revitalizar e preservar esta raça.



Figura 7 - Porco da raça Malhado de Alcobaça.

(retirado de: <http://vozdocampo.pt/2020/06/25/malhado-de-alcobaca/>)

Os enchidos fazem parte da cultura gastronómica portuguesa e o seu fabrico possibilita a utilização de todas as partes do porco, deste modo, são reduzidas as perdas e desperdícios alimentares, uma vez que, a partir de um único animal é possível produzir vários tipos de enchidos (Rocha & Elias, 2016).

Entre os diversos fatores que proporcionam esta diversidade de enchidos, estão as raças de porco, o tempo de fermentação e maturação, temperatura, haver ou não uma etapa de fumagem, entre outros (Rocha & Elias, 2016). Para obter um enchido de boa qualidade é essencial uma boa seleção da carne e dos restantes ingredientes. São produtos com uma alta

qualidade sensorial devido à qualidade das matérias-primas e do seu processo de fabrico tradicional o que lhes conferem propriedades organoléticas únicas (Abdolghafour & Saghir, 2014; Leši *et al.*, 2020).

Neste contexto a junção de uma raça autóctone com um processo de produção tradicional de chouriço permitem a produção de um produto de qualidade diferenciada, devido às características particulares do porco Malhado de Alcobaça, e de alto valor económico, além de aumentarem a rentabilidade de explorações agrícolas pela criação de produtos certificados.

2.3. Produção de chouriço

2.3.1. Ingredientes essenciais ao fabrico de chouriço

São diversos os ingredientes utilizados, estes ingredientes tanto têm importância nas características organoléticas como microbiológicas dos chouriços.

Os enchidos podem ser feitos com diversos tipos de carne, mas a mais comum é a carne de porco. As bactérias que aparecem predominantemente na carne fresca são bactérias aeróbias Gram-negativas, *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* e em menor quantidade aparecem bactérias lácticas e outras bactérias Gram-positivas (Toldrá *et al.*, 2015).

A gordura mais utilizada é o toucinho e este contribui para o sabor e textura dos chouriços (Holck *et al.*, 2017).

O sal é o maior aditivo nos produtos cárneos fermentados. Tem uma ação bacteriostática que é reforçada pela fumagem. É adicionado entre 2 e 4%, o que permite o crescimento das bactérias lácticas e inibe o crescimento de microrganismos indesejados. Auxilia na capacidade de emulsificação das proteínas da carne e na ligação da água. Contribui para realçar o sabor, para extrair as proteínas solúveis da carne (actina e miosina) proporcionando uma textura mais firme, segurança sanitária e aumento do prazo de validade (Mohan, 2014; Toldrá *et al.*, 2015; Holck *et al.*, 2017).

Os nitritos e nitratos contribuem para o sabor, para a formação da cor vermelha característica dos chouriços, atua como conservante, antibacteriano e antioxidante. Os nitritos ajudam na proteção contra microrganismos produtores da toxina botulínica e retardam o aparecimento de ranço. Segundo Silva *et al.*, (2018), os nitritos têm efeito na redução de *Enterobacteriaceae* durante a etapa de fumagem e ajudam no controlo dos patogénicos *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum*. Deve-se ter muito cuidado ao utilizar este

tipo de ingredientes, visto que, podem ser tóxicos se exagerada a dose adicionada durante a formulação do produto. Os nitratos não são tóxicos, no entanto, os nitritos e os compostos N-nitrosos podem provocar potenciais efeitos adversos à saúde, segundo a IARC, em condições que favorecem a nitrosação, os nitratos e nitritos são provavelmente cancerígenos para seres humanos (Mohan, 2014; Toldrá *et al.*, 2015; Holck *et al.*, 2017).

A presença de açúcar influencia o pH final, uma vez que, é usado como substrato durante a fermentação para que microrganismos desdobrem os açúcares em ácidos, reduzindo o pH, e contribuem para o desenvolvimento da textura, cor e sabor, neutralizando o sabor salgado, devido à presença de sal, e amargo, proveniente dos nitrificantes quando utilizados (Mohan, 2014; Toldrá *et al.*, 2015).

Na formulação do produto podem ser usados diversos tipos de especiarias como a pimenta preta, pimenta branca, cardamomo, mostarda, noz-moscada, gengibre, pimentão, alho, entre outros, estas são usadas para potenciar o sabor e têm propriedades antioxidantes, o que estimula o crescimento de bactérias lácticas (Toldrá *et al.*, 2015).

2.3.2. Processo tecnológico

São diversas as etapas envolvidas no processo tecnológico, também elas importantes para as características organolépticas e microbiológicas dos chouriços.

O corte da carne pode ser realizado à mão ou mecanicamente e tem como finalidade reduzir a carne e gordura a fragmentos mais pequenos. Quanto mais pequenos são os fragmentos mais rápida é a eliminação de água (Ribeiro & Dias, 2015; Laranjo & Elias, 2016).

À carne são adicionados os outros ingredientes resultando numa mistura denominada massa. Estes ingredientes dependem do tipo de enchido, da região do país onde são produzidos e têm propriedades não só organolépticas, mas também antioxidantes, antimicrobianas e gelificantes (Laranjo & Elias, 2016).

Durante a etapa de maturação o sal penetra nos fragmentos da carne, extraindo a água e as proteínas das fibras musculares, diminuindo assim a a_w , e existe desenvolvimento microbiano. A maturação pode durar um ou dois dias em processos industriais e três ou quatro dias em processos tradicionais, a temperaturas entre 0 e 5°C e humidade relativa entre 90 e 95% (Ribeiro & Dias, 2015; Laranjo & Elias, 2016).

O enchimento consiste em colocar a massa maturada num invólucro que pode ser natural como as tripas de porco ou vaca, ou semissintéticas feitas com colagénio. Os invólucros são de extrema importância, visto que, permitem dar a forma característica dos enchidos e proteger a massa do ambiente externo, nomeadamente, contaminações microbianas (Ribeiro & Dias, 2015; Laranjo & Elias, 2016).

A fumagem consiste em expor os enchidos ao fumo resultante da combustão de madeiras duras não resinosas, como azinho e sobro (Ribeiro & Dias, 2015; Laranjo & Elias, 2016).

A estabilização é realizada em câmaras com temperatura e humidade relativa controlada. Os valores destes parâmetros vão sendo alterados ao longo da estabilização. No início desta etapa a temperatura é de 18°C com humidade relativa de 98% e no final a temperatura é de 14°C com humidade relativa de 60% (Ribeiro & Dias, 2015).

O embalamento consiste em colocar o produto final dentro de uma embalagem como o plástico sob vácuo, embalagem em atmosfera modificada (com introdução de gases como o dióxido de carbono e/ou azoto), em lata, entre outros (Ribeiro & Dias, 2015).

2.4. Microbiota dos chouriços

2.4.1. Influência dos parâmetros intrínsecos e extrínsecos na microbiota dos chouriços

Existem diversos fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam a sobrevivência ou não dos microrganismos nos alimentos. Alguns dos fatores mais importantes são a temperatura, o pH e a atividade de água, estes podem ser ajustados de modo a prevenir o crescimento microbiano, no entanto, não se pode confundir a capacidade de crescimento em ambientes desfavoráveis com a capacidade de sobrevivência dos microrganismos. Além dos fatores mencionados anteriormente, existem outros fatores que podem determinar o crescimento/presença de microrganismos como, o potencial redox, o tipo de embalagem, composição atmosférica utilizada dentro da embalagem, composição nutricional e humidade relativa (Húngaro *et al.*, 2014).

A carga microbiana dos chouriços é influenciada pela microbiota natural presente nos ingredientes, pela temperatura, pH e a_w (Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2016). As bactérias são mais sensíveis ao pH que os fungos filamentosos e leveduras, e as bactérias patogénicas são ainda mais sensíveis. A atividade de água está relacionada com a quantidade de água disponível para as reações metabólicas dentro das células. Ao reduzir a atividade de água

para valores abaixo dos valores ótimos reduz-se a taxa de crescimento, uma vez que, provoca *stress* osmótico nas células dos microrganismos (Húngaro *et al.*, 2014).

O pH baixo diminui a capacidade de retenção de água permitindo a desidratação dos chouriços e consequente diminuição da a_w (Degenhardt & Sant'Anna, 2007).

Uma das maneiras de abrandar o crescimento microbiano nos alimentos é armazená-los a baixas temperaturas, no entanto, apenas inibe o crescimento de microrganismos mesófilos e termófilos e não dos psicrotróficos. Os microrganismos psicrotróficos podem ser inibidos através de outros fatores intrínsecos e extrínsecos (Húngaro *et al.*, 2014). Para controlar e eliminar os microrganismos patogénicos pode-se otimizar a formulação dos chouriços e dos parâmetros do processo (Holck *et al.*, 2017).

Para diminuir a contaminação por *Enterobacteriaceae* e microrganismos patogénicos, é de extrema importância controlar a qualidade dos ingredientes utilizados durante a formulação do produto, garantir a higienização dos equipamentos e utensílios utilizados e garantir que as boas práticas de higiene são cumpridas por parte dos operadores (Silva *et al.*, 2018).

Em produtos fermentados como o chouriço é comum a microbiota deteriorante ser constituída por bactérias do género *Staphylococcus* e algumas bactérias lácticas (Húngaro *et al.*, 2014).

2.4.2. Origem e evolução da microbiota nos chouriços

Existem alguns pontos cruciais durante a produção de chouriço, desde a produção dos animais até ao produto final, que podem impedir o acesso de microrganismos aos alimentos, impedir o seu crescimento ou inativá-los. Os microrganismos podem ser impedidos de chegar aos alimentos através de boas práticas de manejo, boas práticas de fabrico, condições higiénicas adequadas durante o abate dos animais e durante o processamento. Podem ser inibidos através da redução da a_w e do pH, através da adição de inibidores de crescimento como são o caso dos nitratos e nitritos ou da presença de bacteriocinas, através da competição entre microrganismos, do armazenamento a baixas temperaturas e através do embalamento, sob vácuo ou em embalagem de atmosfera modificada. Para inativar microrganismos podem ser usados métodos de conservação, como é o caso da fumagem ou tecnologias emergentes, como é o caso das altas pressões (Húngaro *et al.*, 2014). No entanto, muitos pontos são também cruciais para a introdução de populações microbianas que marcam a evolução do chouriço e determinam a sua qualidade/estabilidade e segurança enquanto produto final.

Antes do abate dos porcos é realizada uma inspeção para separar os porcos que se encontram sujos e visivelmente doentes, no entanto, esta operação não previne o abate de porcos que sejam portadores de microrganismos patogénicos no intestino e pele. Estas duas partes do porco são particularmente importantes em termos microbiológicos, no intestino, por exemplo, podem ser encontradas salmonelas que são provenientes da alimentação dos animais, já a pele tem uma grande carga microbiana originária da flora natural e dos microrganismos adquiridos no ambiente onde cresceram, no transporte e no matadouro (ICMFS, 2006).

Após a inspeção, o abate de porcos consiste em atordoamento, sangria, lavagem do animal, escaldão, depilação, secagem, chamuscagem, raspagem, lavagem, evisceração e lavagem. O escaldão e a chamuscagem reduzem a carga microbiana da pele, dependendo do tempo e temperatura utilizados durante estas etapas. A refrigeração das carcaças após o abate evita o crescimento de microrganismos mesófilos e reduz o crescimento de microrganismos psicrófilos causadores de deterioração e patogénicos (ICMFS, 2006).

