UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

REVISÃO DE PRAZOS DE VALIDADE DE PRODUTOS CÁRNEOS

Rita Oliveira e Silva

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO DE ENGENHARIA ALIMENTAR

RAMO DE SEGURANÇA ALIMENTAR

Orientador: Prof. Dr. Luís Avelino da Silva Coutinho Patarata

Coorientador: Eng.ª Margarida Isabel Ferreira do Carmo Rouxinol

Vila Real, 2019

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

REVISÃO DE PRAZOS DE VALIDADE DE PRODUTOS CÁRNEOS

Rita Oliveira e Silva

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO DE ENGENHARIA ALIMENTAR

RAMO DE SEGURANÇA ALIMENTAR

Orientador: Prof. Dr. Luís Avelino da Silva Coutinho Patarata

Co-orientadora: Eng.ª Margarida Isabel Ferreira do Carmo Rouxinol

COMPOSIÇÃO DO JÚRI:

Presidente: Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda Gil Cosme Martins

Arguente: Prof. Dr. Jorge Alberto dos Santos Guieiro Pereira

Arguente: Prof. Dr. José António de Oliveira e Silva

Vogal: Prof. Dr. Luís Avelino da Silva Coutinho Patarata

Vila Real, 2019

As doutrinas apresentadas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.

“If your dreams do not scare you,

they are not big enough”

Ellen Johnson Sirleaf

Agradecimentos

Após o término deste trabalho resta-me agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a sua realização, bem como todo o apoio prestado.

Ao Professor Doutor Luís Patarata, orientador deste trabalho, pela disponibilidade, saber, simpatia, dedicação e incentivo. Obrigada pela motivação e amizade.

À Engenheira Margarida, coorientadora deste trabalho, por ser o elo entre mim e a Irmãos Monteiro S.A., estando sempre disponível para ajudar.

À Irmãos Monteiro S.A. porque sem o seu contributo este trabalho não seria possível.

Ao senhor Mário Santos, pela disponibilidade e execução do trabalho de fotografia.

Ao pessoal técnico do Laboratório de Segurança Alimentar, especialmente à Dona Ana e à Dona Helena, por toda a ajuda prestada e boa disposição. Aos meus amigos e colegas de laboratório, um especial obrigado, pelo companheirismo e por tornarem todo o trabalho mais fácil e divertido.

A todas as pessoas que participaram nos grupos focais e em todas as provas sensoriais.

Às minhas amigas de sempre, por estarem presentes, por toda a força e carinho. Aos amigos que formei na cidade de Vila Real, por serem os melhores que podia ter ao meu lado. Obrigada por todos os momentos e gargalhadas.

Por último, e com muito orgulho, aos meus pais e irmãos, por todos os valores que me foram transmitidos ao longo da minha formação e que me ajudaram a definir a pessoa que sou hoje. Obrigada por toda a paciência e esforço para que pudesse estudar em Terras Transmontanas. Um especial agradecimento também aos meus avós e ao resto da família que de uma maneira ou outra sempre estiveram por perto.

O meu profundo e sincero obrigado!

Resumo

O tempo de vida útil de um alimento é caraterizado pelo intervalo de tempo em que esse mesmo alimento se encontra apto para o consumo, sem causar qualquer dano na saúde do consumidor, mantendo as suas caraterísticas sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas. O fim do tempo de vida útil é consequência de alterações bioquímicas, químicas, microbiológicas e físicas que ocorrem no alimento. No estabelecimento de prazos de validade podem usar-se essencialmente duas estratégias, tendo em consideração aspetos de segurança sanitária e aspetos sensoriais. O presente trabalho teve como objetivo a revisão de prazos de validade de dois produtos cárneos, mortadela com azeitonas e salpicão, e dois produtos frescos, fígado de porco e peito de frango dando principal destaque à avaliação sensorial por parte de consumidores, complementada com aspetos microbiológicos. Foram realizados também testes de desafio microbiológico com *Listeria monocytogenes* em mortadela com azeitonas e no salpicão, onde se estudou também o eventual efeito da utilização de um extrato de fumo no atraso da multiplicação desse microrganismo patogénico.

Ambos os produtos cárneos estudados suportam bem um prolongamento do prazo de validade, quando armazenados a 6ºC±1, tendo em consideração a aceitação por 50% dos consumidores, até três meses para a mortadela com azeitonas e quatro meses para o salpicão. A mortadela com azeitonas teve a sua perda de frescura associada à multiplicação de bactérias do ácido lático, e respetiva produção de ácido. No salpicão, ocorreu perda de aromas caraterísticos durante o armazenamento. A perda de segurança sanitária durante o armazenamento prolongado pode ocorrer em mortadela se houver contaminação por *L. monocytogenes*. No salpicão esse problema não se coloca.

O peito de frango embalado sob vácuo pode ter a sua vida útil porlongada, com base na aceitação pelo consumidor e nos apsetos microbiológicos. Quando este produto é embalado em atmofesra modificada, perde características de frescura mais rapidamente, sendo difícil prolongar a sua validade. O fígado de porco tem uma validade curta e é difícil prolonga-la, pois o produto começa a ter uma aceitação muito reduzida.

A utilização de imagens dos produtos para apreciação do aspeto pelos consumidores, em substituição dos prodtos reais mostrou-se uma aestratégia interessante, pois permite ultrapassar as dificuldades de gerir uma prova com muitos consumidores com produtos muito perecíveis. As contagens de microrganismos deteriorativos motsraram ter um interesse limitado na definição do prazo de validade, pois encontraram-se produtos com contagens elevadas ainda aceites pelo consumidor, e o contrário, produtos já rejeitados pelo consumidor, com contagens mais reduzidas.

Da análise global dos resultados do presente trabalho, conclui-se que a utilização de testes de consumidores é uma estratégia adequada para definir prazos de validade, e que a contagem de microrganismos deteriorativos tem uma utilidade limitada.

Palavras-chave: Período de vida útil, Produtos cárneos, Análise sensorial, Teste de desafio microbiológico, *Listeria monocytogenes*

Abstract

Shelf life is the length of time during which the food is adequate for consumption without causing any harm to the consumer's health, while mantaining its sensory, chemical, physical and microbiological characteristics. The end of the shelf life is a consequence of biochemical, chemical, microbiological and physical changes that occur on food. In the establishment of shelf life, two main strategies can be used, taking into account the safety and sensorial aspects. The aim of the present work was to revise the shelf life of two meat products, mortadella with olives and salpicão (cured pork loin), as well as two fresh products, pork liver and chicken breast, with emphasis on the sensorial acceptance by consumers, complemented with microbiological aspects. Challenge tests were also carried out with *Listeria monocytogenes* in mortadella with olives and in salpicão. The possible effect of the use of a smoke extract on the delay of the multiplication of this pathogenic microorganism was also studied.

Both of the meat products studied are well tolerant to an extension of the shelf life, taking into account consumer acceptance by 50% of consumers, up to three months in mortadella with olives and four months in salpicão. Mortadella loss of freshness is due to the multiplication of BAL, and the related acid production. In salpicão, characteristic aromas were lost during storage. Loss of dood safety during prolonged storage may occur in mortadella if it is accidentaly contaminated by *L. monocytogenes*. In salpicão this problem does not arise.

Vacuum-packed chicken breast can have its shelflife extended, based on consumer acceptance and microbiological parameters. When this product is packaged in modified atmosphere, it loses freshness characteristics more quickly, and it is difficult to prolong its shelflife. Pig liver has a short shelf life and is difficult to prolong it because the product begins to have a very low acceptance.

The use of images of products to appreciate the appearance of products by the consumers, replacing the actual products proved to be an interesting strategy, as it allows to overcome the difficulties of managing a test with many consumers with very perishable products. Counts of spoilage microorganisms are of limited interest in the definition of shelf life because some products with high counts were still accepted by the consumer, as well the opposite, products were rejected by the consumer having lower microbial counts.

From the overall analysis of the results of the present study, it is possible to concluded that the use of consumer tests is an adequate strategy to define shelf life, and that the count of spoiling microorganisms has a limited utility.

Key words: Shelf life, Meat products, Sensorial analysis, Microbiological challenge tests, *Listeria monocytogenes.*

Índice

Agradecimentos I

Resumo III

Abstract V

Índice de Figuras XI

Índice de Quadros XV

Lista de Abreviaturas XVII

I – Introdução 1

II – Revisão Bibliográfica 7

1. Vida útil da carne e produtos cárneos 9

1.1. Deterioração da carne e produtos cárneos detetável sensorialmente 13

1.1.1. Deterioração com origem microbiológica 13

1.1.2. Deterioração com origem físico-química 21

1.1.2.1. Lipólise e oxidação lipídica 21

1.2. Perda da segurança sanitária da carne e produtos cárneos 23

1.3. A embalagem como estratégia para prolongar a vida útil 26

1.3.1. Tecnologia da embalagem com atmosfera modificada 27

2. Metodologias para estimar a vida útil de alimentos 30

2.1. Testes de Envelhecimento e Análise de Sobreviventes 30

2.2. Testes de Desafio Microbiológico 32

2.3. Estudos de Vida Útil Acelerados 33

2.4. Análises Microbiológicas 33

III – Trabalho experimental 35

1. Apresentação da empresa 37

2. Revisão de prazos de validade de produtos cárneos 39

2.1. Estrutura do ensaio 39

2.2. Testes de Envelhecimento da Mortadela com azeitonas e Salpicão 42

2.3. Preparação do Teste Desafio Microbiologico 43

2.4. Procedimento Analítico 44

2.4.1. Análise Sensorial 44

2.4.1.1. Produtos Cárneos 44

2.4.1.1.1. Grupos Focais 44

2.4.1.1.2. Testes de consumidores 46

2.4.1.2. Produtos frescos 46

2.4.3.2.1 Testes de consumidores online e presenciais 46

2.4.2. Análises Microbiológicas 48

2.4.2.1. Preparação das Diluições e Sementeiras 48

2.4.2.2. Contagem de microrganismos 48

2.4.3. Análises físico-químicas 50

2.4.3.1. pH 50

2.4.3.2. Parâmetros L*a*b* 50

2.4.3.3. Atividade da água 51

2.5. Tratamento de dados 51

IV – Resultados e discussão 53

1. Revisão do prazo de validade de produtos cárneos 55

1.1. Estudo prévio das caraterísticas através de Grupos Focais 55

1.2. Revisão do prazo de validade de Mortadela com azeitonas 58

1.2.1. Evolução da aceitação pelo consumidor e caraterísticas sensoriais ao longo do armazenamento 58

1.2.2. . Evolução da microbiota ao longo do armazenamento 64

1.2.3. Evolução do pH e parâmetros de cor (L*a*b*) ao longo do armazenamento 65

1.2.4. Comportamento de *L. monocytogenes* ao longo do armazenamento de Mortadela com azeitonas e efeito da utilização de extrato de fumo na embalagem 68

1.3. Revisão do prazo de validade de Salpicão 70

1.3.1. Evolução da aceitação pelo consumidor e caraterísticas sensoriais ao longo do armazenamento 70

1.3.2. Evolução da microbiota ao longo do armazenamento 76

1.3.3. Evolução do pH e parâmetros de cor (L*a*b*) ao longo do armazenamento 78

1.3.4. Comportamento de *L. monocytogenes* ao longo do armazenamento de Salpicão e efeito da utilização de um extrato de fumo na embalagem 79

2. Revisão do prazo de validade de fígado de porco e peito de frango embalado em vácuo e atmosfera modificada 81

2.1. Fígado de porco 81

2.1.2. Evolução da aceitação pelo consumidor com base no aspeto e cheiro ao longo do armazenamento 81

2.1.1. Evolução da microbiota e pH ao longo do armazenamento 85

2.2. Peito de frango.....88

2.2.1. Evolução da aceitação pelo consumidor com base no aspeto e cheiro ao longo do armazenamento 88

2.1.1. Evolução da microbiota e pH ao longo do armazenamento.....91

V – Conclusões.....95

VI - Anexos.....99

VII – Bibliografia.....105

Índice de Figuras

Figura 1 - Árvore de apoio à decisão de marcação de data de validade, tendo em consideração questões de segurança alimentar (MPI-NZG, 2016) [1] –Ready to Eat 11

Figura 2 - Representação gráfica da data de validade em função da deterioração microbiana provocada por microflora total, MED e metabolitos. (Adaptado de: Veld, 1996). 16

Figura 3 - Esquema de trabalho para os produtos carneos. 41

Figura 4 - Esquema de trabalho para produtos frescos. 42

Figura 5 - Evolução da aceitação (consumo ou compra) de mortadela com azeitonas armazenado a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 90 dias por 95 consumidores. 59

Figura 6 - Evolução da avaliação global da frescura de mortadela com azeitonas armazenada a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 90 dias por 95 consumidores; (a), (b), (c), (d) – médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p0,05). 60

Figura 7- Análise fatorial das caraterísticas (quadrado negro) da mortadela com azeitonas armazenada a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 90 dias (circulo aberto) por 95 consumidores, no espaço definido pelos primeiros dois fatores, que conjuntamente contribuem 72,98% da informação explicada pelo gráfico. 64

Figura 8 - Evolução do pH em fatias de mortadela com azeitonas, embaladas em vácuo, ao longo de 90 dias de armazenamento a 6ºC (n=3). (a), (b), (c), (d) – médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas 66

Figura 9 - Evolução da contagem de *L. monocytogenes*, inoculada na superfície de mortadela com azeitonas fatiada, ao longo do armazenamento a 6ºC, embalada sob vácuo em embalagem normal e em embalagem pulverizada com extrato de fumo (n=3). (a), (b), (c) – médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05). 69

Figura 10 - Evolução da aceitação (consumo ou compra) de salpicão armazenado a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 126 dias por 81 consumidores. 71

Figura 11 - Evolução da avaliação global da frescura de salpicão armazenado a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 126 dias por 81 consumidores; (a), (b) – médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05).....72

Figura 12 - Análise fatorial das características (quadrado negro) do salpicão armazenado a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 126 dias (circulo aberto) por 81 consumidores, no espaço definido pelos primeiros dois fatores, que conjuntamente contribuem com68,2% da informação explicada pelo gráfico. (A. Aspeto; Ch Cheiro).....75

Figura 13 - Evolução do pH em fatias de salpicão, embaladas em vácuo, ao longo de 126 dias de armazenamento a 6ºC (n=3). (a), (b), (c), (d) — médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05).....78

Figura 14 - Evolução da contagem de *L. monocytogenes*, inoculada na superfície de Salpicão fatiado, ao longo do armazenamento a 6ºC, embalada sob vácuo em embalagem normal e em embalagem pulverizada com extrato de fumo. (a), (b), (c) — médias seguidas de letras de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05).....80

Figura 15 - Intenção de consumo de fígado de porco embalado em MAP manifestada pelos consumidores por avaliação do aspeto (fotografia) e cheiro ao vivo (n=44) e só aspeto online (n= 183) no fim da validade estabelecido pela empresa (f.v.) e em dois tempos de armazenamento subsequentes, a que se acrescentou 2 e 4 dias. 83