A carne é um alimento perecível, cuja a_w é cerca de 0,99 e o pH é cerca de 5,5, dependendo do animal e do músculo, e é rica em proteínas e minerais, com estas características a carne torna-se num excelente substrato para o crescimento de microrganismos deteriorantes como *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, bactérias lácticas e bolores e leveduras (ICMFS, 2006; Holck *et al.*, 2017). Alguns microrganismos patogénicos que podem estar presentes na carne são as bactérias *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*, mas também podem ser encontrados parasitas como *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* e *Taenia saginata* (ICMFS, 2006).

O desenvolvimento e tipo de microbiota dependem da formulação dos chouriços e práticas tecnológicas aplicadas. Existem diversas espécies de microrganismos presentes durante as várias fases do processo tecnológico. Estas tanto podem ser benéficas para o desenvolvimento do produto como deteriorá-lo e podem constituir um perigo para a saúde dos consumidores, uma vez que, certos microrganismos podem produzir toxinas, micotoxinas e aminas biogénicas (Lauková *et al.*, 2011; Toldrá *et al.*, 2015; Holck *et al.*, 2017).

Na produção de chouriços é comum serem utilizados conservantes como os nitritos ou nitratos para inibir o crescimento microbiano e para ajudar no desenvolvimento das

características organolépticas, no entanto, estes conservantes não devem ser consumidos em excesso devido, principalmente, à formação de nitrosaminas, que são consideradas substâncias cancerígenas, por isso, a procura por soluções naturais, como as bacteriocinas, é cada vez mais comum, além disso, é também uma maneira de ir ao encontro daquilo que os consumidores procuram atualmente, alimentos menos processados e com menos conservantes (Da Costa *et al.*, 2019).

A microbiota que participa na fermentação e maturação dos chouriços tem origem nos ingredientes, nos equipamentos e no meio ambiente. Nos enchidos produzidos tradicionalmente ocorre fermentação espontânea, no entanto, podem-se adicionar, juntamente com os ingredientes, culturas *starter*. Os principais responsáveis pelo processo fermentativo são as bactérias lácticas e *Staphylococcus* coagulase negativa, como *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus* ou *Staphylococcus equorum*. Em alguns estudos foi demonstrado que estas culturas podem ajudar na redução da presença de microrganismos patogénicos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (Milicevic *et al.*, 2014; Rocha & Elias, 2016; Holck *et al.*, 2017; Laranjo *et al.*, 2017).

Segundo Bhuyan *et al.* (2018), a fumagem pode ser definida como o processo onde os compostos voláteis resultantes da combustão da madeira penetram os produtos cárneos. É um dos métodos mais antigos de conservação, que permite a inibição do crescimento de fungos e bactérias na superfície do produto, permite prolongar o prazo de validade, além disso, permite que os chouriços desenvolvam um sabor característico e atrasa a oxidação lipídica. Quando a madeira é queimada liberta uma série de compostos como água, monóxido de carbono, dióxido de carbono, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, óxidos de nitrogénio, fenóis, entre outros (Mohan, 2014; Holck *et al.*, 2017). Apesar destes compostos apresentarem uma toxicidade e concentração nos produtos baixa, os produtos fumados não devem ser consumidos frequentemente, principalmente, devido ao facto de serem libertados hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) durante a fumagem (Holck *et al.*, 2017; Bhuyan *et al.*, 2018). Alguns HAP são considerados carcinogénicos, mutagénicos e teratogénicos, por isso, os tempos e temperaturas são essenciais para garantir a segurança dos enchidos (Rocha & Elias, 2016).

Os chouriços são produtos estáveis em prateleira, uma vez que, reúnem um conjunto de características que não permitem que se degradem facilmente, como, baixo pH

(consequência da fermentação dos açúcares em ácido láctico), baixa atividade de água (conseguida através da salga e da evaporação da água durante a fumagem), através da adição de nitrificantes, que inibem o crescimento microbiano, e da criação de uma atmosfera anaeróbia por meio do embalamento sob vácuo, no entanto, qualquer falha no processo pode resultar num enchido potencialmente perigoso para o consumidor (Elias *et al.*, 2006; Marcos *et al.*, 2016; Alfaia *et al.*, 2015; Holck *et al.*, 2017). No entanto, o facto de serem estáveis em prateleira não significa que sejam seguros, porque, apesar de ser muito difícil os microrganismos patogénicos crescerem no produto acabado, devido às suas características, são capazes de sobreviver por longos períodos e multiplicar-se em número suficiente para causar doença (Holck *et al.*, 2017).

2.5. Microrganismos indicadores e controlo microbiológico

2.5.1. Indicadores de qualidade

Os microrganismos a 30°C ou microrganismos aeróbios totais, têm uma temperatura ótima de crescimento de 30°C - 37°C e uma temperatura mínima de, aproximadamente, 7°C. Os valores de microrganismos totais são mais elevados no caso de utilização de matérias-primas de baixa qualidade, má higienização de superfícies, contaminações cruzadas, falhas no tratamento térmico ou na cadeia de frio e à medida que o tempo de armazenamento aumenta (Saraiva *et al.*, 2019). Uma maneira de retardar o crescimento de microrganismos aeróbios é retirar o oxigénio através de embalamento sob vácuo (HPA, 2009). Este grupo microbiano é considerado um indicador de qualidade/alteração e, por isso, é um dos mais analisados e encontrados em diversos estudos realizados a enchidos, sendo que, os seus valores variam entre cerca de 4 a 8 log u.f.c/g (Capita *et al.*, 2006; Elias & Carrascosa, 2010; Bhuyan *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2020; Fraqueza *et al.*, 2020).

As bactérias lácticas são caracterizadas por serem Gram-positivas, anaeróbias facultativas, não patogénicas, produtoras de ácido láctico, o que permite a acidificação do produto (diminuição do pH). São essenciais em processos de fermentação, no entanto, podem ser causadoras de deterioração. O ácido atua nas proteínas da carne alterando a sua capacidade de absorção de água, contribuindo assim para a textura, sabor, aroma e humidade dos enchidos. Além de ajudarem a desenvolver as características sensoriais dos enchidos, as bactérias lácticas também ajudam a desenvolver as suas características nutricionais. Têm capacidade de crescerem a temperaturas de refrigeração e em alimentos embalados em atmosfera modificada (com ou sem dióxido de carbono e sob vácuo). São bactérias

disseminadas no meio ambiente e podem estar presentes em locais húmidos, refrigerados e não higienizados corretamente. As bactérias lácticas provocam alterações sensoriais e são essenciais em processos de fermentação. Podem ser utilizadas como culturas *starter* e são consideradas culturas protetoras, uma vez que, produzem peptídeos antimicrobianos denominados bacteriocinas que irão inibir o crescimento de microrganismos patogénicos, como *Listeria monocytogenes*, e microrganismos deteriorantes, melhorando assim a qualidade e segurança do produto. Durante a fermentação dos chouriços, as bactérias lácticas absorvem oxigénio, diminuindo o potencial redox e transformando o nitrito para prevenir o crescimento de bactérias patogénicas e de deterioração (Metaxopoulos *et al.*, 2002; Rantsiou *et al.*, 2005; Aymerich *et al.*, 2006; Degenhardt & Sant'Anna, 2007; Milicevic *et al.*, 2014; Laranjo *et al.*, 2017; Saraiva *et al.*, 2019). Este grupo é considerado indicador de qualidade/alteração e em outros estudos os seus valores variam entre cerca de 6 a 9 log u.f.c/g (Capita *et al.*, 2006; Elias & Carrascosa, 2010; Alfaia *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2020; Fraqueza *et al.*, 2020).

As bactérias lácticas mais comuns nos chouriços são *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum*, estas são indicadores de qualidade do produto e desempenham um papel fundamental durante a fermentação dos chouriços, ajudando a melhorar as qualidades higiénicas e sensoriais do produto final. São responsáveis pela produção de ácido láctico e, conseqüente, diminuição do pH, o que contribui para a estabilidade e segurança microbiológica do produto, uma vez que, esta acidificação está relacionada com a inibição e/ou inativação de microrganismos indesejados. Além disso, podem ter um efeito positivo para a saúde humana, uma vez que, estas bactérias são comumente encontradas no trato gastrointestinal (Ferreira *et al.*, 2009; Milicevic *et al.*, 2014; Toldrá *et al.*, 2015; Rocha & Elias, 2016).

Os bolores e leveduras são fungos que têm capacidade de se desenvolverem em condições adversas, nomeadamente, baixas temperaturas, baixos valores de pH (acidez) e baixa atividade de água. A maioria dos bolores são aeróbios estritos, enquanto as leveduras são aeróbias facultativas. Estes microrganismos podem ser transferidos para os produtos alimentares através de equipamentos ou através de contaminação pelo ar. Os bolores são capazes de crescer em amplas faixas de pH, a_w e temperatura, e utilizam uma grande variedade de substratos como alimento. Tanto podem conferir características únicas ao produto, como podem ser indicadores de deterioração, neste último caso, a sua presença pode significar uma mudança de cor, de sabor, odor, presença de micélios e presença de

micotoxinas. O crescimento dos bolores está associado a produtos com longos períodos de fermentação. Estes têm como principais características a atividade proteolítica e a redução do ácido lático, contribuindo assim para as características organoléticas dos enchidos. As leveduras produzem enzimas extracelulares, tais como proteases, lipases, amílases e pectinases, e metabolitos voláteis e não voláteis que afetam as características organoléticas finais do produto. A sua origem pode estar relacionada com o meio ambiente e com a matéria-prima, e são responsáveis pela deterioração de produtos com altos teores de açúcar e sal, e baixo pH (Rantsiou *et al.*, 2005; Húngaro *et al.*, 2014; Milicevic *et al.*, 2014; Laranjo *et al.*, 2017; Saraiva *et al.*, 2019). Este grupo é considerado indicador de qualidade/alteração e em outros estudos os seus valores são inferiores a 5 log u.f.c/g (Capita *et al.*, 2006; Alfaia *et al.*, 2015; Elias & Carrascosa, 2010; Dias *et al.*, 2020). Os bolores e leveduras têm um papel importante nas qualidades organoléticas, uma vez que, as suas atividades metabólicas são essenciais à cor, textura, aroma e sabor dos chouriços (Aymerich *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009; Toldrá *et al.*, 2015; Holck *et al.*, 2017).

2.5.2. Indicadores de higiene e segurança

Enterobacteriaceae é uma família de bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas originárias dos tratos gastrointestinais dos seres humanos e animais, mas também em plantas e no meio ambiente. Estas bactérias são sensíveis a tratamentos térmicos, ou seja, a sua presença em alimentos que sofreram tratamento térmico significa que este foi insuficiente ou inadequado ou que houve contaminação posterior (HPA, 2009; Saraiva *et al.*, 2019).

O grupo de *Staphylococcus* pode ser dividido em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus* coagulase negativa. A preocupação da presença destes microrganismos recai sobre algumas espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva que podem produzir enterotoxinas responsáveis por causar doenças relacionadas com a ingestão de alimentos. Estas bactérias são mortas através do calor, no entanto, as enterotoxinas produzidas por elas são estáveis na presença de calor, ou seja, a toxina pode estar ativa mesmo na ausência de microrganismos viáveis. A maioria de *Staphylococcus* coagulase positiva cresce a temperaturas entre 7°C e 48°C (HPA, 2009). *Staphylococcus* coagulase positiva é considerado indicador de segurança e as contagens destes microrganismos devem ser inferiores a 1 log u.f.c/g em alimentos prontos para consumo (Saraiva *et al.*, 2019).

Relativamente a *Staphylococcus* coagulase negativa, são bactérias que contribuem para a segurança e qualidade dos enchidos. Participam no desenvolvimento e estabilidade da cor

vermelha característica dos chouriços, na proteólise e lipólise e minimizam a oxidação lipídica, produzem várias substâncias aromáticas, as suas atividades catabólicas também poderão ajudar no desenvolvimento do sabor e têm capacidade para reduzir a quantidade de nitrato presente nos chouriços. Também podem ser utilizados como culturas *starter* (Rantsiou *et al.*, 2005; Milicevic *et al.*, 2014; Rocha & Elias, 2016; Laranjo *et al.*, 2017). *Staphylococcus* coagulase negativa, como *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus*, contribuem para o desenvolvimento do sabor, formação da cor da cor vermelha, redução de nitratos e nitritos e limita a oxidação lipídica (Milicevic *et al.*, 2014; Holck *et al.*, 2017). Este grupo poderá ser considerado indicador de qualidade, devido ao seu papel no fabrico de enchidos. Em outros estudos os seus valores variam entre cerca de 4 a 5 log u.f.c/g (Alfaia *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2020; Fraqueza *et al.*, 2020).

As bactérias do género *Salmonella* spp. são microrganismos patogénicos com grande expressão em animais e humanos. São Gram-negativas e anaeróbias facultativas. Os animais infetados são a principal origem de *Salmonella* e a sua transmissão para os alimentos pode ocorrer através de contaminação cruzada e contaminação fecal. Este microrganismo pode ser controlado através de algumas técnicas aplicadas durante o processamento, como, a utilização de culturas *starter*, controlo do pH, aumento da temperatura do produto durante a fermentação, teor de sal, e pode ser eliminado através de tratamento térmico. Para evitar a contaminação cruzada e a multiplicação de bactérias viáveis, capazes de provocar infeção, é importante a aplicação de boas práticas de higiene e controlar o tempo e temperatura de preparação de alimentos (HPA, 2009; Mohan, 2014; Holck *et al.*, 2017). Este grupo é considerado indicador de higiene e segurança e não deve ser detetado em alimentos prontos para consumo (Saraiva *et al.*, 2019).

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogénica, Gram-positiva, anaeróbia facultativa, de distribuição ubiqüitária, isto é, têm uma ampla distribuição no ambiente, matérias-primas, equipamentos, entre outros, e que provoca listeriose, uma doença que pode ser fatal em grupos vulneráveis (mulheres grávidas, imunodeprimidos, idosos, entre outros). Pode crescer a temperaturas inferiores a 0°C até 45°C, sendo que o seu crescimento é mais lento a temperaturas de refrigeração, é sensível ao calor, o que indica que, se a bactéria aparecer nos alimentos após tratamento térmico, este foi insuficiente ou inadequado ou que houve contaminação posterior. Durante a fermentação a presença de *Listeria monocytogenes* tende a diminuir devido às características do processo de fabrico do chouriço, no entanto, pode ser encontrada devido à sua capacidade de sobreviver em condições adversas (Degenhardt &

Sant'Anna, 2007; HPA, 2009; Holck *et al.*, 2017; Saraiva *et al.*, 2019). Este grupo é considerado indicador de segurança e não deve ser detetado em alimentos prontos para consumo (Saraiva *et al.*, 2019).

As bactérias do género *Clostridium* são anaeróbias e capazes de formar esporos. Constituindo parte integrante da microbiota intestinal de animais e humanos, a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores pode ser considerado como um indicador primário da presença do clostrídios patogénicos, nomeadamente *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* (ICMFS, 2006).

2.5.3. Controlo microbiológico e prevalência de alguns grupos microbianos em enchidos

Capita *et al.*, (2006), realizaram análises microbiológicas a chouriços espanhóis, onde foram analisados e encontrados microrganismos a 30°C, microrganismos psicrotróficos, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, bactérias lácticas, *Micrococcaceae*, bolores e leveduras e *Pseudomonas spp.*

Elias e Carrascosa (2010), realizaram análises físico-químicas e microbiológicas aos ingredientes e durante o processo de fabrico de paios alentejanos produzidos em duas fábricas, uma onde é realizada fumagem e outra não. Relativamente às análises microbiológicas, foram analisados e encontrados microrganismos a 30°C, microrganismos psicrotróficos, bolores e leveduras, bactérias lácticas, *Micrococcaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Streptococcus* do grupo D.

Alfaia *et al.*, (2015), realizaram análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, a enchidos submetidos a tratamento de altas pressões. Os grupos microbianos analisados e encontrados foram *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, bactérias lácticas, *Staphylococcus* catalase positiva, *Enterococcus spp.* e bolores e leveduras.

Bhuyan *et al.*, (2018), realizaram um estudo onde efetuaram análises físico-químicas, nutricionais, sensoriais e microbiológicas a enchidos de porco tratados com fumagem tradicional e com fumo líquido. Foram realizadas contagem de microrganismos a 30°C, contagem de microrganismos psicrotróficos e contagem de bolores e leveduras, sendo que, foram encontrados microrganismos a 30°C e no caso dos microrganismos psicrotróficos houve crescimento, no entanto, foi um crescimento abaixo do que é possível contar.

Num estudo, cujo objetivo era avaliar o efeito de culturas *starter* autóctones na segurança e qualidade de painhos da Beira Baixa preservando a qualidade sensorial, Dias *et al.*, (2020), realizaram análises microbiológicas a microrganismos a 30°C, microrganismos psicrotróficos, bactérias lácticas, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras e *Listeria monocytogenes*, todos estes grupos presentes no produto final, também foram realizadas análises a *Salmonella* spp., no entanto, não foi encontrada no produto acabado.

Num estudo de Fraqueza *et al.*, (2020), cujo objetivo foi otimizar a etapa de fumagem de enchidos tradicionais para diminuir a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, foram analisados e encontrados microrganismos a 30°C, bactérias lácticas, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Enterobacteriaceae*.

De um modo geral os grupos microbianos mais analisados e encontrados em enchidos são microrganismos a 30°C, bactérias lácticas, bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus*.

3. Material e Métodos

3.1. Material

A matéria-prima teve origem no abate e desmancha de duas porcas da raça Malhado de Alcobaça, criadas na exploração da Escola Superior Agrária de Santarém. O processo de produção de chouriço (**Figura 8**) foi repetido três vezes ao longo do tempo, dando origem a três lotes independentes a partir da mesma matéria-prima (processos I, II e III). A formulação utilizada na massa e as condições de produção são apresentadas nos **Quadros 1 e 2**, respetivamente.

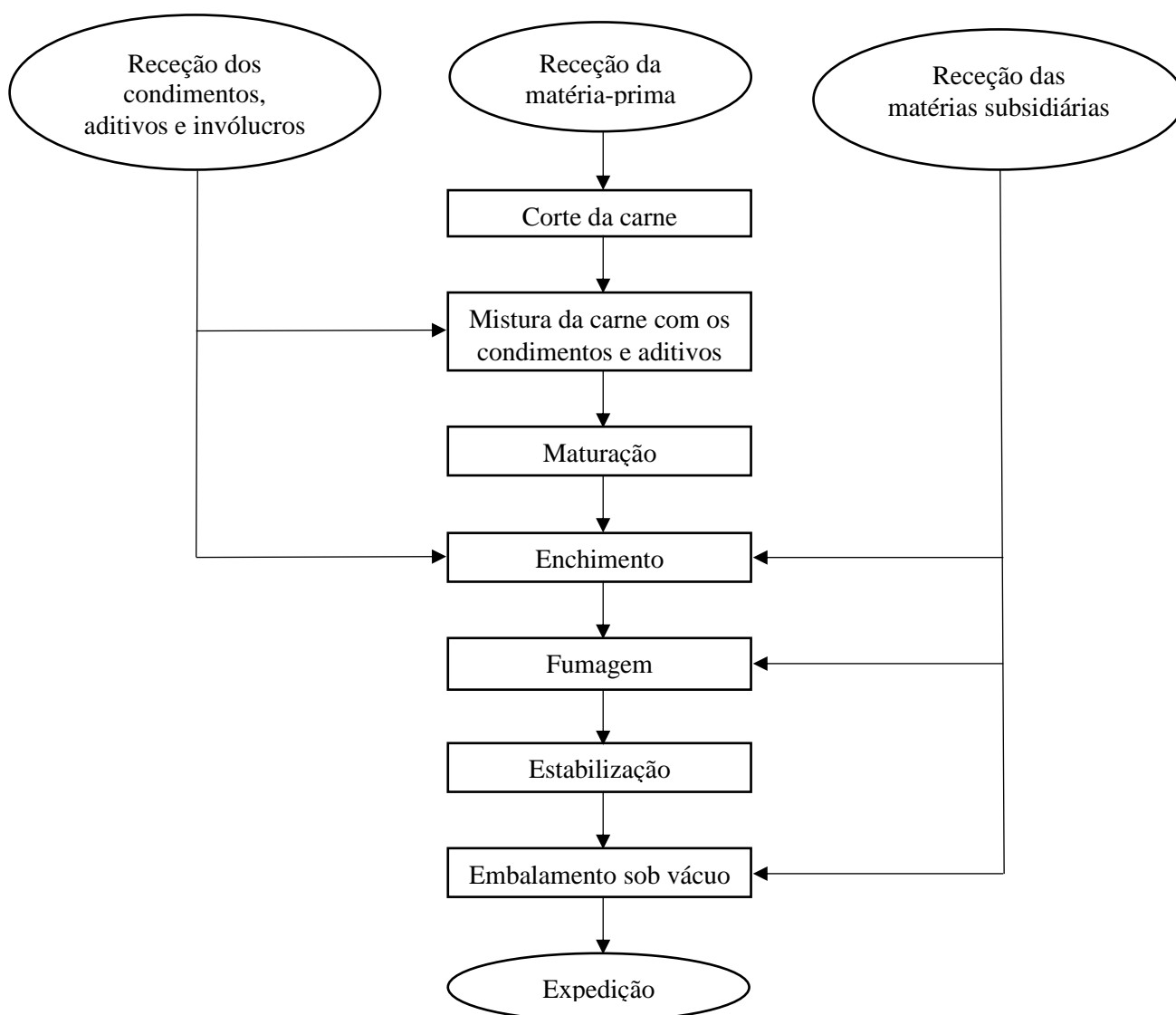


Figura 8 - Fluxograma do processo de produção de chouriço.

Quadro 1 - Ingredientes e quantidades (em gramas e porcentagem) utilizadas na formulação da massa dos chouriços.

Ingredientes	Quantidade (gramas)	Quantidade (%)
Carne entremeada (70% carne magra e 30% gordura/toucinho)	10 000	87,01
Água	700	6,09
Sal	188	1,64
Massa de pimentão	400	3,48
Pimento doce (colorau)	40	0,35
Alho em massa	115	1,00
Nitrificante (Palatinato Acur)	36	0,31
Total de massa	11 493	100,00

Quadro 2 - Descrição das condições de produção nas respectivas etapas.

Etapas	Descrição
Receção das matérias-primas	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
Armazenamento das matérias-primas	$0^{\circ}\text{C} - 3^{\circ}\text{C}$
Corte da carne e gordura/toucinho	$\leq 12^{\circ}\text{C}$
Mistura da carne com os condimentos e aditivos	$\leq 12^{\circ}\text{C}$
Maturação	Aproximadamente 72 horas a $4^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$ e 80% - 95% de humidade relativa
Enchimento	$\leq 12^{\circ}\text{C}$
Fumagem tradicional com lenha de sobreiro	Durante 4 dias a $10,5^{\circ}\text{C} - 48,4^{\circ}\text{C}$ e 31,7% - 84,8% de humidade relativa até se atingir 38% - 40% de perda de peso inicial
Estabilização	Durante 24 horas a $14,2^{\circ}\text{C} - 19,8^{\circ}\text{C}$ e 58,2% - 74,7% - 84,8% de humidade relativa
Embalamento	Sob vácuo

3.2. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com as normas ISO e NP, para a avaliação das populações microbianas totais (microrganismos a 30°C , bactérias lácticas, bolores e leveduras), microrganismos indicadores de higiene (*Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus coagulase positiva*) e microrganismos indicadores de segurança (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e esporos de clostrídios sulfito-redutores).