Figura 16 - Intenção de consumo de fígado de porco embalado em vácuo manifestada pelos consumidores por avaliação do aspeto (fotografia) e cheiro ao vivo (n=44) e só aspeto online (n=183) no fim da validade estabelecido pela empresa (f.v.) e em dois tempos de armazenamento subsequentes, a que se acrescentou 2 e 4 dias. 84

Figura 17 - Evolução do pH de fígado de porco embalado em atmosfera modificada (linha contínua) ou vácuo (linha descontinua) ao longo do armazenamento além do fim da validade atual definido pela empresa (f.v.). (n=3) 85

Figura 18 - Relação entre a aceitação (ao vivo com base no aspeto imagem e cheiro.) e a contagem de microrganismos em fígado de porco embalado em MAP ou em vácuo. Barras com letras diferentes, dentro de cada grupo de microrganismos, apresentam diferenças significa Meso – Microrganismos totais mesófilos, Psic - microrganismos psicotróficos totais, Enter – *Enterobacteriaceae*, Pseud – *Pseudomonas* spp., BAL – Bactérias do ácido lático. 87

Figura 19 - Intenção de consumo de peito de frango embalado em atmosfera modificada manifestada pelos consumidores por avaliação do aspeto (fotografia) e cheiro ao vivo (n=44) e só aspeto online (n= 173) no fim da validade estabelecido pela empresa (f.v.) e em do e em dois tempos de armazenamento subsequentes, a que se acrescentou 3 e 6 dias.....90

Figura 20 - Intenção de consumo de peito de frango embalado em vácuo manifestada pelos consumidores por avaliação do aspeto (fotografia) e cheiro ao vivo (n=44) e só aspeto online (n= 173) no fim da validade estabelecido pela empresa (f.v.) e em dois tempos de armazenamento subsequentes, a que se acrescentou 5 e 10 dias. 91

Figura 21 - Evolução do pH de peito de frango embalado em atmosfera modificada (linha contínua) ou vácuo (linha descontinua) ao longo do armazenamento além do fim da validade atual definido pela empresa (f.v.). (n=3) 92

Figura 22 - Relação entre a aceitação (ao vivo com base no aspeto imagem e cheiro.) e a contagem de microrganismos em peito de frango embalado em MAP ou em vácuo. Barras com letras diferentes, dentro de cada grupo de microrganismos, apresentam diferenças significa Meso – Microrganismos totais mesófilos, Psic - microrganismos psicotróficos totais, Enter – *Enterobacteriaceae*, Pseud – *Pseudomonas* spp., BAL – Bactérias do ácido lático. 94

Índice de Quadros

Quadro 1 - Caraterísticas fisiológicas e metabólicas de alguns microrganismos específicos de deterioração, assim como a sua importância relativa em carne e em produtos cárneos. (Adaptado de Borch et al., 1996; Pothakos et al., 2015; den Besten et al., 2013; Pereira et al., 2019).....19

Quadro 2 - Caraterísticas fisiológicas e metabólicas de alguns microrganismos patogénicos, assim como a sua importância relativa em carne e em produtos cárneos. (Adaptado de: Food Safety Authority of Ireland, 2017) 25

Quadro 3 - Vida útil atual dos produtos estudados e período de prolongamento da vida útil estudado. 39

Quadro 4 - Ingredientes e informação nutricional de mortadela com azeitonas e salpicão utilizados no presente trabalho. 40

Quadro 5 - Caraterísticas sensoriais extraídas do discurso de três grupos focais que analisaram mortadela com azeitonas com diferentes tempos de armazenamento. 56

Quadro 6 - Caraterísticas sensoriais extraídas do discurso de três grupos focais que analisaram salpicão com diferentes tempos de armazenamento. 57

Quadro 7 - Resultado do teste tipo CATA em mortadela com azeitonas - Frequência da indicação de caraterísticas entre os diferentes tempos de análise comparada pelo teste Q de Cochran. 61

Quadro 8 - Parâmetros microbiológicos de mortadela com azeitonas ao longo do armazenamento (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3). 65

Quadro 9 - Valores padrão dos parâmetros L*, a* e b* de mortadela com azeitonas em cada tempo de análise (média ± desvio-padrão, n=3). 66

Quadro 10 - Resultado do teste tipo CATA em salpicão - Frequência da indicação de caraterísticas entre os diferentes tempos de análise comparada pelo teste Q de Cochran. .73

Quadro 11 - Parâmetros microbiológicos de salpicão ao longo do armazenamento (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3). 77

Quadro 12 - Valores padrão dos parâmetros L*, a* e b* de salpicão em cada tempo de análise (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3). 79

Quadro 13 - Avaliação global da frescura de fígado de porco embalado em MAP e em vácuo ao longo do armazenamento além da validade estabelecida pelo fabricante (f.v.). (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=183 consumidores online; 44 ao vivo). 82

Quadro 14 - Parâmetros microbiológicos de fígado de porco embalado em atmosfera modificada e em vácuo. (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3).....86

Quadro 15 - Avaliação global da frescura de peito de frango embalado em atmosfera modificada e em vácuo ao longo do armazenamento além da validade estabelecida pelo fabricante (f.v.). (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=173 consumidores online; 44 ao vivo). 88

Quadro 16 - Parâmetros microbiológicos de peito de frango embalado em atmosfera modificada e em vácuo. (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3).....92

Lista de Abreviaturas

Aw – Atividade da água

CATA – *Check all that apply*

***L. monocytogenes*. –** *Listeria monocytogenes*

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

MAP – Embalagem de atmosfera modificada

MED – Microrganismos específicos de deterioração

RTE – *Ready to eat*

TDM – Teste de desafio microbiológico

UFC – Unidades formadoras de colónias

WHO – *World Wealth Organization*

I – Introdução

O tempo de vida útil de um alimento é caraterizado pelo intervalo de tempo em que esse mesmo alimento se encontra apto para o consumo, sem causar qualquer dano na saúde do consumidor. O fim do tempo de vida útil é consequência de alterações bioquímicas, químicas, microbiológicas e físicas que ocorrem na matriz alimentar após a produção, durante o armazenamento, distribuição e expedição (Kamleh *et al*., 2012). No estabelecimento de prazos de validade podem utilizar-se essencialmente duas estratégias, tendo em consideração aspetos de segurança sanitária e aspetos sensoriais, fenómenos microbianos e físico-químicos associados. Em alguns alimentos, em particular, naqueles que durante o armazenamento possam sofrer perdas nutritivas assinaláveis, esse aspeto deve ser considerado na definição do prazo de validade (Hough e Garitta, 2012).

Para demonstrar o primeiro, há que ter em consideração a potencial contaminação do produto no final da cadeia de produção, até sair da responsabilidade do fabricante. Com a crescente preocupação com os aspetos de segurança sanitária que existe na indústria, dificilmente este poderá ser a chave da definição do prazo de validade, uma vez que o processo estará concebido para garantir que quando o produto é considerado pronto, não deverá apresentar perigos biológicos relevantes. Porém, no fabrico de alguns produtos, pela natureza do processo, poderá ser possível a presença de alguns microrganismos patogénicos, desde que seja assegurado que esses microrganismos se mantêm em quantidades toleráveis (Pereira *et al*., 2015b).

Dado que muitos dos produtos cárneos são armazenados e mantidos em refrigeração, a maior preocupação que emerge é com *Listeria monocytogenes*. Assim, é comum utilizar testes de desafio microbiológico para demonstrar o comportamento desse microrganismo ao longo do período de armazenamento, quando os parâmetros do alimento assim o exigem. Esses estão previstos no Regulamento CE 1441 de 2007 que altera o Regulamento CE 2073 de 2005 (Regulamento (CE) nº 1441 de 2007):

1.3. Alimentos prontos para consumo não susceptíveis de permitir o crescimento de L. monocytogenes, excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos (4) (8)

(4) Em circunstâncias normais, não se exige a realização de testes regulares dos seguintes alimentos prontos para consumo:
— alimentos prontos para consumo que tenham recebido um tratamento térmico ou outro tratamento eficaz para eliminar a Listeria monocytogenes, quando não for possível uma recontaminação após este tratamento (por exemplo, produtos tratados termicamente na sua embalagem final),
(…)

(8) Os produtos com um pH ≤ 4,4 ou com aw ≤ 0,92, os produtos com um pH ≤ 5,0 e com aw ≤ 0,94 e os produtos com um período de vida útil inferior a 5 dias são automaticamente considerados como pertencentes a esta categoria.
Podem também pertencer a esta categoria outros tipos de produtos, sujeitos a justificação científica.

Os testes de desafio microbiológico, também designados por testes provocação, ou, em inglês, *microbiological challenge tests*, são instrumentos utilizados pela indústria para validar processos de fabrico e definir períodos de vida útil, com base na segurança sanitária do alimento. O princípio destes testes é simples: se o objetivo é eliminar ou deter a multiplicação de determinado microrganismos patogénico, através de um procedimento tecnológico, então desafie-se esse patogénico nas condições reais de fabrico/preparação do alimento, para averiguar qual o seu comportamento. Estes testes substituem de forma mais objetiva as abordagens feitas através de microbiologia preditiva, que frequentemente se baseia em dados obtidos em meio de cultura, com as inerentes limitações de extrapolação para uma linha de fabrico. Os testes de desafio microbiológico devem ser utilizados não só quando se concebe um novo alimento, mas também sempre que se muda o processo de fabrico, composição, caraterísticas finais ou qualquer outro aspeto que possa comprometer a sua segurança sanitária. Em determinados alimentos em que o processo de fabrico não elimina toda a microbiota patogénica, ou quando se considera plausível haver uma recontaminação, o prazo de vida útil deve ser balizado ao período em que essa microflora permanece em níveis não nocivos para a saúde do consumidor esperado. Os TDM são de reconhecida utilidade em alimentos prontos a consumir refrigerados (de longa duração), aliás integrados no código de boas práticas de higiene do *Codex Alimentarius* CAC/RCP 46-(1999) para estes alimentos (FAO/WHO, 2003).

Um dos principais problemas que se coloca quando se define um prazo de validade, e garantida a sua segurança sanitária, nomeadamente através de uma aplicação rigorosa da metodologia HACCP, é a perda da qualidade sensorial. Durante o armazenamento, o alimento experimenta vários fenómenos de deterioração, nomeadamente de carácter químico – como a oxidação lipídica – que leva à ocorrência de cheiro a ranço, ou de caracter microbiológico, que, não representando risco para a saúde do consumidor, depreciam o produto por modificarem as suas características sensoriais, nomeadamente o seu aspeto e cheiro (Vestergaard, 2001). As modificações ao nível do sabor e da textura habitualmente também podem ser consideradas mas, habitualmente, as alterações do aspeto e do cheiro precedem-nas, pelo que o produto será desvalorizado mesmo sem ser mastigado. Muitas dessas modificações são produzidas por microrganismos sobreviventes aos processos de

conservação, particularmente bactérias do ácido lático e estafilococos coagulase negativa, fungos, entre outros. Nos produtos cárneos secos dificilmente haverá envolvimento de E*nterobacteriaceas* e *Pseudomonas* spp.. Nos produtos cozidos essas bactérias Gram negativas poderão contribuir para a deterioração (Borch *et al.*, 1996). É comum, e há profícua bibliografia sobre essa temática, utilizar contagens de microrganismos deteriorativos para estabelecer períodos de validade (Pereira *et al*., 2015b). Porém, a maior dificuldade surge na determinação do ponto de corte em que se considera o produto conforme ou não conforme. É comum utilizar-se "critérios microbiológicos internos", que são por vezes estabelecidos com uma base arbitrária – Porquê limitar um prazo de validade de um enchido seco a uma contagem de totais de 6 log (UFC/g) se a maioria desses microrganismos são bactérias do ácido lático, que não só não são prejudicais, mas até serão uteis na conservação desse produto (Talon *et al*., 2011). Adicionalmente, como a deterioração é um processo multifatorial, envolvendo fenómenos microbiológicos e químicos que interagem entre si, a contagem de microrganismos deteriorativos poderá ser um indicador incompleto da sua aceitabilidade (Pereira *et al*., 2019).

Assim, como o problema da deterioração é a sua deteção pelo consumidor, que o desvaloriza e não compra o alimento (ou não volta a comprar), uma estratégia possível de trabalho para definir prazos de validade – desde que garantida a segurança sanitária – é a sua aceitação pelo consumidor. Assim, executa-se um teste de envelhecimento, em que se armazena o produto nas condições em que normalmente será armazenado (eventualmente podem considerar-se situações de abuso de temperatura se essas forem previsíveis) e em intervalos de tempo definidos, fazem-se provar as amostras por um grupo de consumidores (que deverá envolver várias dezenas) pretendendo-se saber se consumiria aquele produto ou não, tendo em consideração a sua frescura (Richards *et al*., 2014). Um critério comummente usado para definir o limite de tempo em que o produto permanece aceitável é o momento em que, pelo menos 50% dos consumidores indica aceitá-lo (este critério tem em conta que o número de unidades que chegarão ao fim do prazo é já relativamente baixo, e a incidência de casos isolados pouco aceitáveis será residual), mas pode subir-se o grau de exigência, principalmente para produtos de preço diferenciado para uma aceitação superior, como 75% (Calle *et al*., 2006).

Estas provas têm um problema prático, que é a descontinuidade dos momentos em que o produto é provado. Por exemplo, quando se prevê que um produto possa ter uma validade de 6 ou 8 meses, será razoável fazer provas mensais, ou a cada 5 semanas. Assim, haverá um intervalo em que o produto era aceite no momento anterior e não aceite no momento seguinte, o que corresponde a uma dúvida sobre em que momento do intervalo de

rejeição o produto considerado inapto. Voltando ao exemplo anterior, se as provas forem realizadas com 1 mês de intervalo, e o produto deixar de ser aceite aos 5 meses, não sabemos exaltamento em que momento entre os 4 e os 5 meses isso aconteceu. Se por exemplo foi aos 4 meses e 3 semanas, isso pode ser importante do ponto de vista comercial, pois essas 3 semanas certamente corresponderão a um menor custo com devoluções. Para ultrapassar o problema da descontinuidade dos tempos de amostragem, é possível estimar o momento mais exato da rejeição, através de uma metodologia estatística usada desde há longa data no âmbito médico para estudar a esperança de vida associada a doenças – a análise de sobreviventes. Esta técnica tem sido usada com sucesso na estimação do momento "exato" em que um alimento perde a sua aceitação pelo consumidor, e por inerência tem que ser limitado pelo prazo de validade (Giménez *et al*., 2017; Hough *et al*., 2003).