Para a análise microbiológica foram utilizadas amostras compostas a partir de cinco unidades de 10 g, no caso da carne, após abate, desmancha e corte manual, e massa; para cada uma

das etapas de produção de pré-fumeiro, pós-fumeiro e embalado sob vácuo após 3 e 6 meses, cada amostra composta foi constituída por 3 chouriços. Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicado, com exceção da análise microbiológica da matéria-prima.

3.2.1. Preparação das amostras e diluições

A preparação das amostras para a análise microbiológica decorreu de acordo com a ISO 6887-1:2017. Para os microrganismos analisados, exceto *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, foram colocadas 25 g de amostra em 225 ml de Triptona Sal (Biokar - Pantin, França), que foram homogeneizadas num Stomacher® 400 Circulator (Seward - Worthing, Reino Unido) durante 30 segundos a 230 r.p.m (**Figura 9**), esta foi a diluição -1. Para as restantes diluições realizadas, transferiu-se 1 ml da diluição anterior para 9 ml de soro fisiológico.



Figura 9 – Stomacher® 400 Circulator.

(retirado de: <https://pt.vwr.com/store/product/11702611/homogeneizador-de-laboratorio-stomacher-400-circulator#gallery>)

3.2.2. Contagem de microrganismos a 30°C

A contagem dos microrganismos a 30°C foi realizada de acordo com a ISO 4833-1:2013. Foram feitas sementeiras de 1 ml por incorporação no meio PCA (HiMedia - Mumbai, Índia), e posterior selagem com Agar Branco (Biolife - Monza, Itália), 1 placa por diluição. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 a 72 horas.

3.2.3. Contagem de bactérias lácticas

A contagem de bactérias lácticas foi realizada de acordo com a ISO 13721:1995. Foram feitas sementeiras de 1 ml por incorporação no meio MRS Agar (Biolife - Monza, Itália) e posterior selagem com o mesmo meio, 1 placa por diluição. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 30°C durante 48 horas.

3.2.4. Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi realizada de acordo com a ISO 21527-2:2008. Foram feitas sementeiras de 1 ml por espalhamento à superfície no meio DRBC Chloramphenicol Agar (Biolife - Monza, Itália), 3 placas por diluição. As placas foram incubadas a 25°C durante 5 dias.

3.2.5. Contagem de *Enterobacteriaceae*

A contagem de *Enterobacteriaceae* foi realizada de acordo com a ISO 21528-2:2017. Foram feitas sementeiras de 1 ml por incorporação no meio VRBGA (VWR Chemicals - Radnor, EUA), e posterior selagem com o mesmo meio, 1 placa por diluição. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas.

3.2.6. Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

A contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* foi realizada de acordo com a ISO 6888-1:1999. Foram feitas sementeiras de 0,1 ml por espalhamento à superfície no meio Baird Parker Agar (Liofilchem - Roseto degli Abruzzi, Itália), 1 placa por diluição. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas. Posteriormente, foram selecionadas 5 colônias características e foi realizado o teste da coagulase, recorrendo ao teste imunológico Pastorex (Bio-Rad - Marnes-la-Coquette, França).

3.2.7. Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores

A pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi realizada de acordo com a NP 2262:1986. Colocou-se 10 ml da diluição -1 num tubo identificado com [d] e 1 ml por cada tubo, das restantes diluições (incluindo a -1) em tubos identificados com [s]. Estes tubos foram colocados em banho-maria a 80°C durante 15 minutos, seguido de um arrefecimento rápido para eliminar as células vegetativas. De seguida, foi colocado o meio SPS Agar (Liofilchem - Roseto degli Abruzzi, Itália), [d] e [s] nos respetivos tubos. Os tubos foram incubados a 37°C durante 5 dias.

3.2.8. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada de acordo com a ISO 6579-1:2017. Foram colocadas 25 g num frasco com 225 ml de água peptonada (Biokar - Pantin, França). O frasco foi incubado a 37°C durante 24 horas. Após este período de incubação, transferiu-se 1 ml do frasco para um tubo com 10 ml de MKTTn (Biokar - Pantin, França), que foi incubado a 37°C durante 24 horas, e transferiu-se 0,1 ml do frasco para um tubo com 10 ml de Rappaport-Vassiliadis (bioMérieux - Craponne, França), que foi incubado a 42°C durante 24

horas. Posteriormente fez-se riscado em placas SMID (Scharlau - Barcelona, Espanha) e XLD (Scharlau - Barcelona, Espanha), que foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

3.2.9. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada de acordo com a ISO 11290-1:2017. Foram colocadas 25 g de amostra num frasco de 225 ml de caldo Half Fraser (Biokar - Pantin, França). O frasco foi incubado a 30°C durante 24 horas. Depois passou-se 0,1 ml do frasco para um tubo com 10 ml de caldo Fraser (Biokar - Pantin, França), este foi incubado a 37°C durante 48 horas. Posteriormente fez-se riscado em placas Rapid L.mono (Bio-Rad - Marnes-la-Coquette, França), que foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

3.3. Análises físico-químicas

3.3.1. Preparação da amostra

As análises ao pH e à a_w foram realizadas após a etapa de fumagem dos 3 processos tecnológicos. Foi selecionado um chouriço e cortou-se 15 rodelas, retirou-se a tripa e triturou-se com uma picadora até formar uma pasta.

3.3.2. pH

O pH foi determinado, de acordo com o método descrito na ISO 2917:1999, através de um potenciômetro FiveEasy pH meter F20-Std-Kit (Mettler Toledo - Greifensee, Suíça), com um elétrodo da mesma marca indicado para amostras de carne (**Figura 10**).

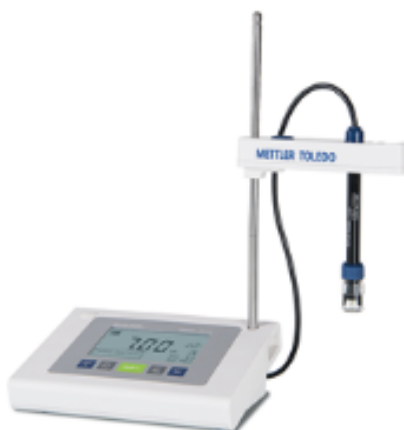


Figura 10 - Potenciômetro.

(retirado de: https://www.mt.com/int/pt/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/pH-meter/benchttop-pH-meter/fiveeasy/F20-Standard-Kit.html)

3.3.3. Atividade de água

A a_w foi medida através de um medidor Novasina LabSwift-AW (Novasina - Lachen, Suíça) (Figura 11).



Figura 11 - Medidor de atividade de água.

(retirado de: <https://www.coleparmer.com/p/novasina-labswift-portable-water-activity-meter/62236>)

4. Resultados e Discussão

O **Quadro 3** apresenta os resultados da análise à matéria-prima cortada manualmente (carne de porco Malhado de Alcobaça).

Quadro 3 - Resultados obtidos na análise da matéria-prima cortada manualmente.

Microrganismos	Resultados em u.f.c./g	Resultados em log u.f.c./g
Microrganismos a 30°C	1,2x10 ⁵	5,08
Bactérias lácticas	< 1	< 1
<i>Enterobacteriaceae</i>	5,7x10 ²	2,76
<i>Escherichia coli</i>	< 1	< 1
<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	< 1	< 1
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25 g	

< 1 – inferior ao limite de deteção do método.

A análise dos resultados apresentados no **Quadro 3**, permitiu verificar que na matéria-prima foram encontrados microrganismos a 30°C (1,2x10⁵ u.f.c./g; 5,08 log u.f.c./g) e bactérias da família *Enterobacteriaceae* (5,7x10⁴ u.f.c./g; 2,76 log u.f.c./g).

No Regulamento N° 1441/2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, no caso da carne picada e da carne separada mecanicamente, os valores máximos para a contagem de microrganismos a 30°C e de *Escherichia coli* são de, respetivamente, 5x10⁶ u.f.c./g (6,7 log u.f.c./g) e de 5x10² u.f.c./g (2,7 log u.f.c./g). De acordo com Saraiva *et al.*, (2019) os valores-guia apresentados pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para produtos do grupo 2D (por exemplo, carne crua), são satisfatórios para os microrganismos a 30°C (<10⁶ u.f.c./g; < 6 log u.f.c./g), satisfatórios para *Enterobacteriaceae* (<10⁴ u.f.c./g; < 4 log u.f.c./g), satisfatórios para *Staphylococcus coagulase* positiva (<10 u.f.c./g; < 1 log u.f.c./g) e satisfatórios para *Salmonella* spp. (ausente em 25g).

Outros autores realizaram estudos com carne de porco crua. Kim e Jang (2018), fizeram um estudo em que analisaram 3205 amostras de carne de porco crua recolhida em centros de distribuição e verificaram que as contagens totais de microrganismos eram inferiores a 10⁶ u.f.c./g (6 log u.f.c./g), enquanto não detetaram *Escherichia coli* em nenhuma das amostras.

Silva *et al.*, (2018) analisaram a carne de porco crua em duas fábricas de produção de chouriço, verificando valores superiores a 5 log u.f.c./g nas contagens totais de microrganismos.

Nos **Quadros 4, 6 e 8** são apresentados os resultados das análises microbiológicas para populações microbianas totais e indicadores de higiene, obtidos nas etapas (massa, pré-fumeiro, pós-fumeiro e embalado em vácuo após 3 meses) de três processos de produção (I, II, III). Nos **Quadros 5, 7 e 9** são apresentados os resultados das análises microbiológicas para indicadores de segurança. No **Quadro 10** é possível observar os resultados do pH e a_w para os três processos, estas análises foram realizadas 24 horas após os chouriços saírem do fumeiro.

Quadro 4 - Resultados obtidos para as populações totais e microrganismos indicadores de higiene durante o processo I.

Amostra	Microrganismos a 30°C	Bactérias láticas	Bolores e leveduras	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
MI	5,36 ± 0,51	1,76 ± 0,32	3,68 ± 0,09	2,26 ± 0,16	< 1
CpFI	5,25 ± 0,29	0,65 ± 1,13	3,75 ± 0,19	2,25 ± 0,57	< 1
CppFI	8,19 ± 0,61	5,63 ± 0,11	4,72 ± 0,26	2,48 ± 0,17	< 1
CV3MI	8,61 ± 0,62	3,50 ± 0,75	2,59 ± 0,12	< 1	< 1
CV6MI	6,77 ± 1,06	< 1	0,43 ± 0,75	< 1	< 1

Os resultados são apresentados com médias ± desvio padrão e expressos em log u.f.c/g. < 1 – inferior ao limite de detecção do método. MI – massa; CpFI – chouriço pré-fumeiro; CppFI – chouriço pós-fumeiro; CV3MI – chouriço embalado sob vácuo após 3 meses; CV6MI – chouriço embalado sob vácuo após 6 meses.

Quadro 5 - Resultados obtidos para microrganismos indicadores de segurança durante o processo I.