O presente trabalho teve como objetivo a revisão de prazos de validade de dois produtos cárneos, mortadela com azeitonas e salpicão, e dois produtos frescos, fígado de porco e peito de frango dando principal destaque à avaliação sensorial por parte de consumidores, complementada com aspetos microbiológicos. Foram realizados também dois testes de desafio microbiológico com *Listeria monocytogenes* na mortadela com azeitonas e no salpicão, onde foi estudado o eventual efeito antimicrobiano de um extrato de fumo no atraso da multiplicação desse microrganismo patogénico.

II – Revisão Bibliográfica

1. Vida útil da carne e produtos cárneos

Segundo o *Institute of Food Science and Technology* (IFST) podemos definir o período de vida útil de um género alimentício como sendo o período de tempo em que esse mesmo género alimentício permanece seguro, mantém as suas caraterísticas sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas e está em conformidade com o que está expresso no rótulo sobre as suas propriedades nutricionais, quando armazenado sob as condições recomendadas (Hough e Garitta, 2012). No *Codex Alimentarius* a definição apresentada para produtos embalados com longa duração em refrigeração é semelhante, ainda que dê uma enfase maior à questão microbiológica, como é expectável para esse tipo de produtos "O período durante o qual o produto mantém a sua segurança microbiológica e qualidades sensoriais a uma temperatura de armazenamento específica". Baseia-se em perigos identificados para o produto e nas condições de conservação utilizadas, pelo calor ou outros obstáculos ou inibidores da multiplicação microbiana (FAO/WHO, 2003). Genericamente, aquilo que se pretende ao estabelecer um prazo de validade é garantir que o produto, no fim do prazo de validade, para além de não representar perigo para a saúde, não vai desagradar à maioria dos consumidores. Sendo previsível que nem todos os consumidores tenham a mesma apreciação do produto no fim da vida útil, definir uma proporção mínima de aceitação é importante em termos económicos, pois o encurtamento excessivo da vida útil pode encarecer insustentavelmente o alimento (Robertson, 2009). Adicionalmente, mesmo que haja o risco de alguns consumidores considerarem o produto já com fraca qualidade no fim da validade, esse risco é mitigado pelo reduzido número de embalagens que ainda estarão na prateleira no fim da validade (Giménez *et al*., 2012). Esta estratégia de basear a validade na aceitação do consumidor só pode ser aplicada se houver garantias de que o produto não suporta a multiplicação de microrganismos potencialmente perigosos para a saúde. Em alimentos prontos a consumir (RTE, do Inglês *Ready To Eat*), que não têm qualquer tratamento térmico culinário feito pelo consumidor final que melhore o seu perfil microbiológico, a prioridade no estabelecimento do prazo de validade tem que ser o período de tempo em que não há multiplicação de microrganismos patogénicos, ou se a há, que fique dentro de limites toleráveis (Manzocco, 2015). Em alguns alimentos, em que há uma possibilidade de haver perdas nutricionais, que coloquem o produto no fim da validade numa situação de défice de alguns componentes, deve vigiar-se a degradação desses componentes até ao limite que se considera crítico para não aceitar o produto, e estabelecer aí o fim da vida útil. Esta preocupação nutricional é aplicada principalmente a sumos de fruta, alimentos para crianças, de entre outros, sendo que a principal perda que habitualmente acontece é ao nível vitamínico (Gámbaro *et al*., 2005).

A obrigatoriedade dos géneros alimentícios apresentarem no rótulo o período de vida útil é imposta atualmente na União Europeia pelo Regulamento (UE) Nº.1169 de 2011 (Regulamento (CE) nº 1169 de 2011). A responsabilidade de estabelecer essa vida útil é do agente económico que coloca o produto no mercado, tendo esse a liberdade de optar pelo mecanismo que considerar mais adequado para o seu estabelecimento, sensorial, nutricional ou microbiológico, dando sempre prioridade à questão da segurança sanitária (Boxstael *et al*., 2014). Na carne e nos produtos cárneos em concreto, as perdas nutricionais não são habitualmente tidas em linha de conta para estabelecer o prazo de validade. A principal preocupação é o alimento estar sensorialmente aceitável pelo consumidor, e nos RTE com elevada aw e pH, habitualmente refrigerados, a sua segurança sanitária (Chilled Food Association, 2010).

A vida útil de determinado alimento pode ser muito variável em função das condições em que é fabricado e conservado, pelo que é recomendável que seja rotineiramente determinada para cada produto em particular pelo fabricante. Em geral, os fabricantes tentam fornecer a maior vida útil possível, tendo em consideração os custos e as condições de manipulação do produto pelos distribuidores, armazenistas e mesmo pelos consumidores. Os retalhistas pretendem ter em prateleira produtos com a máxima validade possível, pois reduz o número de reposições do produto nas prateleiras, o risco de rejeição pelo consumidor por aproximação ao fim da validade, ou mesmo o risco de ter em prateleira produtos cuja validade já expirou, que é habitualmente um fator que contribui negativamente para a imagem do retalhista. A validade do produto, e a validade ainda restante, é comummente alvo de especificação nos contratos celebrados entre fornecedores e retalhistas, mas habitualmente aponta-se que o retalhista não deve aceitar produtos que já ultrapassaram os três quartos do período de vida útil (Robertson, 2009).

Para definir a vida útil o alimento, há várias questões a ter em consideração, nomeadamente se o alimento é perecível ou estável, se vai ser processado culinariamente antes de ser consumido, que processo de conservação sofreu, de entre outros aspetos. No sentido de sistematizar as decisões que têm que ser tomadas para definir o período de vida útil do alimento, os serviços Neozelandeses do Ministério das Indústrias Primárias (MPI-NZG, Ministry for Primary Industries, NewZeland Government) apresentam uma árvore de decisão que clarifica alguns aspetos a ter em consideração (Figura 1) (MPI-NZG, 2016).

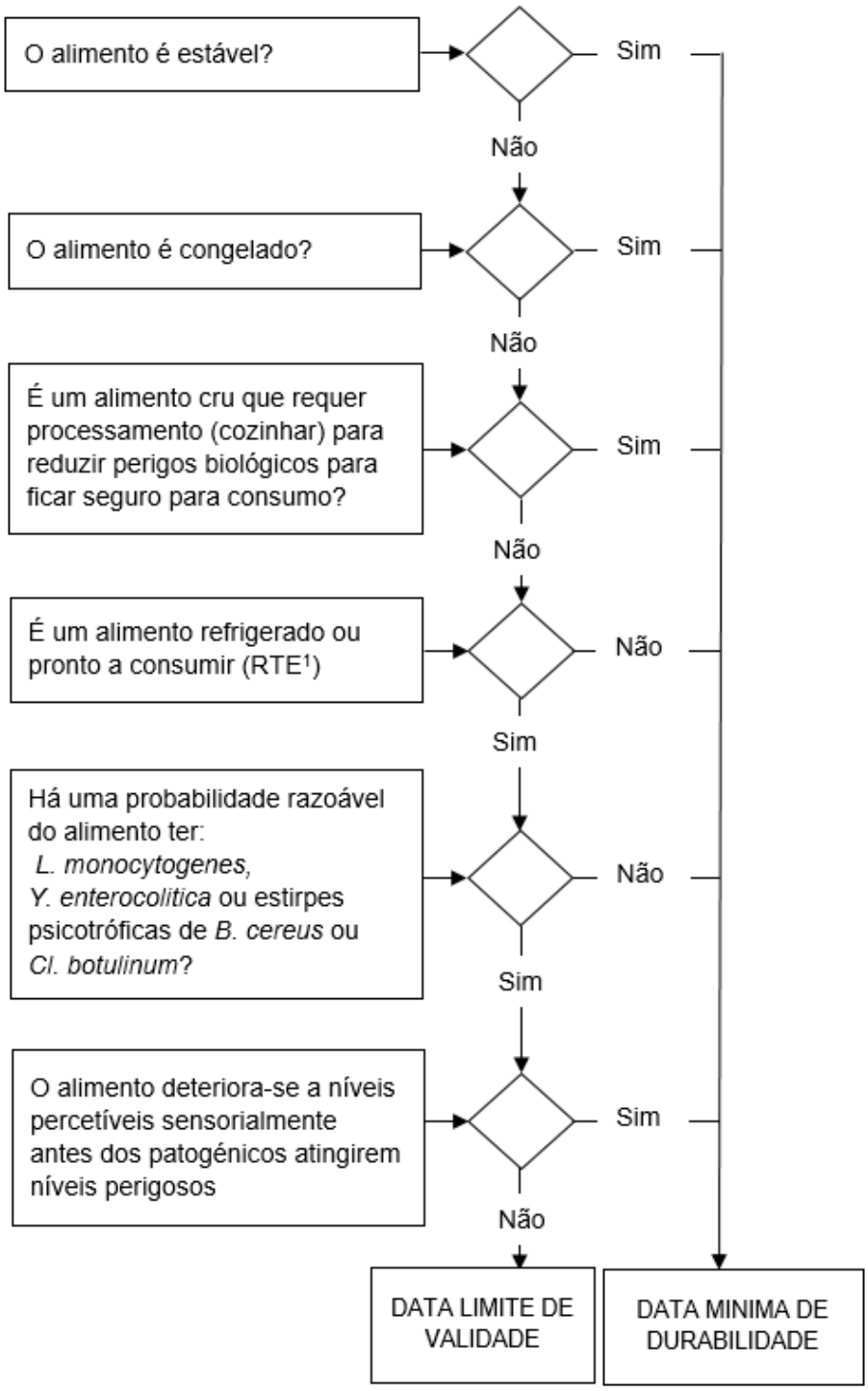

Figura 1 - Árvore de apoio à decisão de marcação de data de validade, tendo em consideração questões de segurança alimentar (MPI-NZG, 2016) [1] –*Ready to Eat*

Tal como se pode inferir da interpretação da Figura 1, existem duas formas distintas de, nos rótulos, apresentar o período de vida útil. Pode-se recorrer à data limite de validade e à data mínima de durabilidade, indicada nos rótulos habitualmente pela expressão “consumir

de preferência antes de …" (Boxstael *et al*., 2014; MPI-NZG, 2016). Nos alimentos com data limite de validade é comum expressar por "consumir até" seguido da data em dia e mês. É usada em alimentos altamente perecíveis, em que o nível de microrganismos patogénicos aumenta de tal forma que torna o alimento inseguro antes da multiplicação de microrganismos deteriorativos, ou alterações físico-químicas, que o tornem inaceitável a nível sensorial. Por outras palavras, alimentos que excedam a data indicada no rótulo já não se encontram seguros podendo causar danos na saúde do consumidor (Wang *et al*., 2018). A segunda é denominada por "consumir de preferência antes de" seguido da data em dia e mês, mês e ano ou apenas ano (Cheftel, 2005). Este período de tempo é definido como a data até à qual o género alimentício, assegurada a sua segurança sanitária, mantém as suas propriedades específicas quando armazenado nas condições mencionadas no rótulo (Regulamento (CE) nº 1169 de 2011). Apesar da diferença na informação que prestam ao consumidor, ambas têm como objetivo salvaguardar a segurança sanitária e qualidade do género alimentício (Boxstael *et al*., 2014).

O prazo de validade de um alimento ou género alimentício deve ser revisto e, se necessário, alterado sempre que há uma mudança dos ingredientes, procedimento ou embalagem. Pelo mesmo motivo, há que tomar cuidados semelhantes quando aplicamos o mesmo período de validade a uma família de produtos muito semelhantes. Neste caso, o alimento mais suscetível para a multiplicação microbiana deve ser utilizado no estudo de vida útil (MPI-NZG, 2016).

São diversos os fatores que influenciam o período de vida útil de um género alimentício. Todas as etapas da cadeia alimentar afetam a qualidade e segurança de um alimento e, consequentemente, o seu processo de degradação. É fundamental conhecermos a sua composição, método de produção e condições de armazenamento a fim de percebermos quais as mudanças que ocorrem durante a sua deterioração.

Podemos dividir os fatores que influenciam o período de vida útil em fatores intrínsecos, extrínsecos e de processamento (Kilcast e Subramaniam, 2000). Esses fatores condicionam a sobrevivência e a multiplicação da atividade microbiana, a ocorrência de reações químicas e enzimáticas de deterioração e de perdas nutricionais. Relativamente aos fatores intrínsecos fazem parte destes as propriedades inerentes ao género alimentício, onde estão incluídos a atividade da água (aw), o valor de pH, a acidez total, o potencial de oxido-redução, o oxigénio disponível, a composição nutricional e química, a microflora natural, a natureza e qualidade das matérias-primas e o uso de conservantes durante a produção. De entre os fatores extrínsecos fazem parte as propriedades relativas ao ambiente que envolve

o género alimentício como a temperatura de armazenamento, humidade relativa do ambiente ou composição da atmosfera envolvente ao alimento. Os fatores de processamento têm como objetivo eliminar ou reduzir a carga microbiana. Pode ser utilizada a exposição à irradiação, a utilização de alta pressão isotérmica, entre outras. Adicionalmente os fatores de processamento incluem as operações unitárias (Kamleh *et al*., 2012; Kilcast e Subramaniam, 2000; MPI-NZG, 2016).

1.1. Deterioração da carne e produtos cárneos detetável sensorialmente

1.1.1. Deterioração com origem microbiológica

A maioria dos alimentos perecíveis apenas permanece edível por um período de tempo limitado, pois a multiplicação de bactérias e de fungos, principal causa de deterioração com origem microbiológica, pode ocorrer num espaço de tempo relativamente curto. Associada à multiplicação da microflora deteriorativa, pode haver deteção das modificações sensoriais introduzidas por essa microflora – como acontece com os bolores superficiais em enchidos, ou modificações químicas, com acumulação de metabolitos decorrentes da atividade microbiana, que são detetáveis sensorialmente (Jin e Choi, 2017). Um alimento que suportou a multiplicação de microrganismos não é necessariamente nocivo para a saúde. A grande maioria dos microrganismos que se multiplicam no alimento não são patogénicos, pelo que a sua presença, em número elevado, para além de deteriorar o alimento, tornando-o pouco apetecível para o consumo, e limitando por inerência a sua vida útil, não representa qualquer perigo para o consumidor. Teoricamente, pode até equacionar-se que um alimento que suportou a multiplicação de microrganismos deteriorativos, e não patogénicos, é mais seguro do que outro da mesma natureza com uma microflora deteriorativa menor. Esta teorização baseia-se em dois aspetos. Por um lado, se houve uma grande multiplicação de microrganismos não patogénicos, por competição é expectável que haja uma menor probabilidade de haver um grande número de microrganismos patogénicos – ainda que seja legítimo considerar que se houve condições para os deteriorativos se multiplicarem, também poderá ter facultado a multiplicação de microrganismos patogénicos (Kumar e Berwal, 1998). Por outro lado, e este é o argumento mais importante, se o alimento tiver uma deterioração sensorialmente detetável, o consumidor não o vai ingerir, pois considera-o repugnante, ou pelo menos não fresco (Kalschne *et al*., 2015). Nesta situação, independentemente do estatuto sanitário do alimento, ele nunca provocará dano na saúde do consumidor, pois não

é ingerido, ainda que esteja associado a perdas económicas e à perda de confiança do consumidor. Este princípio é o que está subjacente à última pergunta na árvore de decisão ilustrada na Figura 1, em que se permite que um alimento em que a deterioração é facilmente percetível seja enquadrado no grupo dos que se recomenda "consumir de preferência antes de…", pois o alimento só é perigoso para o consumidor de tiver um número de microrganismos patogénicos suficiente para provocar doença, mas que continue sensorialmente fresco (Pereira *et al*., 2015b).

A deterioração torna-se óbvia, se considerarmos alterações do aspeto ou a multiplicação visível de microrganismos, como por exemplo o aparecimento de bolor ou um biofilme bacteriano visível. No entanto, quando a deterioração não é tão evidente, os mecanismos subjacentes podem tornar-se difíceis de reconhecer. Diretamente, ou indiretamente, a qualidade sensorial do alimento vai ser sempre afetada pela multiplicação microbiana (Veld, 1996). Assim, poderemos referir que a perceção de um estado de inicial deterioração é uma avaliação com alguma subjetividade, que varia com as experiências dos consumidores e, quando já estamos perante um estado avançado de deterioração o aspeto e cheiro repugnantes do alimento ditam a sua rejeição. Todas estas alterações ocorrem naturalmente no alimento demorando dias ou semanas a aparecer ou, noutros casos, demorar meses ou até anos a serem percetíveis (Hough *et al*., 2003).

A multiplicação de um determinado microrganismo ou grupos de microrganismos durante o tempo de armazenamento de um alimento depende de diversos fatores, intrínsecos ao alimento ou extrínsecos. Devemos ter em conta a contaminação inicial, as propriedades físico-químicas e nutricionais, o teor de humidade, a aw, o pH, a presença de conservantes químicos, a tecnologia de fabrico, assim como todo o ambiente envolvente ao produto. O processamento do alimento e as condições que experimenta ao longo de toda a cadeia de produção e distribuição influencia a carga microbiana que este vai apresentar, quando chegar ao momento do consumo (Kilcast e Subramaniam, 2000).

Se o alimento for submetido a um processamento térmico, este pode destruir quase por completo toda a sua carga microbiana, esporos incluídos, como é o caso da esterilização, ou apenas reduzir a microbiota patogénica e deteriorativa para valores que não causem dano na saúde do consumidor e que retardem a deterioração, como é o caso da pasteurização. No entanto, se durante o armazenamento se desenvolverem condições que permitam a multiplicação microbiana, naturalmente o alimento tornar-se-á impróprio para o consumo (Kreyenschmidt *et al*., 2010). No caso dos produtos cárneos, tirando algumas exceções que são esterilizados (salsichas e lanches de carne) o tratamento térmico usado nos produtos

normalmente designados por produtos cozidos é a pasteurização. Muitos produtos curados, como o chouriço e salpicão, que tradicionalmente eram secos sem qualquer tratamento térmico com efeito letal na microbiota do produto, são hoje em dia pasteurizados, visando eliminar microrganismos patogénicos com baixa dose infeciosa, como *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 (Fraqueza *et al*., 2018).

Quando o alimento é produzido, os microrganismos específicos de deterioração (MED) estão presentes em baixas quantidades, sendo que a microflora total do alimento predomina sobre eles (Figura 2). À medida que o tempo de armazenamento avança verifica-se que os MED se multiplicam a uma taxa mais rápida, vindo a ser a quase totalidade da microflora total. Associado a esta multiplicação, há consumo de substrato e produção de metabolitos responsáveis pelas alterações químicas e físicas que, sendo sensorialmente detetáveis, levam à rejeição por parte do consumidor. Esses metabolitos podem ser muito diferentes, em função dos MED envolvidos no processo de deterioração específico, do alimento e das condições de armazenamento. Como se pode observar na Figura 2, o fim da validade é determinado essencialmente pela deteção sensorial dos metabolitos produzidos por esses MED, que se vão acumulando. Habitualmente, a acumulação de metabolitos detetável sensorialmente coincide com o momento em que a microflora total do alimento é composta quase exclusivamente pelo MED, que também coincide com o início da fase estacionária da sua multiplicação. Num produto cárneo pasteurizado, como a mortadela, os MED podem ser BAL, e nesse caso, o metabolito acumulado será ácido, maioritariamente lático, que será detetado sensorialmente como cheiro a fermentado ou gosto ácido, habitualmente quando a população de BAL atinge o seu máximo, da ordem do 7 a 9 log UFC/g (Labadie, 2007) essa acumulação poderá ser detetável. Numa carne fresca embalada em atmosfera modificada com oxigénio, os MED podem ser *Pseudomonas* spp., que tem uma forte atividade catabólica sobre o azoto não proteico da carne, resultando na deteção sensorial de cheiros habitualmente identificados como pútridos ou amoniacais (Borch *et al*., 1996; Hamasaki *et al*., 2003).

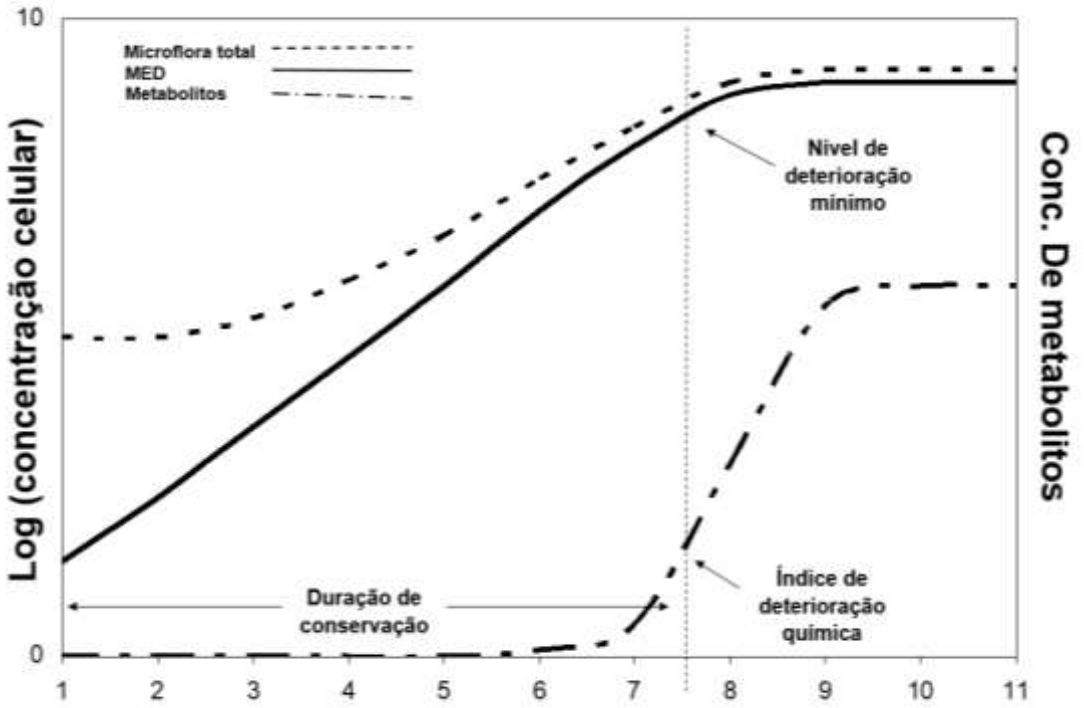

Figura 2 - Representação gráfica da data de validade em função da deterioração microbiana provocada por microflora total, MED e metabolitos. (Adaptado de: Veld, 1996).

A deterioração é causada apenas por uma fração da microbiota inicial do alimento. Como um ecossistema complexo, o alimento detém um conjunto de caraterísticas físico-químicas que permitem o desenvolvimento microbiano (Pennacchia *et al*., 2009). A carne e os produtos cárneos crus e cozidos, pela sua composição são alimentos muito perecíveis (Doulgeraki *et al*., 2012). Os principais microrganismos associados à deterioração de alimentos são: **(1) bactérias Gram-negativas** (*Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, de entre outras); **(2) bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos** (BAL - *Lactobacillus* spp, *Pediococcus* spp., Leuconostoc spp., *Streptococcus* spp., *Carnobacterium* spp. *Weissella* spp. (...); *Brochothrix thermosphacta* e cocos coagulase negativa - *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Kokuria* spp., …); **(3) bactérias Gram-positivas formadoras de esporos** (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp.); **(4) fungos (bolores e leveduras)**. A associação destes microrganismos é muito específica a determinados alimentos, devido à sua microbiota natural, forma de processamento e condições de conservação. Por consequência, a sua importância em carne e em produtos cárneos é consideravelmente diferente. Como se trata de microrganismos com necessidades fisiológicas muito diferentes, e que usam vias metabólicas muito diversas para obter energia e outros nutrientes, as consequências em

termos de deterioração sensorialmente detetável são também muito diferentes (Borch *et al*., 1996; den Besten *et al*., 2013; Pothakos *et al*., 2015). No Quadro 1 sintetizam-se algumas das caraterísticas fisiológicas e metabólicas destes microrganismos, assim como se aponta a sua importância relativa em carne e em produtos cárneos.

Em carnes frescas, e produtos cárneos crus (salsicha fresca, hambúrguer, …) a microbiota deteriorativa será composta essencialmente por bactérias Gram-negativas. A dominância de *Pseudomonas* spp. ou *Enterobacteriaceae* vai depender do tipo de embalagem, com ou sem oxigénio, assim como da temperatura de refrigeração a que estão armazenadas. A temperaturas mais reduzidas, abaixo do 5ºC, *Enterobacteriaceae* têm mais dificuldade em competir com *Pseudomonas* spp., se houver acesso a oxigénio. Em carnes embaladas, as BAL podem também ter alguma importância, pois multiplicam-se bem naquelas condições. Porém, ao contrário das bactérias Gram-negativas, que têm uma forte atividade proteolítica, catabólica sobre o azoto não proteico e lipolítica, que se reflete negativamente no cheiro do produto, as BAL têm um impacto menor, pois as suas principais consequências são a formação de ácido, se houver hidratos de carbono no alimento, e gás, se estiverem presentes estirpes heterofermentativas (Doulgeraki *et al*., 2012; Nychas *et al*., 2008).

Em produtos cárneos secos (chouriço, salpicão, presunto), a deterioração com origem microbiana está essencialmente associada a bolores e leveduras. A multiplicação superficial de bolores em enchidos secos é provavelmente a maior causa de perdas nesta indústria. Como se trata de organismos aeróbios, a embalagem em vácuo ou atmosfera modificada sem oxigénio é uma excelente solução para atrasar a multiplicação de bolores. As BAL e cocos coagulase negativa são microrganismos que se multiplicam até número elevado nestes produtos cárneos, mas que não têm consequências em termos de deterioração, pois fazem parte da sua microbiota natural e desejável (Fraqueza *et al*., 2016; Patarata, 2002). Pelo contrário, a sua presença, por competição e por causa de alguns compostos que produzem, contribui para que não se multipliquem outros microrganismos deteriorativos. A principal preocupação que deve ser atendida em relação às BAL é a presença de estirpes heterofermentativas que por produzirem gás, podem ser responsáveis pelo opado da embalagem, que é um sinal interpretado pelo consumidor como de deterioração.

Nos produtos cárneos cozidos (fiambres, mortadelas…) a esmagadora maioria das bactérias não esporuladas é eliminada. Poderão sobreviver algumas BAL e cocos coagulase negativa que sejam mais termodúricos e microrganismos esporulados. BAL são uma das principais causas de deterioração de produtos cozidos, pois apesar da sua esmagadora maioria ser eliminada na pasteurização, as condições favoráveis para a multiplicação de

estirpes psicotróficas, e a falta de competição, leva a que seja a microbiota dominante durante o armazenamento. Esta dominância de BAL é um mal menor, pois como suprarreferido, estes microrganismos, têm um impacto mais limitado nas caraterísticas sensoriais que outros potencialmente associados à deterioração (Demirok *et al*., 2018; Kreyenschmidt *et al*., 2010). A eventualidade de multiplicação de *Bacillus* spp. ou *Clostridium* spp. está muito associada a incorreções no processamento, especificamente no arrefecimento após a pasteurização. Como na pasteurização estes microrganismos esporulam, o objetivo do processo é que não haja oportunidade de germinação, pois a presença de esporos no produto acabado, como é refrigerado, não representa qualquer problema para a esmagadora maioria das estirpes (exceção de algumas psicotróficas). Como estes microrganismos preferem temperaturas do intervalo mesófilo para germinar, se o arrefecimento for rápido, a passagem por esse intervalo de temperaturas é também rápida, não dando oportunidade aos esporos para germinar. Porém, se o arrefecimento for muito lento, a permanência durante muito tempo na temperatura ótima de germinação pode permitir o arranque da multiplicação do microrganismo, que depois é mais difícil de deter. Acresce apo controlo destes microrganismos a ausência de oxigénio na embalagem, que contribui para o controlo de *Bacillus* spp. e a presença de nitrito, usado com o objetivo principal controlar *Cl. botulinum*, mas que terá também um efeito inibitório sobre outras espécies deste género não patogénicas e associadas à deterioração, assim como de microrganismos de outras espécies (EFSA, 2005; Pereira *et al*., 2017).