Amostra	Esporos de clostrídios sulfito-redutores	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
MI	Positivo em 1g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g
CpFI	Positivo em 1g	-	-
CppFI	Positivo em 0,1g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g
CV3MI	Negativo em 1g	-	-
CV6MI	Positivo em 1g	-	-

Os resultados são apresentados com Médias \pm Desvio padrão. MI – massa; CpFI – chouriço pré-fumeiro; CppFI – chouriço pós-fumeiro; CV3MI – chouriço embalado sob vácuo após 3 meses; CV6MI – chouriço embalado sob vácuo após 6 meses.

Quadro 6 - Resultados obtidos para as populações totais e microrganismos indicadores de higiene durante o processo II.

Amostra	Microrganismos a 30°C	Bactérias láticas	Bolores e leveduras	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
MII	4,58 \pm 0,06	< 1	2,94 \pm 0,21	2,00 \pm 0,41	< 1
CpFII	4,76 \pm 0,18	< 1	3,13 \pm 0,08	2,30 \pm 0,11	< 1
CppFII	8,01 \pm 0,22	4,86 \pm 0,55	4,71 \pm 0,43	1,36 \pm 0,32	< 1
CV3MII	7,06 \pm 0,68	4,00 \pm 0,64	2,75 \pm 0,42	0,77 \pm 0,68	< 1
CV6MII	6,96 \pm 0,95	1,99 \pm 1,05	1,20 \pm 1,10	0,62 \pm 1,07	< 1

Os resultados são apresentados com médias \pm desvio padrão e expressos em log u.f.c/g. < 1 – inferior ao limite de detecção do método. MII – massa; CpFII – chouriço pré-fumeiro; CppFII – chouriço pós-fumeiro; CV3MII – chouriço embalado sob vácuo após 3 meses; CV6MII – chouriço embalado sob vácuo após 6 meses.

Quadro 7 - Resultados obtidos para microrganismos indicadores de segurança durante o processo II.

Amostra	Esporos de clostrídios sulfito-redutores	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
MII	Positivo em 0,1g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g
CpFII	Positivo em 1g	-	-
CppFII	Positivo em 0,1g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g
CV3MII	Positivo em 1g	-	-
CV6MII	Positivo em 1 g	-	-

Os resultados são apresentados com médias \pm desvio padrão. MII – massa; CpFII – chouriço pré-fumeiro; CppFII – chouriço pós-fumeiro; CV3MII – chouriço embalado sob vácuo após 3 meses; CV6MII – chouriço embalado sob vácuo após 6 meses.

Quadro 8 - Resultados obtidos para as populações totais e microrganismos indicadores de higiene durante o processo III.

Amostra	Microrganismos a 30°C	Bactérias láticas	Bolores e leveduras	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
MIII	5,15 \pm 0,48	2,17 \pm 0,35	2,95 \pm 0,14	1,66 \pm 0,32	< 1
CpFIII	4,88 \pm 0,15	0,49 \pm 0,85	3,23 \pm 0,22	2,49 \pm 0,17	< 1
CppFIII	5,54 \pm 0,55	2,52 \pm 0,11	3,83 \pm 0,84	1,20 \pm 0,35	< 1
CV3MIII	7,14 \pm 0,48	3,76 \pm 0,16	3,37 \pm 0,56	< 1	< 1
CV6MIII	5,44 \pm 0,15	< 1	3,24 \pm 0,16	< 1	< 1

Os resultados são apresentados com médias \pm desvio padrão e expressos em log u.f.c/g. < 1 – inferior ao limite de detecção do método. MIII – massa; CpFIII – chouriço pré-fumeiro; CppFIII – chouriço pós-fumeiro; CV3MIII – chouriço embalado sob vácuo após 3 meses; CV6MIII – chouriço embalado sob vácuo após 6 meses.

Quadro 9 - Resultados obtidos para microrganismos indicadores de segurança durante o processo III.

Amostra	Esporos de clostrídios sulfito-redutores	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
MIII	Positivo em 0,1g	-	-
CpFIII	Positivo em 1g	-	-
CppFIII	Positivo em 0,01g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g
CV3MIII	Positivo em 1g	-	-
CV6MIII	Positivo em 1 g	-	-

Os resultados são apresentados com médias \pm desvio padrão. MIII – massa; CpFIII – chouriço pré-fumeiro; CppFIII – chouriço pós-fumeiro; CV3MIII – chouriço embalado sob vácuo após 3 meses; CV6MIII – chouriço embalado sob vácuo após 6 meses.

Quadro 10 - Resultados de pH e a_w , obtidos na etapa pós-fumeiro.

Processos	pH	Atividade de água (a_w)
I	5,87 \pm 0,01	0,811 \pm 0,001
II	5,68 \pm 0,07	0,849 \pm 0,002
III	5,68 \pm 0,00	0,840 \pm 0,006

Os resultados são apresentados com médias \pm desvio padrão.

No **Quadro 10** é possível observar que os valores obtidos neste trabalho foram ao encontro dos valores que, segundo Laranjo e Elias (2016), são característicos de enchidos fabricados na zona mediterrânea, da qual faz parte Portugal (pH entre 5,2 e 5,8 e $a_w < 0,90$).

No estudo de Dias *et al.*, (2020), o valor de pH foi de 5,08, um valor inferior aos obtidos neste trabalho. No caso da a_w , o valor foi de 0,915, um valor superior ao observado no **Quadro 10**. Fraqueza *et al.*, (2020), obtiveram resultados mais baixos de pH, com valores entre 4,89 e 4,96; e valores de a_w muito semelhantes, entre 0,833 e 0,852. Já no estudo de Elias e Carrascosa (2010), os valores foram muito semelhantes aos deste trabalho, sendo o pH de 5,7 e a a_w de 0,82.

É importante que os valores de pH sejam inferiores a 5,2 e a a_w inferior a 0,95 ou o pH inferior a 5,0 ou a a_w inferior a 0,91. Desta maneira os chouriços tornam-se mais seguros,

visto que, alguns microrganismos patogénicos como *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, são sensíveis ao ácido produzido durante a fermentação, e também se tornam mais estáveis não necessitando de ser refrigerados (Silva *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2020). No caso dos chouriços de porco Malhado de Alcobaça, como a a_w foi inferior a 0,91, estes são estáveis, não necessitando ser refrigerados.

Nas **Figuras 12, 13 e 14** são apresentados os resultados das populações microbianas totais nos processos I, II e III, respetivamente.

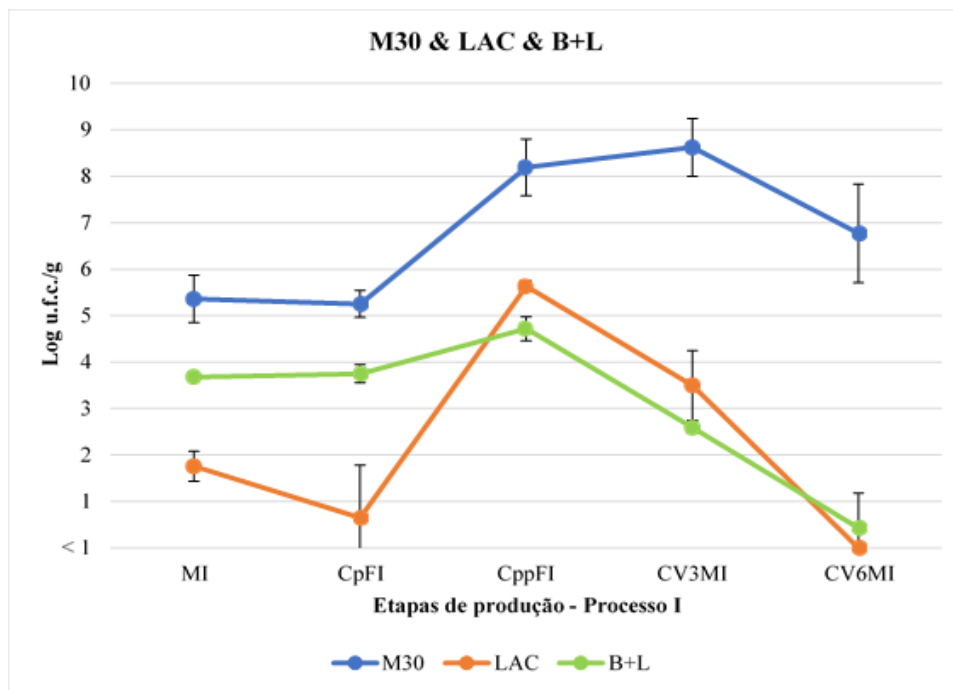


Figura 12 - Evolução das populações microbianas totais (M30, microrganismos a 30°C; LAC, bactérias lácticas; B+L, bolores e leveduras) ao longo do processo I.

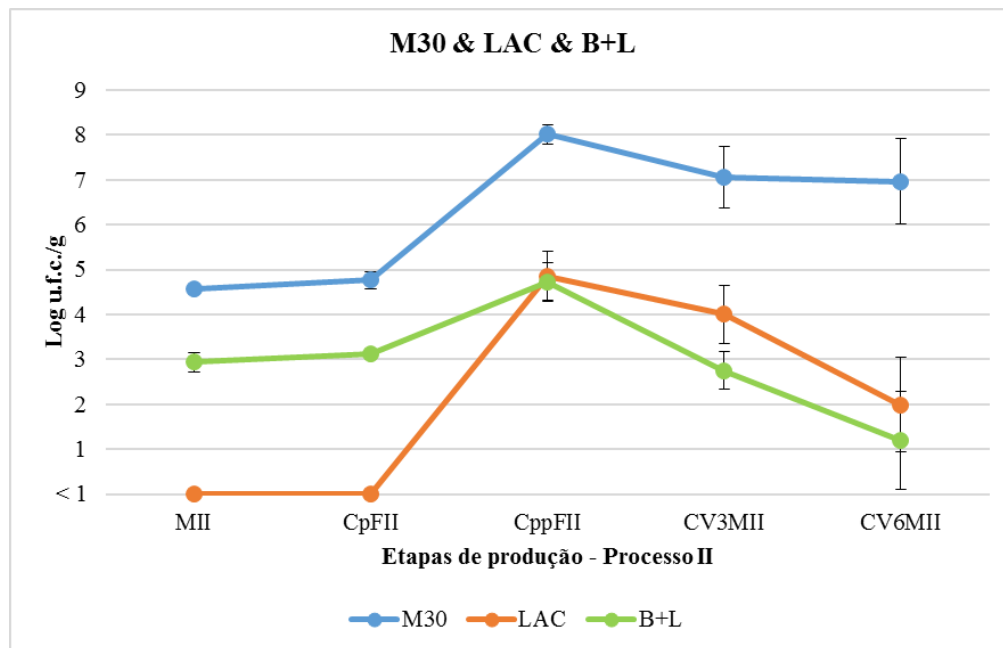


Figura 13 - Evolução das populações microbianas totais (M30, microrganismos a 30°C; LAC, bactérias lácticas; B+L, bolores e leveduras) ao longo do processo II.