Quadro 1 - Caraterísticas fisiológicas e metabólicas de alguns microrganismos específicos de deterioração, assim como a sua importância relativa em carne e em produtos cárneos. (Adaptado de Borch *et al*., 1996; Pothakos *et al*., 2015; den Besten *et al*., 2013; Pereira *et al*., 2019)

Microrganismos Específicos de Deterioração	Caraterísticas	Metabolitos produzidos	Importância em carne e produtos cárneos
(1) Bactérias Gram-negativas			
Pseudomonas spp.	Psicotróficos, competem muito bem em temperaturas de refrigeração; necessitam acesso a oxigénio; pH neutro; aw elevada	Utilizam a fração NPN – amoníaco, cheiros pútridos; favorece ranço. *slime*	Muito importante em carnes frescas não embaladas ou embaladas em MAP com oxigénio Em produtos cárneos secos morrem rapidamente pela reduzida aw; em produtos cárneos cozidos são eliminadas pela pasteurização
Enterobacteriaceae	Psicotróficos (5 a 10ºC), competem melhor a temperaturas de refrigeração mais elevadas que pseudomonas; anaeróbias facultativas; aw elevada	Gás, ácido, *slime*, atividade proteolítica e lipolítica- aromas pútridos	Muito importante em carnes frescas não embaladas ou embaladas em vácuo ou em MAP com oxigénio; Em produtos cárneos similar a *Pseudomonas* spp.
(2) Bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos			
Lactobacillus spp, *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Weissella* spp. *Carnobacterium* spp., *Brochothrix thermosphacta*	Psicotróficos ou mesófilos, anaeróbios facultativos; algumas estirpes podem ser termodúricas, sobrevivendo a tratamentos de pasteurização, vindo depois a dominar a microbiota de produtos cozidos; toleram reduzida aw, pH , sal e aditivos	Alguns produzem gás, ácido, *slime*; atividade proteolítica e lipolítica mais moderada que das gram-negativas – impacto no cheiro dos produtos mais limitado; Algumas espécies produzem diacetílo que confere um cheiro a manteiga	Importante em carnes frescas não embaladas ou embaladas em vácuo ou em MAP com oxigénio; Em produtos cárneos secos fazem parte da sua microflora natural desejável, não têm caracter deteriorativo nesses produtos; produtos cozidos – podem ser dos principais envolvidos na deterioração
Cocos coagulase negativa: *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Kokuria* spp	Preferencialmente mesófilos, aeróbios anaeróbios facultativos; algumas estirpes podem ser termodúricas, sobrevivendo a tratamentos de pasteurização, vindo depois a dominar a microbiota de produtos cozidos; toleram reduzida aw, pH , sal e aditivos	Atividade proteolítica e lipolítica moderada	Em produtos cárneos secos fazem parte da sua microflora natural desejável, não têm carácter deteriorativo nesses produtos; produtos cozidos – podem ser dos principais envolvidos na deterioração

Microrganismos Específicos de Deterioração	Caraterísticas	Metabolitos produzidos	Importância em carne e produtos cárneos
(3) Bactérias Gram-positivas formadoras de esporos			
Bacillus spp	Algumas estirpes são psicotróficas, aeróbios. Sobrevivem a tratamentos de pasteurização	Gás, ácido	Produtos cárneos cozidos mal arrefecidos (arrefecimentos muito longos)
Clostridium spp	Preferencialmente mesófilos, algumas estirpes psicotróficos. anaeróbios	Gás, algumas estirpes muito proteolíticas - cheiros pútridos muito pungentes	Carne embalada em vácuo – *Cl. frigidicarni*s – opado da embalagem; Produtos cárneos cozidos mal arrefecidos (arrefecimentos muito longos)
(4) Fungos			
Bolores e leveduras	Toleram condições que já são muito adversas para outros microrganismos (pH, aw, aditivos, temperaturas reduzidas); aeróbios	Multiplicação superficial detetável; atividade proteolítica e lipolítica; leveduras produzem etanol e gás	Pouca importância em carnes embaladas; em produtos cárneos secos os bolores são uma das principais causas de deterioração; a multiplicação superficial de leveduras (flor) também é depreciativa; Em produtos cárneos cozidos, como são sempre embalados a sua importância será marginal

1.1.2. Deterioração com origem físico-química

A reação com maior relevância na deterioração física dos alimentos é a migração da humidade. Em carne e produtos cárneos este problema está minimizado pela utilização de embalagem. Deve, porém, ter-se em atenção a permeabilidade do material e embalagem ao vapor de água (Rahman, 2007).

Outro problema que se pode colocar é a perda de compostos voláteis que constituem o aroma do produto, ora por perda associada à permeabilidade específica do material de embalagem, ora por migração do alimento para o material de embalagem, deixando o produto com um aroma mais pobre. Este fenómeno foi estudado onde se observou perdas significativas de compostos aromáticos de vinho para vários tipos de filmes de polietileno, perdas essas detetáveis instrumentalmente, mas também sensorialmente pelo consumidor (Kilcast e Subramaniam, 2000).

A migração de gordura para a superfície do alimento, associada a enchidos muito ricos em ácidos gordos insaturados, ou a produtos preparados a partir de emulsões que não estavam devidamente estabilizadas, pode também acontecer durante o armazenamento, desvalorizando o produto por ficar sensorialmente menos apelativo (Feiner, 2006).

As principais alterações químicas que o alimento experimenta durante o processo de deterioração resultam de reações que ocorrem entre componentes do alimento, ou entre estes e condições externas. Das modificações químicas que ocorrem no alimento, a oxidação lipídica é provavelmente a mais importante, particularmente em produtos cárneos que têm um elevado teor em gordura (Amaral *et al*., 2018). Adicionalmente, a mudança do estado de oxidação dos pigmentos da carne, por provocar modificações de cor também pode estar associado a uma menor aceitabilidade do produto por ser considerado um indicador de deterioração (Abreu *et al*., 2018).

1.1.2.1. Lipólise e oxidação lipídica

Os lípidos são uma fração importante da carne, sendo das mais abundantes em enchidos secos crus e produtos cárneos cozidos com estrutura muscular não identificável (Feiner, 2006). As modificações que sofrem podem ser do tipo hidrolítico ou oxidativo e os compostos resultantes desses fenómenos, particularmente dos segundos, têm uma importância determinante no odor dos produtos. Essa importância é variável, pois se em produtos curados ela é habitualmente desejada, dentro de

determinados limites, pois contribui para o aroma caraterístico dos produtos curados, em carnes frescas e produtos cozidos é indesejável, uma vez que está associada ao cheiro habitualmente designado por ranço (Amaral *et al*., 2018).

A composição lipídica da gordura é determinante no conjunto de fenómenos que sofrem, pelo que existem duas classes de lípidos envolvidos nestes processos, os triglicéridos e os fosfolípidos, sendo os primeiros mais abundantes. As modificações hidrolíticas que ocorrem numa carne ou num produto cárneo são decorrentes da ação de enzimas que podem ser endógenas da carne ou produzidas pela microbiota presente nesses produtos. O contributo dos ácidos gordos livres para o cheiro da carne ou produtos cárneos não é claro e considera-se que seja marginal, uma vez que os ácidos gordos libertados em maior quantidade, particularmente, o oleico e o linoleico são considerados desprovidos de cheiro ou sabor. Porém, o aumento do teor em ácidos gordos livres está intimamente ligado à oxidação, e à consequente formação de cheiros a ranço e a requentado (Singh *et al*., 2018).

A oxidação dos ácidos gordos tem um papel paradigmático em produtos cárneos curados. Por um lado, essas modificações são associadas a caraterísticas sensoriais depreciativas, como o cheiro a ranço, alterações da cor, e a formação de compostos potencialmente tóxicos (Maldonado-Pereira *et al*., 2018). Por outro lado, em trabalhos de identificação dos componentes da fração volátil dos enchidos, é destacada a importância dos compostos resultantes da oxidação lipídica como dos principais responsáveis pelo seu aroma típico, não só pela sua abundância, mas também pelo reduzido limiar de perceção olfativa que têm (Flores, 2018).

Os substratos das reações de oxidação são maioritariamente ácidos gordos insaturados, que quanto maior for o seu grau de insaturação, maior será a sua suscetibilidade à oxidação. Os produtos primários da oxidação lipídica - peróxidos lipídicos são desprovidos de cheiro ou sabor, pelo que não contribuem para a formação do odor a ranço. No entanto, como são instáveis, são rapidamente degradados a produtos secundários que são, esses sim, responsáveis pelas modificações organoléticas. Cada ácido gordo insaturado produz hidroperóxidos específicos, que, por sua vez, se decompõem em produtos secundários específicos, esses sim com importantes impactos aromáticos, nomeadamente aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos e ésteres, entre outros. Os produtos finais destas reações possuem odores intensos, pelo que o perfil e quantidades em que estão presentes determinam o cheiro do alimento, e consequentemente o grau de aceitabilidade do produto (Kosowska *et al*., 2017; Yang e*t al*., 2017).

1.2. Perda da segurança sanitária da carne e produtos cárneos

O principal objetivo da segurança alimentar é proporcionar aos consumidores alimentos salubres e inócuos. Apenas uma determinada gama de microrganismos são responsáveis pela maioria das doenças de origem alimentar e, a sua multiplicação e produção de toxinas é dependente da matriz alimentar onde estão presentes. Esta interação entre as caraterísticas endógenas dos alimentos e a possível multiplicação do agente patogénico que poderá estar presente, por vezes torna-se complexo. No Quadro 2 estão descritas as caraterísticas dos principais microrganismos patogénicos e quais os alimentos onde têm uma maior incidência.

Existem quatro microrganismos que se desenvolvem a temperaturas de refrigeração que é preciso ter em conta quando determinamos um momento de corte para o prazo de validade em alimentos RTE. Eles são *Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum, Bacillus cereus* e *Yersinia entercolitica.* Se qualquer uma dessas bactérias tiver alguma probabilidade de estar presente no alimento no final do processamento, é de extrema importância considerar se as condições de armazenamento e o tempo resultarão numa multiplicação até níveis considerados perigosos para o consumidor, durante todo o prazo de validade (Food Safety Authority of Ireland, 2017).

Uma das preocupações que temos que ter em conta é se o alimento se torna repulsivo a nível sensorial antes de ser atingido o limite crítico de multiplicação microbiana. Se se tornar, como acontece na presença de *Clostridium botulinum* proteolitico, onde da degradação de aminoácidos resulta um aroma pútrido, o consumidor nunca o irá consumir, logo não é atribuída demasiada importância a esse microrganismo. Agora no caso de outros patogénicos, *Clostridium botulinum* não-proteolítico ou *Listeria monocytogenes*, por exemplo, onde a sua multiplicação não se reflete em caraterísticas sensoriais, o consumidor não saberá se este está seguro ou não (Notermans *et al*., 1993; Pereira *et al*., 2015c).

Listeria monocytogenes, de caráter aeróbio, microaerófilo e anaeróbio facultativo, com caraterísticas psicotróficas e mesofílicas, conseguem desenvolver-se a partir dos 0-1°C até aos 45°C, apresentando uma multiplicação ótimo entre os 30°C e 37°C (Buchrieser, 2007), possibilitam a sua sobrevivência nos mais diversos ambientes. Atualmente tem verificado favoritismo por alimentos RTE, uma vez que são altamente processados, apresentam um período de vida útil longo em temperaturas de refrigeração, são normalmente embalados sob vácuo ou atmosfera modificada e são

consumidos sem terem sido submetidos a tratamento térmico ou sem sofrerem qualquer adição de substâncias antibacterianas (Leong *et al*., 2016). A listeriose, doença provocada por este microrganismo, pode ser de carater não invasiva ou invasiva. A não invasiva apresenta sintomas comuns de gripe normal como fadiga, dor muscular, dor de cabeça e das articulações e arrepios, ao mesmo tempo que se desenvolve uma gastroenterite (Liu, 2006). Esta última tem um período de incubação curto que pode ir de poucas horas até 3 dias após o contacto. A forma mais grave e invasiva da doença pode ter um período de incubação longo, de dias a 3 meses, e pode-se desenvolver sob a forma de aborto, septicémia, meningite e encefalites o que, na maioria dos casos, é fatal (Food and Drug Administration, 2012; Liu 2006). Os critérios de segurança alimentar para a presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos são instituídos pela União Europeia. Em alimentos para serem consumidos por crianças ou para propósitos médicos, *Listeria monocytogenes* tem de estar ausente em 25g do alimento, e em alimentos RTE, que podem suportar a multiplicação do patogénico, o limite é de 100 UFC/g durante o seu período de vida útil (Regulamento (CE) nº 1441 de 2007).

É importante reforçar que a proteção do consumidor passa por prevenir a contaminação dos alimentos que admitam condições necessárias para a sua multiplicação (Tompkin, 2002).

Quadro 2 - Caraterísticas fisiológicas e metabólicas de alguns microrganismos patogénicos, assim como a sua importância relativa em carne e em produtos cárneos. (Adaptado de: Food Safety Authority of Ireland, 2017)

Microrganismos Patogénicos	Temperatura	pH	Aw	% Sal	Atmosfera	Alimentos associados
	mínimo – ótimo - máximo		mínimo	máximo		
Salmonella spp.	5 (35-43) 47	3.8 (7-7.5) 9.5	0.94	4	Facultativo	Ovos, carnes, produtos láticos não pasteurizados, sementes germinadas, fruta, vegetais, chocolate, fórmula infantil, especiarias, ervas, etc.
Clostridium botulinum (Proteolytic)	10 (35-40) 42	< 4.6 (7) 8	> 0.94	10	Anaeróbico	Alimentos enlatados e embalados em vácuo e atmosfera modificada
Clostridium botulinum (Non-Proteolytic)	3 (28-30) 35	< 5.0 (7) 8	> 0.97	5	Anaeróbico	Alimentos embalados em ambientes com pouco oxigénio
Staphylococcus aureus	10 (40-45) 48	4 (7-8) 9.6	0.83	10	Facultativo	Ovos, aves domésticas, carnes, produtos láticos, confeitaria, saladas, sandes, etc.
Campylobacter spp.	32 (42-43) 45	4.9 (6.5-7.5) 9	> 0.98	1.5	Micro-aerofilico	Aves domesticas, leite não pasteurizado e produtos láticos
Yersinia enterocolitica	-1.3 (25-37) 42	4.2 (7.2) 9.6	0.94	7	Facultativo	Carnes frescas (suíno particularmente), leite não pasteurizado e produtos láticos
Listeria monocytogenes	1.5 (30-37) 45	4.2 (7) 9.5	0.90	12	Facultativo	Alimentos RTE e alimentos refrigerados
Clostridium perfringens	10 (43-47) 50	5.5 (7.2) 9	0.93	6	Anaeróbico	Carnes cozidas, molhos e sopas
Shiga toxin (STEC) ou *Verocytotoxin* (VTEC) producing *Escherichia coli*	6.5 (30-40) 45	3.6 (6-7) 9	0.95	> 6.5	Facultativo	Carne, aves domésticas, produtos laticos não pasteurizados, sumo de maça, sementes germinadas, salada de legumes, água potável não tratada, etc.
Bacillus cereus	4 (30-40) 55	4.3 (6-7) 9.3	0.93	7.5	Facultativo	Arroz cozido, especiarias e fórmulas líquidas neonatais
Vibrio parahaemolyticus	5 (37) 43	4.8 (7.8-8.6) 11	0.94	8	Facultativo	Peixe e marisco

1.3. A embalagem como estratégia para prolongar a vida útil

Há mais de 10 mil anos, com o aparecimento da sedentarização, o Homem foi confrontado com a necessidade de transportar e armazenar os alimentos, mantendo-os comestíveis até à sua utilização (MPI-NZG, 2016). Nos dias de hoje, é a recorrente troca de alimentos frescos entre mercados distantes que levou ao desenvolvimento de condutas capazes de estender o prazo de validade (Jiménez *et al*., 1997). As primeiras embalagens eram feitas de conchas, troncos de árvores, folhas e tecidos. Posteriormente passaram a ser preparadas com cerâmica, madeira, vidro e aço. No séc. XX o plástico tornou-se o principal constituinte dos materiais integrantes das embalagens, sendo substituído gradualmente por filmes poliméricos e outros materiais alternativos (FAO, 2012; Gorris e Peppelenbos, 1992).

O principal objetivo da embalagem é manter o alimento em boas condições até ao seu consumo. No entanto, e para atingir este fim, existem quatro principais funções que uma boa embalagem deve possuir (FAO, 2018; Hawkes, 2010):

a) A função de proteção: deve fornecer uma barreira contra a sujidade, mantendo o alimento livre de quaisquer contaminações. Deve também proteger o alimento contra adulteração e perda de integridade evitando perdas.
b) A função de conservação: a embalagem deve manter a qualidade e a segurança do produto, prolongando o seu período de vida útil e minimizando ao máximo as perdas devidas à deterioração do mesmo. Como tal, a embalagem deve ser adequada ao tipo de alimento e deve controlar fatores como humidade, oxigénio e exposição à luz. A embalagem deve ser feita com materiais que não migrem para o produto em quantidades que possam colocar em risco a segurança dos consumidores ou alterar as caraterísticas organoléticas do produto.
c) A função de informação: a embalagem funciona como veículo de informação e, como tal, deve fornecer todas as informações necessárias para o bom manuseamento do alimento quer durante o seu armazenamento, preparação e uso. A informação incluída nos rótulos está devidamente regularizada pelo Regulamento (UE) Nº 1169 de 2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011.
d) A função de conveniência ou serviço: a embalagem deve ser conveniente e adequada à sua utilização. A sua proporção também deve ser a apropriada para o fim a que se destina e o seu *design* goza da capacidade de persuadir o comprador no ponto de venda (Mcmillin, 2017).

Após percebermos quais as principais causas de deterioração do alimento, estas podem ser manipuladas com o intuito de aumentar o tempo de vida útil (MPI-NZG, 2016). Vários métodos de preservação têm sido aplicados com o objetivo de expandir o tempo de vida útil dos alimentos mais perecíveis durante o seu armazenamento, evitando o recurso a conservantes químicos (Pennacchia *et al*., 2009). Os fatores que mais influenciam a multiplicação microbiana são a temperatura de armazenamento e a composição da atmosfera no interior da embalagem (Casaburi *et al*., 2015). Deste modo, o consumo de alimentos embalados em atmosfera modificada têm vindo a aumentar (Gorris e Peppelenbos, 1992).

Tanto os alimentos embalados em vácuo como os alimentos embalados numa mistura de gases têm controlada a multiplicação microbiana devido à quantidade limitada de O_2 e à grande disponibilidade de CO_2. Porém, este tipo de embalagem não elimina os microrganismos patogénicos e, sobre certas circunstâncias, podem levar à sua multiplicação, sobretudo em tempos de armazenamento prolongados ou com abusos de temperatura. A escolha de uma embalagem inadequada pode levar à perda de qualidade do alimento, assim como da sua segurança sanitária (Gorris e Peppelenbos, 1992).

1.3.1. Tecnologia da embalagem com atmosfera modificada

O principal objetivo das embalagens com atmosfera modificada é estender o prazo comercial dos alimentos prevenindo ou retardando quaisquer alterações inoportunas nas caraterísticas sensoriais, nutritivas e microbiológicas (Mantilla *et al*., 2010). Este tipo de embalagem consiste na substituição do ambiente circundante ao alimento, geralmente por uma mistura de gases, ao invés de somente um. A principal razão pela qual o ar é removido na sua totalidade é impossibilitar a multiplicação de microrganismos tanto deteriorativos como patogénicos aeróbicos (Mcmillin, 2017; Mantilla *et al*., 2010). É importante que os materiais integrantes destas embalagens forneçam uma barreira a todos os gases, impedindo que estes voltem para dentro da embalagem. No entanto, somente são suprimidos microrganismos aeróbicos, maioritariamente responsáveis pela produção de slime e rancificação (Mantilla *et al*., 2010), enquanto os aeróbicos facultativos e anaeróbicos são minimamente favorecidos ao longo do armazenamento ou não sofrem quaisquer alterações (Gracey *et al*., 1999; Mantilla *et al*., 2010). Esta embalagem demonstra ser uma vantagem no que diz respeito à cor, fator essencial para a aceitação sensorial, pois um ambiente desprovido de oxigénio retarda a descoloração da carne, assim como retarda o fenómeno de oxidação lipídica (Mcmillin, 2017).

Nas embalagens onde a atmosfera inicial é substituída por outra, a mistura de gases usados depende da natureza do alimento, da capacidade de multiplicação que a microbiota natural do alimento possui, do seu processo de deterioração, da sensibilidade que do alimento ao oxigénio e ao dióxido de carbono, assim como das caraterísticas que se pretendem alcançar (Mcmillin, 2017; Mantilla *et al*., 2010). Normalmente, os gases utilizados são o CO_2, N_2, Ar e O_2, numa grande multiplicidade de combinações uma vez que cada gás desempenha determinada função. A escolha da atmosfera depende do alimento, possibilitando assim o controle das reações químicas, microbianas e enzimáticas impedindo ou reduzindo a deterioração durante o período de armazenamento do alimento (Macedo *et al*., 2010). O azoto, N_2, é um gás inerte e tem como principal função evitar o colapso da embalagem funcionando como gás de enchimento (Mcmillin, 2017). Possui propriedades que o tornam sadio tais como a não reação com os pigmentos da carne mantendo esta o seu aspeto (Zhou *et al*., 2010), retardando a rancificação oxidativa e, combinado com o CO_2, detém a multiplicação microbiana. O oxigénio, O_2, é responsável por muitas das reações de deterioração causadoras de viscosidade, rancificação e alterações na cor de vários alimentos (Mantilla *et al*., 2010). Se considerarmos alimentos que mantêm a sua atividade metabólica após embalamento (alimentos respiráveis), é desejável que a atmosfera permita que um determinado nível do seu metabolismo se mantenha capaz de ser utilizado para produzir energia suficiente, de forma a não só aumentar o seu tempo de vida útil, mas, principalmente, manter a sua qualidade inicial (Gorris e Peppelenbos, 1992). Normalmente estas atmosferas contêm altos níveis de O_2, podendo ser superior a 70% (Macedo *et al*., 2010; Gorris e Peppelenbos, 1992). Exemplos de alimentos respiráveis são frutas e vegetais. No caso de alimentos que suspendem a sua atividade metabólica como a carne, o uso de O_2 é evitado, ou utilizado em pequeníssimas percentagens (Macedo *et al*., 2010; Gorris e Peppelenbos, 1992; Mantilla *et al*., 2010) Quando é utilizado em pequenas quantidades estimula a multiplicação de bactérias aeróbicas e reduz a multiplicação da microbiota anaeróbia restrita, o que faz com que haja uma maior competitividade entre bactérias, suprimindo o desenvolvimento de possíveis bactérias patogénicas (Mantilla *et al*., 2010). O dióxido de carbono, CO_2, goza de um elevado efeito antibacteriano (Mcmillin, 2017; Mantilla *et al*., 2010). No entanto este efeito é influenciado por vários fatores tais como o tipo de alimento, a sua carga bacteriana inicial, o tempo e temperatura de armazenamento. Quando se dissolve na água, acidifica-a, o que também ajuda a suprimir a multiplicação da microbiota deteriorativa (Mantilla *et al*., 2010). Como na carne a deterioração é maioritariamente de carater bacteriano, a percentagem de CO_2 deve ser a mais elevada possível devido ao seu efeito bacteriostático (Jayasingh *et al*., 2002; Mantilla *et al*., 2010). Nestes casos, e tendo em consideração somente a multiplicação microbiana, a composição gasosa mais empregue é o dióxido de carbono, em

percentagens que oscilam entre 30% a 60%, e o azoto nas percentagens de 40% a 70%. Porém, há que ter em consideração que o dióxido de carbono pode provocar uma descoloração tal da carne que a torna inaceitável para o consumidor (Mantilla *et al*., 2010).

2. Metodologias para estimar a vida útil de alimentos

A primeira etapa para definir um prazo de validade é saber se os consumidores irão aceitar o alimento durante o intervalo de tempo de armazenamento instituído (Hough, 2010).

É essencial garantir a segurança sanitária do alimento até ao final da sua produção e consequente distribuição. Hoje, e com a crescente preocupação sobre os aspetos de segurança sanitária que prevalecem na indústria, dificilmente o prazo de validade será definido pela carga microbiológica inicial do alimento. Existem vários alimentos que após um período alargado de armazenamento são microbiologicamente seguros. No entanto, conseguem ser alvo de rejeição devido a alterações sensoriais que advieram durante esse mesmo intervalo de tempo (Hough *et al*., 2003). Do mesmo modo, é importante referir que a quantidade de alimentos cujo período de vida útil depende das propriedades sensoriais é muito mais extenso que a quantidade de alimentos cujo período de vida útil depende das propriedades microbiológicas (Hough e Garitta 2012). Por estas razões, quando falamos de período de vida útil, principalmente em alimentos microbiologicamente estáveis, atribuímos uma maior importância às propriedades sensoriais (Guerra *et al*., 2008; Hough e Garitta, 2012), tornando-se fundamental a garantia de que estas permanecem minimamente inalteradas (Hough, 2010).

Para a determinação do tempo de vida útil de determinado alimento podem ser empregues diversas metodologias tais como testes de envelhecimento e análise de sobreviventes, testes de desafio microbiológicoo, testes de vida útil acelerados e análises microbiológicas.

2.1. Testes de Envelhecimento e Análise de Sobreviventes

Os testes de envelhecimento relatam as alterações organoléticas que o alimento experimenta durante o seu armazenamento. Previamente são recolhidas amostras que irão ser armazenadas nas condições ideais de armazenamento, durante intervalos de tempo definidos. Ao fim de cada período de tempo previamente estabelecido, efetuam-se provas das amostras com um grupo de consumidores sendo-lhes colocada a seguinte questão: “Normalmente consumiria este produto?”; a resposta será dada nos termos “consumiria” ou “não consumiria” (Hough *et al*., 2003; Pereira *et al*., 2019). Normalmente o critério usado para definir o limite de tempo em que o produto permanece aceitável é definido como o instante

em que, no mínimo, 50% dos consumidores sugere aceitá-lo. Contudo, para produtos de preço diferenciado pode subir-se o grau de exigência para uma aceitação de 75% (Alfaro *et al*., 2011; Guerra *et al*., 2008).

O grupo de consumidores deve envolver várias dezenas de pessoas que por norma, devem ser consumidores regulares do alimento em questão e devem estar motivados para participar no estudo (Pereira *et al*., 2015a). Porém, é preciso especial atenção para não serem apresentadas mais que 3 ou 4 amostras por sessão, uma vez que, segundo estudos concebidos por Garitta, os consumidores perdem a capacidade para as discriminar (Hough e Garitta, 2012).

Um problema que se levanta no decorrer das provas é estipular, com exatidão, qual o momento da rejeição. Haverá um intervalo de tempo em que o produto foi aceite na prova anterior mas não aceite na prova seguinte o que, naturalmente, se traduz numa dúvida: qual o momento exato em que o alimento deixou de ser aceite pelos consumidores? Pode parecer exíguo, uma vez que poderíamos delimitar o tempo de vida útil ao último momento de aceitação do alimento. No entanto, esta questão é importante do ponto de vista comercial, dado que o período de tempo entre os dois momentos ir-se-á refletir num maior número de devoluções, o que se traduz em maior desperdício alimentar. Para ultrapassar esta dificuldade, recorre-se uma metodologia utilizada extensivamente em estudos clínicos epidemiológicos, estudos sociológicos e estudos de confiabilidade, chamada, Análise de Sobreviventes (Calle *et al*., 2006; Hough, 2010). Esta metodologia é definida como a recolha de procedimentos estatísticos para análise de dados, para a qual a variável de interesse que é o tempo até determinado evento ocorrer (Hough, 2010). Por outras palavras, consegue definir qual a probabilidade de um consumidor aceitar o produto x, armazenado por determinado tempo y (Hough *et al*., 2003; Torrieri *et al*., 2008).

A Análise de Sobreviventes foi introduzida em estudos sobre as alterações sensoriais de alimentos por Gacula e Sing no ano de 1984 (Alfaro *et al*., 2011) e mais tarde aplicada na determinação do tempo de vida útil de vários alimentos, sendo usada para calcular qual o limite de aceitação a partir do parecer dos consumidores a nível sensorial (Araneda *et al*., 2007; Calle *et al*., 2006). Para melhor entendermos esta metodologia é necessário definir o evento que, no caso dos estudos sobre o tempo de vida útil é a inaceitabilidade por parte do consumidor. Deduzimos, que a variável que descreve o evento é binária, apenas sendo possíveis duas situações: a aceitabilidade ou a inaceitabilidade do produto (Guerra *et al*., 2008). Estes testes tornam-se importantes na indústria alimentar, uma vez que durante o armazenamento e apesar do alimento estar seguro do ponto de vista microbiológico, este

pode ser rejeitado devido às suas alterações organoléticas (Alfaro *et al*., 2011; Hough *et al*., 2003).

2.2. Testes de Desafio Microbiológico

Os TDM são utilizados para determinar a capacidade que determinada matriz alimentar possui para suportar a multiplicação de determinado microrganismo, podendo ser patogénico ou deteriorativo (Vestergaard, 2001). São amplamente utilizados na indústria como ferramenta para definir prazos de validade com base na segurança sanitária do alimento. No entanto podem ter como objetivo estabelecer os pontos críticos de controlo numa linha de processamento.

Trata-se de estudos complexos e deve ter-se em conta vários aspetos aquando da sua execução tais como a escolha do microrganismo, do nível de inoculação, as condições de preparação do inóculo e o método de inoculação, a duração do ensaio, a formulação/processamento do alimento e as condições de armazenamento, a análise das amostras e os critérios de aceitação.

O microrganismo de interesse é incubado através de métodos padronizados no alimento e é observado o seu comportamento. A escolha desse microrganismo depende da composição da matriz alimentar a analisar, do historial do alimento (se no passado esteve associado a algum surto), das condições de armazenamento do alimento e das condições de produção (Notermans *et al*., 1993). No caso deste teste se realizar com um microrganismo patogénico, podem ser utilizadas estirpes da mesma espécie que diferem da espécie patogénica na sua toxicidade. Devem ser usadas amostras a servir de controlo para aferir como é que a microflora natural do produto reage durante o tempo de vida útil (Vestergaard, 2001).

A frequência com que se deve analisar o alimento deve ser 5, no máximo 7 períodos do seu tempo de vida útil. Se o produto é comercializado embalado, as amostras têm de ser embaladas da mesma forma e usando os mesmos materiais; e a temperatura utilizada durante o estudo deve ser a mesma a que o produto é normalmente armazenado e distribuído. Se o produto é refrigerado e sofre abusos de temperatura, o desafio deve contemplar esses mesmos abusos a fim de aproximar ao máximo as condições reais a que o alimento é submetido (Notermans *et al*., 1993; Vestergaard, 2001).

Muitas vezes este tipo de testes tornam-se desnecessários uma vez que o consumidor tende a rejeitar o alimento devido a alterações sensoriais, antes de ser atingido um nível de crescimento exponencial do microrganismo em questão (Pereira *et al*., 2015c). No entanto, se a multiplicação desse mesmo microrganismo não for claro, os testes de desafio microbiológico tornam-se uteis.