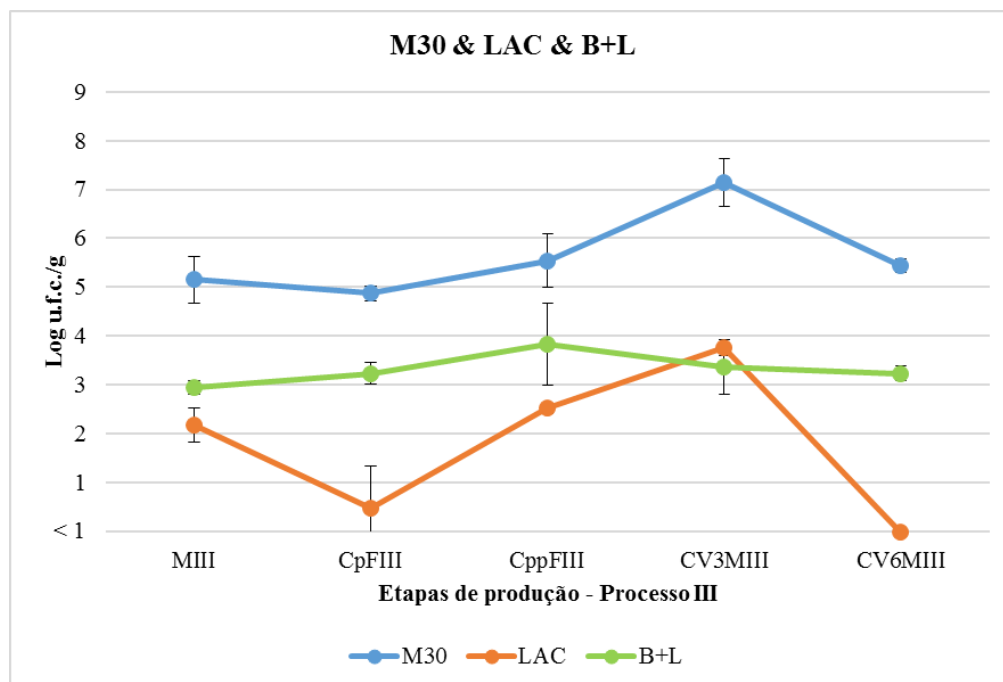


Figura 14 - Evolução das populações microbianas totais (M30, microrganismos a 30°C; LAC, bactérias lácticas; B+L, bolores e leveduras) ao longo do processo III.

Nas **Figuras 12, 13 e 14** é possível observar a evolução dos indicadores de qualidade. Os microrganismos a 30°C são aqueles que estão em maior quantidade, sendo que, a matéria-prima já tinha valores elevados para estes microrganismos e, na etapa da massa, nem com a adição dos ingredientes, alguns deles com compostos que afetam o crescimento microbiano,

estes valores diminuíram (cerca de 5 log u.f.c/g na carne crua e na massa), situação também comprovada por Silva *et al.*, (2018).

Segundo Silva *et al.*, (2018), o maior aumento de microrganismos a 30°C observou-se após a fumagem e que este aumento se deveu ao crescimento de bactérias lácticas, o mesmo se pôde observar durante a realização deste trabalho.

Durante a fase de embalamento, o crescimento de microrganismos aeróbios estabilizou ou diminuiu, possivelmente, devido ao facto de os chouriços terem sido embalados sob vácuo, visto que, uma das maneiras de retardar o crescimento destes microrganismos é retirar-lhes o oxigénio (HPA, 2009).

Num estudo realizado por Silva *et al.*, (2018), quanto maior a a_w , maiores foram as contagens de microrganismos a 30°C, no entanto, esta situação não foi verificada neste trabalho. Observando os resultados de a_w obtidos na etapa pós-fumeiro, nos processos I e II (0,811 e 0,849, respetivamente) não se verificou grande diferença nas contagens (cerca de 8 log u.f.c/g nos dois processos). Maior diferença foi observada quando comparados os processos I e III (0,811 e 0,840, respetivamente), no processo I houve contagens de 8,19 log u.f.c/g e no processo III houve contagens de 5,54 log u.f.c/g, comparando o processo I e III, verificou-se que quanto maior a a_w , menor as contagens de microrganismos a 30°C. Estas diferenças entre processos podem estar relacionadas com alguma alteração que possa ter ocorrido durante o processamento tanto nas quantidades utilizadas para os ingredientes, quanto no tempo, temperatura e humidade utilizados ao longo dos processos.

Dias *et al.*, (2020), realizaram um estudo onde avaliaram o efeito de culturas *starter* na segurança e qualidade de enchidos, como nos chouriços deste trabalho não foram introduzidas culturas *starter* os resultados foram comparados com o controlo. Na etapa da massa os valores foram semelhantes para microrganismos a 30°C, entre 4,58 e 5,36 log u.f.c/g neste trabalho e 5,85 log u.f.c/g no estudo, foram semelhantes para bactérias lácticas, entre 0,00 e 2,17 log u.f.c/g neste trabalho e 2,91 log u.f.c/g no estudo e também foram semelhantes para bolores e leveduras, entre 2,94 e 3,68 log u.f.c/g neste trabalho e 3,59 log u.f.c/g no estudo.

As maiores diferenças entre este trabalho e o estudo de Dias *et al.*, (2020), começaram a surgir antes da fermentação. Na etapa pré-fumeiro, para microrganismos a 30°C os valores deste trabalho (entre 4,76 e 5,25 log u.f.c/g) foram inferiores ao valor do estudo (7,03 log u.f.c/g). Comparando os valores de bactérias lácticas e bolores e leveduras as diferenças são

enormes. No caso das bactérias lácticas, os valores deste trabalho foram inferiores a 0,65 log u.f.c/g, já no estudo o valor foi de 7,15 log u.f.c/g. Os valores de bolores e leveduras foram entre 3,13 e 3,75 log u.f.c/g neste trabalho e 0,92 log u.f.c/g no estudo.

Para a etapa pós-fumeiro, os valores de microrganismos a 30°C foram semelhantes nos processos I e II (8,19 e 8,01 log u.f.c/g, respetivamente) e no estudo de Dias *et al.*, (2020), (7,91 log u.f.c/g). Para bactérias lácticas o valor mais elevado deste trabalho foi de 5,63 log u.f.c/g e o valor obtido no estudo foi de 8,06 log u.f.c/g. No caso dos bolores e leveduras, os valores deste trabalho (entre 3,83 e 4,72 log u.f.c/g) foram bastante superiores ao valor do estudo (0,46 log u.f.c/g).

No produto final (etapa CV3M), os resultados para microrganismos a 30°C foram semelhantes neste trabalho (entre 7,06 e 8,62 log u.f.c/g) e no estudo de Dias *et al.*, (2020), (7,26 log u.f.c/g). Para bactérias lácticas, continuam as diferenças onde os valores foram inferiores neste trabalho. Os valores foram entre 3,50 e 4,00 log u.f.c/g para este trabalho e 7,32 log u.f.c/g no estudo. A situação inverte-se no caso dos bolores e leveduras onde os valores deste trabalho (entre 2,59 e 3,37 log u.f.c/g) foram superiores ao valor do estudo (0,88 log u.f.c/g).

Alfaia *et al.*, (2015), realizaram um estudo a chouriços embalados sob vácuo que sofreram tratamento de altas pressões, com diferentes combinações de tempo e pressão, como os nossos chouriços não sofreram este tipo de tratamento, os resultados foram comparados com as análises microbiológicas realizadas ao controlo, uma vez que, este também não sofreu tratamento de altas pressões. Os valores de bactérias lácticas na etapa CV3M foram entre 3,50 e 4,00 log u.f.c/g, e na etapa CV6M foram entre 0,00 e 1,99 log u.f.c/g, valores bastante inferiores ao do estudo de Alfaia *et al.*, (2015), que foi de 7,54 log u.f.c/g. No caso dos bolores e leveduras, na etapa CV3M os valores foram compreendidos entre 2,59 e 3,37 log u.f.c/g, na etapa CV6M foram entre 0,43 e 3,24 log u.f.c/g, no estudo de Alfaia *et al.*, (2015), o valor foi de 4,42 log u.f.c/g, um valor que se aproxima de alguns valores obtidos neste trabalho.

Num estudo de Capita *et al.*, (2006), foram analisadas amostras de chouriços espanhóis 6 a 8 meses após o processamento dos mesmos. Comparando os valores obtidos, podemos observar que na etapa CV6M, os valores foram inferiores aos obtido por Capita *et al.*, (2006). Os microrganismos a 30°C estão compreendidos entre 5,44 e 6,96 log u.f.c/g, enquanto, o valor nos chouriços foi de 8,25 log u.f.c/g. No caso das bactérias lácticas observou-se

novamente uma grande diferença já que neste trabalho os valores foram entre 0,00 e 1,99 log u.f.c/g e nos chouriços foi de 8,46 log u.f.c/g. Os valores de bolores e leveduras foram entre 0,43 e 3,24 log u.f.c/g e nos chouriços foi de 5,11 log u.f.c/g.

Numa análise mais genérica para a etapa CV6M, comparando os valores deste trabalho com os valores-guia apresentados pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para produtos do grupo 1B (alimentos cozinhados, manuseados após o tratamento térmico), os resultados de microrganismos a 30°C são não satisfatórios, visto que, os valores obtidos são superiores a 5 log u.f.c/g, que é o valor máximo admissível. Para bolores e leveduras, os resultados são satisfatórios para os processos I e II (0,43 e 2,75 log u.f.c/g, respetivamente) e são questionáveis para o processo III (3,24 log u.f.c/g), o valor máximo recomendável é 3 log u.f.c/g e o valor máximo admissível é 4 log u.f.c/g.

Nas **Figuras 15, 16 e 17** são apresentados os resultados de *Enterobacteriaceae* nos processos I, II e III, respetivamente.

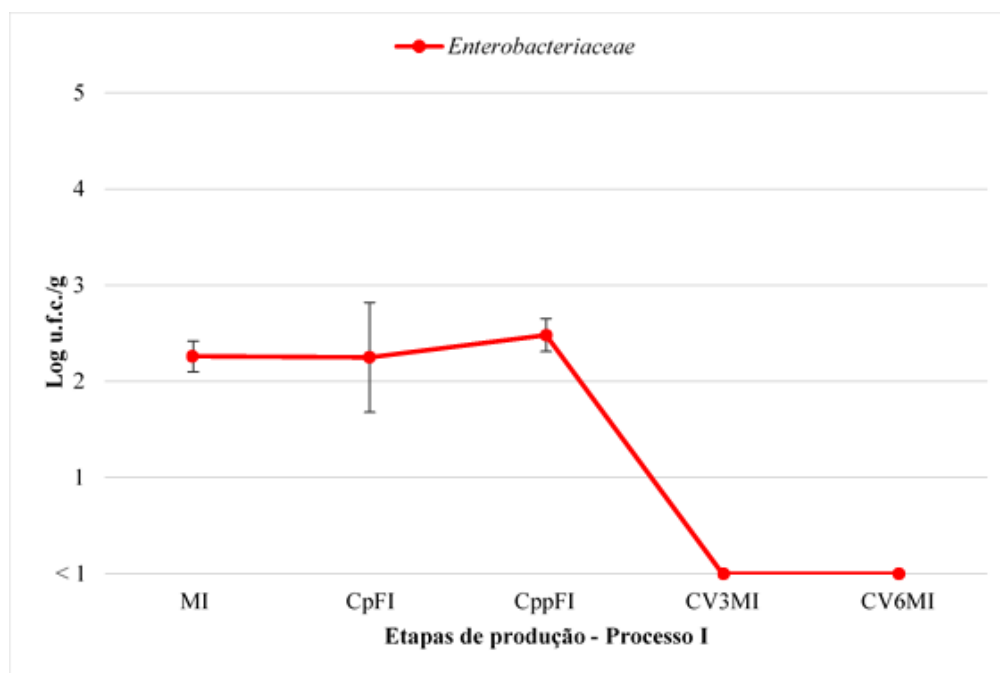


Figura 15 - Evolução das populações de bactérias da família *Enterobacteriaceae* ao longo do processo I.

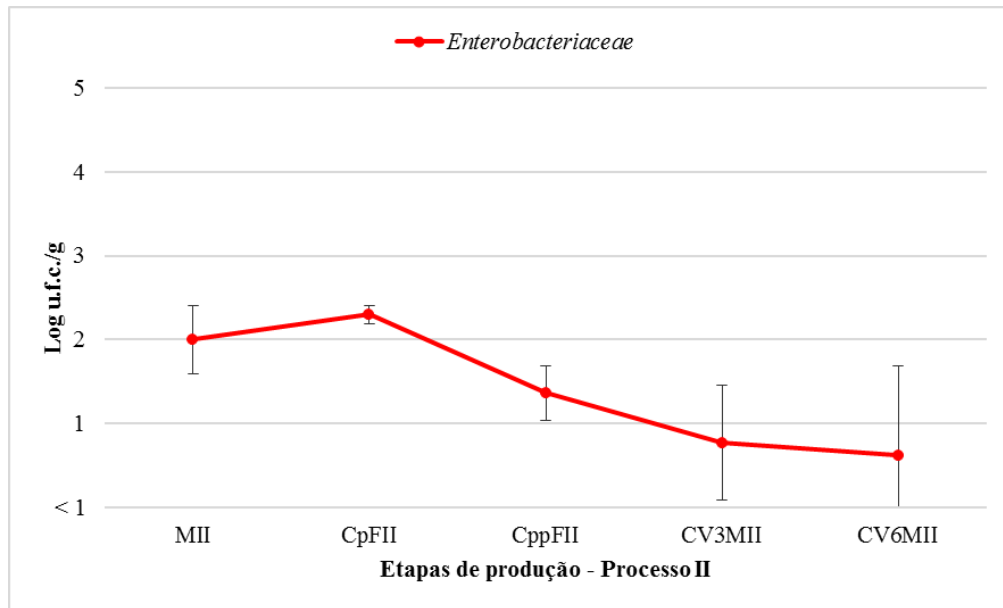


Figura 16 - Evolução das populações de bactérias da família *Enterobacteriaceae* ao longo do processo II.

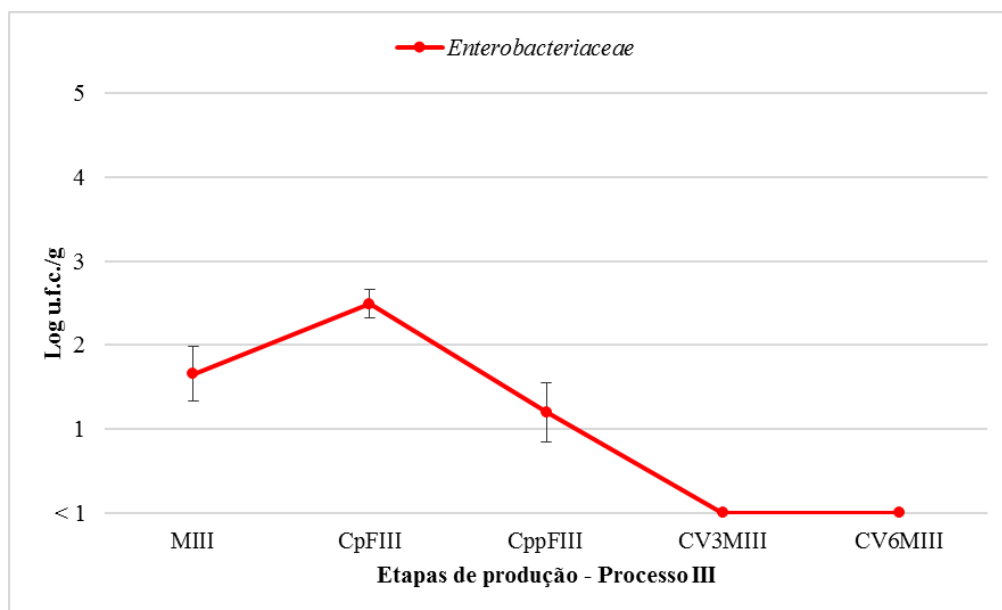


Figura 17 - Evolução das populações de bactérias da família *Enterobacteriaceae* ao longo do processo III.

Nas **Figuras 15, 16 e 17** observamos a evolução das bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Na carne crua, os valores de *Enterobacteriaceae* são de 2,76 log u.f.c/g e na etapa da massa houve uma diminuição para valores entre 1,66 e 2,26 log u.f.c/g, esta ligeira diminuição pode dever-se aos compostos antimicrobianos de alguns ingredientes. Na etapa pré-fumeiro é possível observar valores entre 2,25 e 2,49 log u.f.c/g, este ligeiro aumento pode estar relacionado com a possível carga microbiana presente nos invólucros e/ou contaminações cruzadas durante o enchimento (Silva *et al.*, 2018).

Na análise pós-fumeiro, houve uma diminuição destas bactérias, o que era de se esperar, visto que, são bactérias sensíveis à diminuição da a_w . Caso esta diminuição não ocorresse, significava que a fumagem não tinha sido suficiente/adequado ou que tinha havido contaminação posterior (HPA, 2009; Saraiva *et al.*, 2019).

Segundo Silva *et al.*, (2018), valores baixos de *Enterobacteriaceae* estão relacionados com valores baixos de pH. No processo I (pH = 5,87) os valores de *Enterobacteriaceae* são de 2,48 log u.f.c/g, enquanto, nos processos II e III (pH = 5,68) os valores são de 1,36 e 1,20 log u.f.c/g, respetivamente.

No estudo de Alfaia *et al.*, (2015), o valor de *Enterobacteriaceae* foi de 4,49 log u.f.c/g, um valor bastante elevado quando comparado com os resultados das etapas CV3M (< 0,77 log u.f.c/g) e CV6M (< 0,62 log u.f.c/g), já no estudo de Capita *et al.*, (2006), o valor foi mais aproximado (0,99 log u.f.c/g).

Comparando os valores de *Enterobacteriaceae* deste trabalho e do estudo de Dias *et al.*, (2020), as diferenças puderam ser observadas nas etapas da massa e pós-fumeiro. Na etapa da massa, os valores deste trabalho foram entre 1,66 e 2,26 log u.f.c/g e no estudo foi de 4,43 log u.f.c/g. Na etapa pós-fumeiro, os valores foram entre 1,20 e 2,48 log u.f.c/g, no estudo não foram detetadas *Enterobacteriaceae*. Os valores foram semelhantes para as etapas pré-fumeiro, neste trabalho os valores foram entre 2,25 e 2,49 log u.f.c/g e no estudo foi de 2,58 log u.f.c/g, e na etapa CV3M, neste trabalho os valores foram 0,00 e 0,77 log u.f.c/g e no estudo de Dias *et al.*, (2020), foi de 0,86 log u.f.c/g.

Numa análise mais genérica para a etapa CV6M, comparando os valores deste trabalho com os valores-guia apresentados pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para produtos do grupo 1B (alimentos cozinhados, manuseados após o tratamento térmico), os resultados são satisfatórios (< 0,62 log u.f.c/g), o valor máximo de referência é 2 log u.f.c/g.

Salmonella spp. e *Listeria monocytogenes* representam perigos biológicos e são agentes zoonóticos com capacidade de transmissão por alimentos, nomeadamente carne suína. Acresce ainda as características osmotolerantes de *Staphylococcus* coagulase positiva, em produtos cuja a_w variou entre 0,81 e 0,85. Neste trabalho (**Quadros 5, 7 e 9**), salienta-se a ausência dos patogénicos referidos em todas as etapas dos três processos para os patogénicos referidos, revelando, no entanto, a presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores, indicadores primários da probabilidade de presença de clostrídios patogénicos.

5. Considerações finais

Numa avaliação global das análises realizadas, na etapa da massa, os microrganismos a 30°C, bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* são satisfatórios, segundo os valores-guia disponibilizados pelo INSA (Saraiva *et al.*, 2019), no entanto, verificou-se a presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores.

Quando o produto está pronto para consumo, existem microrganismos aos quais se devem ter uma especial atenção, nomeadamente, os microrganismos a 30°C e os esporos de clostrídios sulfito-redutores. De acordo com os valores-guia divulgados pelo INSA (Saraiva *et al.*, 2019), os microrganismos a 30°C são não satisfatórios, o que pode indicar matérias-primas de baixa qualidade, incumprimento das boas práticas de higiene e fabrico, contaminações cruzadas, falhas no tratamento térmico ou na cadeia de frio.

No caso das bactérias lácticas, não existem valores indicadores como noutros microrganismos, no entanto, comparando os valores deste trabalho com outros estudos, observou-se uma grande diferença, sendo que, neste trabalho os valores destas bactérias, fundamentais em qualquer processo de fermentação, são bastante inferiores.

As diferenças entre valores deste trabalho e dos estudos citados podem estar relacionadas com as condições nas quais os enchidos foram produzidos, com a carga microbiológica originária das matérias-primas, dos operadores, utensílios e superfícies.

A presença de esporos clostrídios sulfito-redutores foi positiva em todas as etapas de todos os processos. Este grupo é composto, maioritariamente, por espécies patogénicas de *Clostridium*, como *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*, pelo que seria importante fazer a sua identificação. É de salientar que *Clostridium* são bactérias anaeróbias, esporuladas e que os chouriços foram embalados sob vácuo, ou seja, é o ambiente ideal para estas bactérias patogénicas se manterem.

Pelo lado positivo, é de salientar as ausências, em todas as etapas dos três processos, de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, pois, são microrganismos patogénicos causadores de doenças associadas a diversos géneros alimentícios.

Para garantir que o chouriço é seguro e estável microbiologicamente é necessário ter em atenção uma série de fatores que afetam o crescimento dos microrganismos, nomeadamente, as condições nas quais acontece o abate do animal, a qualidade e quantidade dos ingredientes utilizados durante a formulação dos chouriços, dos invólucros, dos tempos e temperaturas utilizados ao longo do processo, das condições higiénicas de equipamentos e utensílios utilizados e pelo cumprimento das boas práticas de higiene e fabrico por parte dos operadores.

6. Trabalhos futuros

Num futuro trabalho poderia ser interessante realizar análises microbiológicas às superfícies, equipamentos, utensílios e ingredientes adicionados à carne, para perceber se existe influência destes na carga microbiana do produto final, realizar análises ao pH e a_w durante as outras etapas do processo tecnológico para verificar a evolução destes parâmetros e também a realização de análise estatística para verificar se existem diferenças significativas entre os lotes produzidos.