É importante frisar que estes estudos não devem ser realizados, de maneira alguma, na unidade industrial de processamento alimentar a fim de evitar qualquer contaminação das instalações. Devem ser realizados apenas em laboratórios específicos para o efeito (MPI-NZG, 2016).

2.3. Estudos de Vida Útil Acelerados

Nos testes de vida útil acelerados, o alimento é sujeito a uma situação extrema durante o armazenamento com o objetivo de acelerar as reações de deterioração. Como situação adversa pode ser utilizada um aumento da humidade assim como da exposição à luz, no entanto o mais utilizado é um abuso na temperatura (MPI-NZG, 2016; Richards *et al*., 2014). O alimento é armazenado de acordo com a condição de *stress* definida, e ao fim de algum tempo é analisado. Posteriormente os resultados são transpostos, obtendo-se assim a data de validade em condições normais de armazenamento (Richards *et al*., 2014).

2.4. Análises Microbiológicas

Uma vez que os alimentos não são estéreis, durante um armazenamento inadequado pode ocorrer a multiplicação descontrolada da sua microflora, fator que pode ser determinado em laboratório, sem ser necessária intervenção sensorial (Hough e Garitta, 2012). No entanto as análises microbiológicas isoladas podem não ser suficientes para compreender as mudanças da microflora da carne crua em resposta às diferentes condições de armazenamento (Doulgeraki *et al*., 2012). Os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios constam no Regulamento (CE) Nº1441 de 2007 (Kamleh *et al*., 2012; Regulamento (CE) nº 1441 de 2007). Por vezes é também necessário analisar diversos

parâmetros químicos tais como o pH, a aw ou a cor, a fim de observarmos a evolução do alimento (Pereira *et al*., 2015b).

III – Trabalho experimental

1. Apresentação da empresa

A empresa onde se enquadrou o objeto principal da presente dissertação, Irmãos Monteiro SA., é uma indústria alimentar que se baseia na desmancha e transformação de produtos cárneos e de refeições congeladas, líder de mercado, situada em Aveiro. Comporta também a empresa Centralrest.Lda, responsável por elaborar refeições prontas tradicionalmente portuguesas.

Em 1975, Joaquim Soares Monteiro com apenas 21 anos de idade, construiu um talho moderno para a época, no Mercado Manuel Firmino em Aveiro. O negócio cresceu de tal forma que o seu irmão foi convidado a ingressar na gerência, sendo que após 6 anos, em 1981 construíram a empresa Irmãos Monteiro Lda.. Perante o desenvolvimento alcançado, os irmãos decidiram construir um armazém frigorífico que serviria de apoio à rede de talhos existentes nos concelhos próximos da cidade, assim como para o fabrico de salsicharia artesanal. No ano de 1985 foi criada uma rede de talhos que dava expansão ao talho inicial, designando-se a empresa de Biobom Lda. Tal crescimento apenas foi possível devido à visão empreendedora de ambos os irmãos considerando imprescindível a formação profissional. Três anos mais tarde, a Irmãos Monteiro SA. passou a operar com uma unidade de desmancha, desossa, corte e embalagem de carne que foi posteriormente desativada.

Em resposta à evolução do setor e para garantir uma maior flexibilização, em 1998 foi inaugurada uma nova unidade industrial que deu origem a 3 setores produtivos: desmancha, desossa e corte; congelação e embalagem; e produção de preparados de carne e pré-cozinhados. Em 2004 foi integrada a produção dos produtos de salsicharia tradicional, sendo desativada a unidade pioneira. Esta nova unidade situa-se na Zona Industrial da Mota – Gafaha da Encarnação, onde atualmente vigora.

Em 2006 a Irmãos Monteiro SA. volta a sofrer um novo aumento com a introdução de uma empresa recém-formada, Centralrest Lda. Esta tem como objetivo principal apoiar uma cadeia de restaurantes (Restaurantes Chiado) e crescer no mercado, estando sempre focada em criação das melhores soluções para responder às solicitações dos seus clientes.

No sentido de proporcionar um elevado padrão de qualidade e segurança alimentar dos seus produtos aos seus clientes, a Irmãos monteiro SA. aplica na sua organização os princípios enunciados nas Normas de Gestão de Qualidade, podendo nomear-se a norma NP EN ISO 9002; norma ISO 9001, norma ISO 14001 e o HACCP do *Codex Alimentarius*.

Atualmente a empresa goza de três marcas próprias, Monteiro carnes (1993), Avó Micas (2003) e I'm Natura (2013). Possui 140 colaboradores e 1200 clientes ativos, para onde são distribuídas diariamente 20 t de produtos acabados. Tem orgulho de trabalhar

maioritariamente com matérias-primas de origem nacional, ou oriunda do Espaço Europeu, e disponibiliza 5% do total de receitas para a investigação e inovação, resultando anualmente a introdução no mercado de 5 novos produtos, 10 novas receitas e mais de 25 provas alimentares. Nunca esquecendo da importância da formação dos seus colaboradores, a Irmãos Monteiro SA. garante que estes recebam formação especializada com a duração de 300h (Irmãos Monteiro, 2015).

2. Revisão de prazos de validade de produtos cárneos

2.1. Estrutura do ensaio

O presente trabalho é constituído por duas partes. Uma em que os produtos estudados foram produtos cárneos, e outra onde os alimentos estudados foram produtos frescos, com abordagens metodológicas sensivelmente diferentes.

Este estudo teve como principal objetivo determinar a possibilidade de estender o prazo de validade de mortadela fatiada com azeitonas, salpicão fatiado, fígado de porco e peito de frango, tendo como ponto de partida o prazo de validade atual, definido pela empresa (Quadro 3).

Quadro 3 - Vida útil atual dos produtos estudados e período de prolongamento da vida útil estudado.

Produto/embalagem	**Vida útil atual em dias (definida empresa)**	**Período estudado em dias (presente trabalho)**
Produtos cárneos transformados		
Mortadela fatiada embalada em vácuo	30	90
Salpicão fatiado embalado em vácuo	60	126
Frescos		
Fígado de porco embalado vácuo	3	7
Fígado de porco embalado em MAP	3	7
Peito de frago embalado vácuo	10	20
Peito de frago embalado em MAP	5	11

- **Produtos Cárneos**

O salpicão e a mortadela com azeitonas usados no presente trabalho foram provenientes da empresa Irmãos Monteiro SA.. As amostras foram recolhidas na semana da sua produção, embaladas sob vácuo em embalagens de 10 fatias cada. Os ingredientes e a composição nutricional da mortadela com azeitonas e do salpicão estão apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 - Ingredientes e informação nutricional de mortadela com azeitonas e salpicão utilizados no presente trabalho.

Mortadela com azeitonas

Ingredientes	Informação nutricional (100gr)
Carne e gordura de suíno; agua, azeitonas (15%), fécula de batata, concentrado proteína de soja, sal, condimento mortadela (dextrose, pimentas, coentros, gengibre e extrato de expeciarias), fibra vegetal, dextrose, estabilizante E451i, conservante E250, antioxidante E331iii, alho em pó e corante (dextrose e corante E120)	Energia: 1119Kj/270Kcal; Lípidos: 23g, dos quais saturados: 11,08g; Hidratos de carbono: 6g, dos quais açucares: 1,4g; Proteinas: 9,51g; Sal: 2,72g.

Salpicão

Ingredientes	Informação nutricional (100gr)
Carne de suíno, água, vinho (contem sulfitos), sal, dextrose, concentrado proteína de seja, antioxidante E331iii, leite em pó, conservanteE250, alho (contém sulfitos), emulsionante E451i, cultivos ácidos laticos, dextrina, extrato especiarias, hemoglobina e fumo de lenha.	Energia: 579Kj/137Kcal; Lípidos: 2,6g, dos quais saturados: 0,96g; Hidratos de carbono: 2g, dos quais açucares: 0,5g; Proteinas: 28,4g; Sal: 3,3g.

Ambos os produtos cárneos foram divididos em grupos, de acordo com os diferentes tempos de análise e armazenados a 6 ± 1ºC. Com o objetivo de definir um prazo de validade, foram realizados dois tipos de testes em cada produto cárneo estudado. Um teste de envelhecimento onde ambos os produtos foram estudados em sete tempos distintos e um teste de desafio para estudar o comportamento de *Listeria monocytogenes* ao longo do armazenamento (Figura 3). No teste de envelhecimento, as amostras foram alvo de análise sensorial, através de um teste de consumidores, complementada com contagens da microflora potencialmente deteriorativa e alguns parâmetros físico-químicos, no sentido de avaliar a perda de qualidade associada à deterioração. No teste de desafio microbiológico com *Listeria monocytogenes*, foi também incluído o estudo da potencial vantagem de pulverizar a embalagem com um extrato de fumo recentemente lançado no mercado com alegado potencial antimicrobiano (Cloud S5, pH 5, formaldeído < 0,1%, flavor e cor neutros). Dos vários produtos lançados pelo fabricante a que tivemos acesso, selecionou-se o Cloud S5 por ser aquele que, de acordo com as indicações do fabricante teria um menor impacto

nas características sensoriais do produto. Evitaram-se também os extratos com valores de pH muito reduzidos, pois poderia comprometer a capacidade de retenção de água dos produtos.

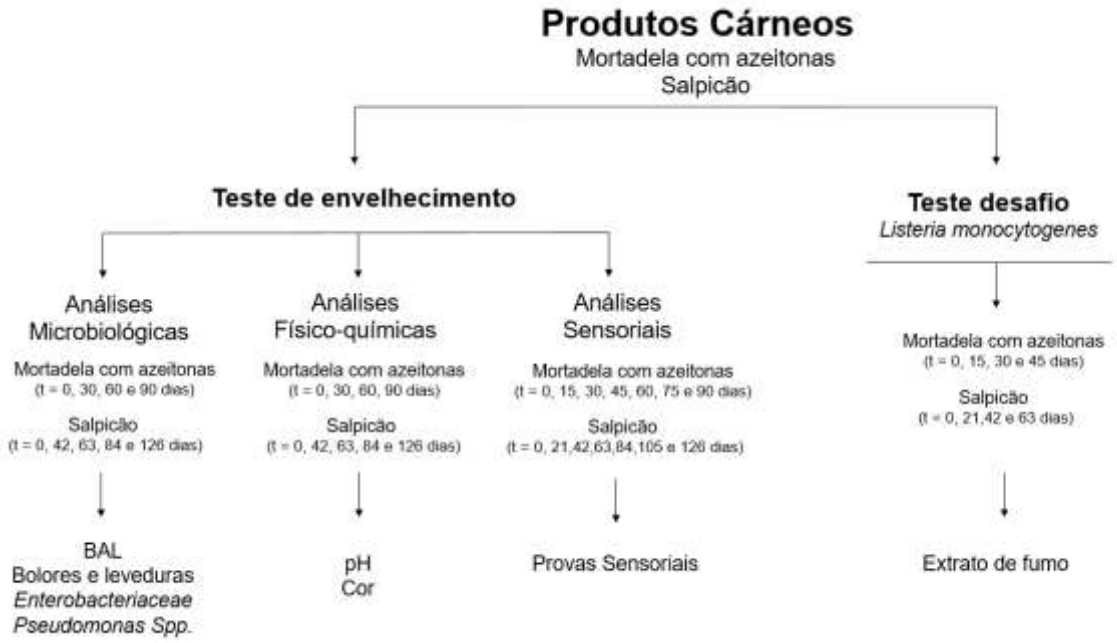

Figura 3 - Esquema de trabalho para os produtos carneos.

- **Produtos Frescos**

Os frescos utilizados no presente estudo provieram também da empresa Irmãos Monteiro SA. Todas as amostras foram recolhidas no dia posterior ao seu embalamento e armazenados a uma temperatura de 2 ± 1ºC até ao momento da sua análise. Cada amostra foi fotografada embalada e desembalada e analisada em três tempos diferentes – o fim da validade estabelecido pela empresa e mais dois tempos, estabelecidos em função da duração da vida útil de cada produto/embalagem. A embalagem MAP era composta por 70% de oxigénio, 20% de dióxido de carbono e 10% de azoto.

O fígado de porco embalado em vácuo e embalado em MAP foi fotografado e analisado no dia em que venceram a validade proposta pela empresa, após dois dias e após quatro

dias.O peito de frango embalado em vácuo foi fotografado e analisado no dia em que venceu a validade proposta pela empresa, após cinco dias e após 10 dias. O peito de frango embalado em MAP foi fotografado e analisado no dia em que venceu a validade atual, estabelecida pela empresa, após três dias e após seis dias. Foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais com consumidores (Figura 4).

Figura 4 - Esquema de trabalho para produtos frescos.

2.2. Testes de Envelhecimento da Mortadela com azeitonas e Salpicão

A mortadela com azeitonas foi armazenada (6±1ºC) num total de 90 dias, correspondentes a sete tempos de armazenamento, sendo analisada a nível sensorial a cada 15 dias. No momento de vencimento de cada tempo de análise, as amostras para a análise sensorial foram retiradas da câmara frigorífica e congeladas a -18ºC até à data da avaliação sensorial, de modo a permitir uma abordagem de *reverse storage,* que permite que amostras com tempos de armazenamento diferentes possam ser analisadas em simultâneo, tal como apontado por (Corradini e Peleg, 2007). As análises microbiológicas e físico-químicas, realizaram-se somente nos dias 0, 30, 60 e 90.

O salpicão foi armazenado (6±1ºC) durante um total de 126 dias, correspondentes a 7 tempos de armazenamento, sendo analisado a nível sensorial a cada 21 dias. Assim como as amostras de mortadela, no momento de vencimento de cada tempo de análise, as amostras para a análise sensorial foram retiradas da câmara frigorífica onde estavam armazenadas e congeladas a -18ºC. As análises microbiológicas e físico-químicas, realizaram-se aos dias 0, 42, 63, 84 e 126.

2.3. Preparação do Teste Desafio Microbiologico

Para a inoculação das fatias de mortadela ou de salpicão, utilizou-se uma suspensão de *L. monocytogenes*, preparada basicamente como descrito por Pereira, *et al.,* (2015c). Utilizaram-se 4 estirpes de *L. monocytogenes*, a estirpe ATCC 35152 e três isoladas de produtos cárneos ou do seu ambiente de produção por Martins (2010). As culturas, conservadas em congelação a -18ºC, foram descongeladas e cultivadas três vezes consecutivas em BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 30ºC. Da última cultura foi feita uma nova cultura em BHI, incubada durante cerca de 24h a 30ºC e procedeu-se à centrifugação das culturas a 3200 rpm durante 10 minutos, descartando o sobrenadante. O sedimento foi lavado com NaCl 0.85% e foi repetido o procedimento de centrifugação e lavagem.