7. Bibliografia

- Abdolghafour, B., & Saghir, A. (2014). Development in sausage production and practices- A review Sausage Production : Ingredients and Raw. *Journal of Meat Science and Technology*, 2(3), 40–50. Retirado de www.jakraya.com/journal/jmst
- Alfaia, A. Alfaia, C. M., Patarata, L., Fernandes, M. J., Fernandes, M. H., Elias, M., Ribeiro, M. H., & Fraqueza, M. J. (2015). Binomial effects of high isostatic pressure and time on the microbiological, sensory characteristics and lipid composition stability of vacuum packed dry fermented sausages “chouriço”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.012>
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S., & Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 100(1), 40–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02772.x>
- Bhuyan, D., Das, A., Laskar, S. K., Bora, D. P., Tamuli, S., & Hazarika, M. (2018). Effect of different smoking methods on the quality of pork sausages. *Veterinary World*, 11(12), 1712–1719. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1712-1719>
- Capita, R., Llorente-Marigómez, S., Prieto, M., & Alonso-Calleja, C. (2006). Microbiological profiles, pH, and titratable acidity of chorizo and salchichón (Two Spanish dry fermented sausages) manufactured with ostrich, deer, or pork meat. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1183–1189. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.5.1183>
- Comissão Europeia. (s.d. a). eAmbrosia – the EU geographical indications register. Consultado em 13 de julho de 2021, disponível em <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/>
- Comissão Europeia. (s.d. b). *Os regimes de qualidade explicados*. Consultado em 9 de abril de 2021, disponível em https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/quality-schemes-explained_pt
- Da Costa, R. J., Voloski, F. L. S., Mondadori, R. G., Duval, E. H., & Fiorentini, Â. M. (2019). Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid

- Bacteria Isolated from Meat. *Journal of Food Quality*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4726510>
- Dantas, R., & Espadinha, P. (s.d.). *Pela defesa das raças autóctones portuguesas!* Consultado em 7 de abril de 2021, disponível em https://www.sprega.com.pt/docs/PELA_DEFESA_racas.pdf
- Degenhardt, R., & Sant'Anna, E. S. (2007). Survival of *Listeria monocytogenes* in low acid Italian sausage produced under Brazilian conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 309–314. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200024>
- Dias, I., Laranjo, M., Potes, M. E., Agulheiro-Santos, A. C., Ricardo-Rodrigues, S., Fialho, A. R., Véstia, J., Fraqueza, M. J., Oliveira, M., & Elias, M. (2020). Autochthonous starter cultures are able to reduce biogenic amines in a traditional portuguese smoked fermented sausage. *Microorganisms*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050686>
- Elias, M., & Carrascosa, A. V. (2010). Characterisation of the Paio do Alentejo, a traditional Portuguese Iberian sausage, in respect to its safety. *Food Control*, 21(1), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.04.004>
- Elias, M., Fraqueza, M. J. & Barreto, A. S. (2006). Caracterização do processo de fabrico do chouriço tradicional alentejano. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Vol. 13, Nº 1, 10 pp.
- Fernandes, A. J., Ribeiro, M. I. B., Cabo, P. S. A. do, & Matos, A. M. V. (2016). Consumo De Enchidos Dop/Igp/Etg No Concelho De Bragança, Portugal. *Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias* (ISSN: 2525-4790), 1(1). <https://doi.org/10.21575/25254790rmmaa2016vol1n147>
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Gibbs, P., Hogg, T., & Teixeira, P. (2009). Microbiological profile of Salpicão de Vinhais and Chouriça de Vinhais from raw materials to final products: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(2), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.001>
- Fraqueza, M. J., Laranjo, M., Alves, S., Fernandes, M. H., Agulheiro-Santos, A. C., Fernandes, M. J., Potes, M. E., & Elias, M. (2020). Dry-cured meat products according to the smoking regime: Process optimization to control polycyclic aromatic hydrocarbons. *Foods*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/foods9010091>

- Holck, A., Axelsson, L., McLeod, A., Rode, T. M., & Heir, E. (2017). Health and safety considerations of fermented sausages. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9753894>
- HPA - Health Protection Agency. (2009). Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market. *Health Protection Agency, London.*, (November), 33.
- Húngaro, H. M., Peña, W. E. L., Silva, N. B. M., Carvalho, R. V., Alvarenga, V. O., & Sant'Ana, A. S. (2014). Food Microbiology. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, (December), 213–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00059-0>
- ICMFS. (2006). Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities. In *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. <https://doi.org/10.1007/0-387-28801-5>
- INE - Instituto Nacional de Estatística. (2019). *Estatísticas Agrícolas – 2018 (ISSN 0079-4139)*. Edição 2019. Última atualização em 24 de setembro de 2019. Disponível em https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=358629204&PUBLICACOESmodo=2
- INE - Instituto Nacional de Estatística. (2020). *Consumo humano de carne per capita (kg/hab.) por tipo de carnes*. Última atualização em 29 de maio de 2020. Consultado em 25 de setembro de 2020, disponível em https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&contexto=pi&indOcorrCod=0000211
- ISO 11290-1:2017(en) - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. International Organization for Standardization (ISO), Suíça.
- ISO 13721:1995(en) - Meat and meat products - Enumeration of lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization (ISO), Suíça.
- ISO 21528-2:2017(en) - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count technique. International Organization for Standardization (ISO), Suíça.

- ISO 2917:1999(en) - Meat and meat products - Measurement of pH - Reference method. International Organization for Standardization (ISO), Suíça.
- ISO 4833-1:2013(en) - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. International Organization for Standardization (ISO), Suíça.
- ISO 6579-1:2017(en) - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization (ISO), Suíça.
- ISO 6887-1:2017(en) - Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organization for Standardization (ISO), Suíça.
- ISO 6888-1:1999(en) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. International Organization for Standardization (ISO), Suíça.
- ISO 21527-2:2008(en) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. International Organization for Standardization (ISO), Suíça.
- Kim, H. J., & Jang, A. (2018). Evaluation of the microbiological status of raw pork meat in Korea: modification of the microbial guideline levels for meat. *Food Science and Biotechnology*, 27(4), 1219–1225. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0356-7>
- Laranjo, M., & Elias, M. (2015). Salsicharia Tradicional Portuguesa Melhorar a Segurança, Manter a Qualidade. *Tecnoalimentar N° 2*, 6–11.
- Laranjo, M., Elias, M., & Fraqueza, M. J. (2017). The Use of Starter Cultures in Traditional Meat Products. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9546026>
- Lauková, A., Fraqueza, M. J., Stropfová, V., Simonová, M. P., Elias, M., & Barreto, A. (2011). Bacteriocinogenic activity of *Enterococcus faecalis* strains from chouriço,

- traditional sausage produced in Southern Portugal. *African Journal of Microbiology Research*, 5(4), 334–339. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.636>
- Leši, T., Vahčić, N., Kos, I., Zdravec, M., Pulić, B. S., Bogdanović, T., Petričević, S., Listeš, E., Škrivanko, M., & Pleadin, J. (2020). Characterization of Traditional Croatian Household-Produced Dry-Fermented Sausages. *MDPI Foods* 2020, 9, 990. <https://doi:10.3390/foods9080990>
- Marcos, C., Viegas, C., de Almeida, A. M., & Guerra, M. M. (2016). Portuguese traditional sausages: different types, nutritional composition, and novel trends. *Journal of Ethnic Foods*, 3(1), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2016.01.004>
- Metaxopoulos, J., Mataragas, M., & Drosinos, E. H. (2002). Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4°C. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 363–373. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01701.x>
- Milicevic, B., Danilovic, B., Zdolec, N., Kozachinski, L., Dobranic, V., & Savic, D. (2014). Microbiota of the fermented sausages: Influence to product quality and safety. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(5), 1061–1078.
- Mohan, A. (2014). Basics of sausage making, formulation, processing & safety anand. UGA Extension, 1–48. Retirado de https://secure.caes.uga.edu/extension/publications/files/pdf/B_1437_1.PDF
- NP 2262:1986 - Microbiologia alimentar - Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito – redutores. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal.
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., & Cocolin, L. (2005). Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1977–1986. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1977-1986.2005>
- Regulamento (CE) N° 1441/2007 da Comissão de 5 de dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) N° 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 322, 12-29.
- Regulamento (UE) N° 1151/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de novembro de 2012 relativo aos regimes de qualidade dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 343, 1-29.

- Ribeiro, A., T., & Dias, I. (2015). *Fabrico de chouriço de carne extra*. Manual de Instruções de Trabalho. Escola Superior Agrária de Santarém, 19 pp.
- Rocha, J. M., & Elias, M. N. (2016). Quality Improvement of Traditional Dry Fermented Sausages Based on Innovative Technological Strategies. *BAOJ Nutrition*, 2(2), 1–4. <https://doi.org/10.24947/baojn/2/2/00116>
- Saraiva, M., Correia, C. B., Cunha, I. C., Maia, C., Furtado, R., Bonito, C. C., & Calhau, M. A. (2019). *Interpretação dos resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de produção e distribuição alimentar: valores-guia*. Disponível em http://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/12/INSA_Valores-guia.pdf
- Semedo-Lemsaddek, T., Carvalho, L., Tempera, C., Fernandes, M. H., Fernandes, M. J., Elias, M., Barreto, A. S., & Fraqueza, M. J. (2016). Characterization and Technological Features of Autochthonous Coagulase-Negative Staphylococci as Potential Starters for Portuguese Dry Fermented Sausages. *Journal of Food Science*, 81(5), M1197–M1202. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13311>
- Silva, B. N., Cadavez, V., Pires, P., Dias, T., & Gonzales-Barron, U. (2018). Microbiological safety of Portuguese Dry-Fermented Chouriço Sausages as affected by Processing and Physicochemical Factors. *Madridge Journal of Food Technology*, 3(2), 137–148. <https://doi.org/10.18689/mjft-1000121>
- SPREGA – Sociedade Portuguesa de Recursos Genéticos Animais. (2020). *Suínos – raça Malhado de Alcobaça*. Consultado em 6 de fevereiro de 2021, disponível em <http://www.sprega.com.pt/conteudo.php?idesp=su%EDnos&idraca=Malhado%20de%20Alcoba%E7a>
- Toldrá, F., Hui, Y. H., Astiasarán, I., Sebranek, J. G., & Talon, R. (2015). *Handbook of Fermented Meat and Poultry - 2nd edition*. Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Vicente, A. (2013). Malhado de Alcobaça: importância da sua conservação e divulgação. *Revista Suinicultura Nº 99*, pp. 18–28.

Anexos

Anexo 1 - Produtos de carne registados com as marcas DOP e IGP.

Produto	Marca
Presunto de Barrancos / Paleta de Barrancos	DOP
Chouriço Mouro de Portalegre	IGP
Cacholeira Branca de Portalegre	IGP
Painho de Portalegre	IGP
Lombo Enguitado de Portalegre	IGP
Lombo Branco de Portalegre	IGP
Linguiça de Portalegre	IGP
Morcela de Assar de Portalegre	IGP
Morcela de Cozer de Portalegre	IGP
Farinheira de Portalegre	IGP
Chouriço de Portalegre	IGP
Salpicão de Vinhais	IGP
Chouriça de Carne de Vinhais / Linguiça de Vinhais	IGP
Morcela de Estremoz e Borba	IGP
Chouriço grosso de Estremoz e Borba	IGP
Paia de Estremoz e Borba	IGP
Linguiça do Baixo Alentejo / Chouriço de carne do Baixo Alentejo	IGP
Paio de Beja	IGP
Sangueira de Barroso-Montalegre	IGP
Alheira de Barroso-Montalegre	IGP
Salpicão de Barroso-Montalegre	IGP
Chouriça de Carne de Barroso-Montalegre	IGP
Chouriço de Abóbora de Barroso-Montalegre	IGP
Paia de Toucinho de Estremoz e Borba	IGP
Farinheira de Estremoz e Borba	IGP
Chouriço de Carne de Estremoz e Borba	IGP
Paia de Lombo de Estremoz e Borba	IGP
Presunto de Campo Maior e Elvas / Paleta de Campo Maior e Elvas	IGP

Presunto de Santana da Serra / Paleta de Santana da Serra	IGP
Presunto do Alentejo / Paleta do Alentejo	DOP
Presunto de Vinhais / Presunto Bísaro de Vinhais	IGP
Chouriço Azedo de Vinhais / Azedo de Vinhais / Chouriço de Pão de Vinhais	IGP
Butelo de Vinhais / Bucho de Vinhais / Chouriço de Ossos de Vinhais	IGP
Alheira de Vinhais	IGP
Chouriça Doce de Vinhais	IGP
Chouriça de sangue de Melgaço	IGP
Salpicão de Melgaço	IGP
Chouriça de carne de Melgaço	IGP
Presunto de Melgaço	IGP
Presunto de Barroso	IGP
Alheira de Mirandela	IGP