O sedimento das quatro estirpes foi misturado e suspendido em NaCl 0,85% e a sua concentração foi estimada por comparação visual com escala MacFarland 2 (6×10^8 UFC/mL; Biomerieux 70900). Procedeu-se depois a diluições decimais sucessivas em NaCl 0,85% até obter uma concentração próxima da desejada para a inoculação, cerca de 4 a 5 log UFC/g.

As fatias de mortadela e de salpicão foram distribuídas em tabuleiros de poliestireno e contaminadas individualmente, em ambiente asséptico, com 0,1 mL de suspensão de *L. monocytogenes* previamente diluída de modo a ter aproximadamente cerca de 3 a 4 log UFC/g. Após inoculação, as amostras repousaram a uma temperatura de refrigeração durante 30 minutos de modo a permitir a absorção do líquido da suspensão de *L. monocytogenes*.

Terminado o período de repouso, metade das fatias foram embaladas em vácuo, em COMBITHERM (WIPAK Walsrode, HAFRI) de espessura 0,090 mm, com uma taxa de transmissão ao O_2 de 63 ml/(m^2.d.atm) a 23ºC e 0% HR e ao vapor de H_2O de 1g/(m^2.d) a 23ºC e 85% HR e armazenadas à temperatura de(6 ± 1ºC). Na restante metade, os sacos de vácuo utilizados foram previamente pulverizados com o extrato de fumo Cloud S5, de modo a testar o eventual efeito desse extrato no comportamento de *L. monocytogenes*.

2.4. Procedimento Analítico

2.4.1. Análise Sensorial

A avaliação sensorial da frescura de alimentos é muitas vezes avaliada através da utilização de um painel de provadores. A utilização de uma escala de frescura coloca o problema de decidir onde ficará o nível de corte, que é muitas vezes arbitrário (Hough e Garitta 2012). Muitas vezes os autores apontam o centro da escala, ou a mediana como limite de corte. No entanto, este nível de corte é arbitrário, pois não corresponde necessariamente ao nível de frescura que o consumidor em geral está disposto a aceitar para um produto dentro do seu período de validade, ou seja, não é evidente que um consumidor esteja disposto a pagar por um produto mais ou menos fresco, que será o que corresponde ao centro de uma escala, ou à mediana de uma distribuição. Por outro lado, usar um grupo restrito de provadores de análise sensorial analítica para prever o comportamento do consumidor é desaconselhado devido ao seu reduzido número e à falta de espontaneidade nas respostas (Pereira et al., 2019). Face ao exposto, no presente trabalho optou-se por fazer um teste de consumidores que colocou vários desafios. O prolongamento no tempo durante quatro meses dos testes de produtos transformados, que foi ultrapassado com a utilização de um armazenamento reverso (*reverse storage*) e a ocorrência dos tempos de análise muito aproximados, com os produtos frescos, que foi ultrapassado com o recurso á fotografia das amostras e congelação de porções para avaliação de cheiro posteriormente.

2.4.1.1. Produtos Cárneos

2.4.1.1.1. Grupos Focais

No sentido de identificar o vocabulário com potencial para descrever as caraterísticas de frescura/deterioração da mortadela com azeitonas e do salpicão, foram realizados três grupos focais. Adicionalmente pretendeu-se averiguar se a congelação das amostras poderia modificá-las, de tal forma que pudesse tornar desaconselhável a utilização da estratégia de armazenamento reverso para realizar o teste de envelhecimento.

Assim, com os grupos focais foram provadas amostras (de mortadela com azeitonas e de salpicão) frescas, no fim do período de validade, e propositadamente deterioradas, por armazenamento em temperatura abusiva (30ºC) durante 4 dias. Essas amostras foram ainda apresentadas com e sem congelação prévia.

Inicialmente foi feita uma apresentação sumária dos objetivos do GF e o moderador obteve autorização de todos os elementos para fazer registo áudio da discussão. Começou-se então a parte da discussão com registo áudio, começando pela apresentação dos participantes, incluindo género, idade e hábitos de consumo de produtos cárneos. Os três GF foram constituídos por consumidores regulares de produtos cárneos. O primeiro constituído por seis elementos (3 homens, 3 mulheres), com faixas etárias compreendidas entre os 22 e 55 anos; o segundo constituído por dez elementos (3 homens, 7 mulheres), com idades compreendidas entre os 18 e 22 anos; e o terceiro constituído por oito elementos (3 homens, 5 mulheres), com idades compreendidas entre os 18 e 22 anos. Todos os Grupos Focais foram dirigidos por um moderador com experiência em condução de GF em análise sensorial de alimentos, tendo como base um guião previamente estabelecido (Anexo I).

As discussões com cada um dos grupos foi realizada numa sala de cor branca, com iluminação natural e artificial, climatizada a cerca de 20ºC. Os participantes foram dispostos em redor de uma mesa de superfície branca, onde dispunham de tostas sem sal e água de nascente para limpeza de boca, sacos para cuspir amostras quando não estavam dispostos a deglutir, palitos e luvas de polietileno para pegar nas amostras. As amostras foram apresentadas de forma monódica e identificadas com um código aleatório de três dígitos. A ordem de apresentação das amostras foi diferente nos três GF, e foi estabelecida com a atribuição de um número aleatório e posteriormente ordenadas por ordem crescente.

Com cada amostra, pediu-se aos participantes para se concentrarem inicialmente na avaliação do aspeto e do cheiro. De seguida pediu-se aos participantes para mastigar as amostras (exceto as armazenadas em abuso de temperatura, cujo risco biológico não era conhecido), e descrever as características de sabor e de textura percecionadas. A discussão foi guiada no sentido de explorar as notas apontadas pelos participantes, assim como determinar quais as que foram mais apreciadas ou depreciadas. Durante a discussão, o animador convidou os elementos menos participativos a intervir, para evitar o efeito de liderança de alguns elementos, que por vezes enviesa os resultados obtidos.

No encerramento da sessão, o animador destacou as características mais referidas pelo grupo para o conjunto de amostras provadas. Cada sessão não ultrapassou os 30 minutos.

Todos os debates foram gravados com a aplicação de gravação do Microsoft Windows. As caraterísticas mencionadas pelos participantes ficaram assim registadas em suporte áudio, e os resultados transcritos após a audição.

2.4.1.1.2. Testes de consumidores

Com o objetivo de avaliar a aceitação da mortadela com azeitonas e do salpicão foi realizada uma prova sensorial, onde participaram 95 consumidores, para cada tempo de análise, para a mortadela com azeitonas e 81 para o salpicão. Os consumidores foram recrutados telefónica ou presencialmente de entre os colaboradores da instituição e contactos pessoais dos investigadores.

Para realizar esta prova foi fornecido ao provador uma amostra de cada produto em cada tempo de armazenamento. A distribuição das amostras fez-se de forma padronizada (anónima e ordem arbitrária, variável entre consumidores). As sete amostras (correspondendo aos tempos de armazenamento) foram apresentadas aos provadores identificadas com um código de três números aleatórios, cuja correspondência era conhecida exclusivamente pelo responsável da prova.

A prova de consumidores incluiu três abordagens: (1) uma pergunta para avaliar a frescura do produto, numa escala de cinco pontos, em que um correspondia a uma amostra pouco fresca e cinco a uma muito fresca; (2) uma pergunta relativa à intenção de consumo e de compra (repetição da compra) em função exclusivamente da frescura do produto; (3) uma pergunta de Check All That Apply (CATA), em que foi pedido aos consumidores para indicar, a partir de uma lista apresentada, as características que considerava estarem presentes em cada amostra. O vocabulário utilizado na prova CATA foi gerado nas sessões previamente realizadas com grupos focais.

A ficha de prova incluiu ainda informação pessoal sobre o consumidor: género, idade, profissão e hábitos de consumo de produtos cárneos. Fichas de prova em anexo (Anexos II e III).

As provas tiveram lugar num laboratório de análise sensorial, equipado com lugares de prova individualizados, com idênticas condições de iluminação e temperatura (±20ºC), onde cada provador tinha ao seu dispor água e pão para “limpeza de boca”.

2.4.1.2. Produtos frescos

2.4.3.2.1 Testes de consumidores online e presenciais

Uma vez que, na perspetiva da avaliação da carne fresca, o aspeto e o cheiro são as duas caraterísticas que determinam a decisão do consumidor, levando-o a considerar o produto e a compra-lo, ou não, ou a repetir a compra, mantendo-se fiel à marca. O aspeto, em particular, e para produtos embalados, é o único critério de que o consumidor dispõe para

avaliar a frescura em situação de compra. Tendo em consideração a importância do aspeto do peito de frango e do fígado embalados ora em vácuo, ora em MAP, e como se trata de produtos muito perecíveis, em qual há modificações muito rápidas, e em que a avaliação tem que ser realizada em intervalos muito curtos, com uma logística muito complexa para efetuar provas de consumidores, optou-se no presente trabalho por trabalhar com a imagem dos produtos registada em fotografia. Assim, e com o apoio de um fotógrafo profissional, as amostras foram fotografadas, embaladas - o que representa a situação de compra - e, já fora da embalagem - de modo a simular a experiência do consumidor no momento de abertura da embalagem. Esta metodologia utilizando fotografias de alimentos com vencimentos de tempo de avaliação muito curtos fora previamente experimentada por Manzocco et al., (2012) com salada de fruta, revelando-se muito útil e credível, quando comparada com a avaliação da frescura recorrendo a um painel de provadores. Imediatamente após serem fotografadas, as amostras foram cortadas em secções paralelepipédicas com cerca de 2 cm x 2 cm x 8 cm, incluindo sempre seções da superfície do peito de frango ou do fígado de porco. Essas porções foram introduzidas em tubos Falcon de 50 mL (previamente desodorizados por lavagem em água quente e secagem a 60ºC) e congeladas, para posterior avaliação do cheiro.

As fotografias dos produtos foram utilizadas em duas condições diferentes: (1) numa primeira abordagem, procedeu-se à realização de um inquérito online, com recurso à plataforma GoogleForms. Os consumidores foram convidados a participar através de convite por email ou através de redes socias, a partir de contactos pessoais e profissionais dos investigadores; (2) como o inquérito online ficou limitado ao aspeto, e considerando que o cheiro é uma variável muito importante na avaliação da frescura, realizou-se um teste presencial, em que os consumidores pontuaram a frescura das amostras pela avaliação conjunta do aspeto (em fotografia impressa em papel fotográfico, 10 x 15 cm) e pelo cheiro, das amostras previamente congeladas em tubos Falcon, descongeladas durante 24h a 2ºC.

Os inquéritos realizados na plataforma GoogleForms tiveram uma duração média a 8 minutos, para cada produto (peito de frango ou fígado de porco). No início do questionário foram colocadas algumas perguntas de identificação do consumidor: género, idade, nível de escolaridade e hábitos de consumo daquele produto. Seguidamente foram apresentadas duas fotografias de cada tempo de análise estipulados, quer para o peito de frango, quer para o fígado de porco embalados em vácuo e em MAP. Para cada conjunto de fotografias, foi pedido ao consumidor que indicasse o nível de frescura que atribuía à amostra, numa escala de cinco pontos, em que 1 correspondia a pouco fresco e 5 a muito fresco. Foi também avaliada a intenção de compra em forma de escolha múltipla (Sim/Não). A ordem de apresentação das

fotografias ocorreu de forma aleatória. O inquérito foi respondido por 172 consumidores para o peito de frango e 183 para o fígado de porco.

Na prova presencial com consumidores, os consumidores avaliaram a frescura do peito de frango pela avaliação conjunta do aspeto - na fotografia impressa - e do cheiro – nas amostras reservadas em congelação em tubos Falcon. As questões colocadas foram as mesmas que no inquérito online, organizadas numa ficha de prova em papel. Para ambos os produtos houve 51 consumidores a realizar a prova.

2.4.2. Análises Microbiológicas

2.4.2.1. Preparação das Diluições e Sementeiras

Para todas as amostras, foi realizada de modo a ser obtida uma diluição de 1:10 ou 1:5 numa solução de NaCl, 0,85% e homogeneizada usando o *stomacher* durante 90 segundos.

Quando necessário, foram efetuadas diluições decimais sucessivas em 9 mL da mesma solução. De seguida, foram realizadas as sementeiras por incorporação e à superfície nos respetivos meios de cultura, dependendo da análise microbiológica a efetuar.

2.4.2.2. Contagem de microrganismos

- **Bactérias do Ácido Lático**

De acordo com a Norma Francesa V 04-503 (1988) foi efetuada sementeira por incorporação de 1 mL da suspensão-mãe e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo MRS (Man Rogosa Sharpe) Agar com dupla camada.

As placas semeadas foram incubadas a 30ºC de 48 a 72h. Após este período efetuou-se a contagem de colónias expressando os resultados em log UFC/g.

- **Bolores e leveduras**

De acordo com a Norma ISO 13681 de 1995 foi realizada sementeira à superfície de 0,1mL da suspensão-mãe e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo Rose Bengal Chloramphenicol Agar. As placas semeadas foram incubadas a 30ºC, durante 3 dias. Após contagem das colónias, os resultados foram expressos em log UFC/g.

- ***Enterobacteriaceae***

De acordo com a Norma ISO 21528-1:2004, foi efetuada sementeira por incorporação de 1mL da suspensão-mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura seletivo VRBG Agar (Violet Red Bile Glucose) com dupla camada.

As placas semeadas foram incubadas a 37ºC durante 24 a 48 horas. Foi efetuada a contagem de colónias típicas de coloração rosa ou vermelha (com ou sem halos de precipitação). Os resultados foram expressos em log UFC/g.

- **Microrganismos Mesófilos Totais**

De acordo com a Norma ISO 4833 de 1991, foi efetuada uma sementeira por incorporação de 1mL da suspensão-mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura PCA (Plate Count Agar). As placas semeadas foram incubadas a 30ºC, durante 48 horas. Após contagem das colónias, os resultados foram expressos em log UFC/g.

- **Microrganismos Psicotróficos Totais**

De acordo com a Norma Portuguesa 2307 de 1987, foi efetuada sementeira incorporação de 1mL da suspensão-mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura PCA (Plate Count Agar). As placas semeadas foram incubadas a 7˚C, durante 10 dias. Após contagem das colónias, os resultados foram expressos em log UFC/g.

- ***Pseudomonas* spp.**

De acordo com a Norma Francesa V 04-504 de 1998, a sementeira foi feita por incorporação com 1 mL da suspensão-mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura seletivo CFC Agar (Cetrimide Fucidin Cephaloridine). As placas semeadas foram incubadas a 25 ºC, durante 24 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

- ***L. monocytogenes* (teste de desafio microbiologico)**

Foi monitorizado o comportamento do microrganismo em ambos os produtos até a multiplicação atingir uma unidade logarítmica. A pesquisa de *L. monocytogenes* ocorreu de 15 em 15 dias na mortadela com azeitonas e de 21 em 21 dias no salpicão. Em cada vencimento do tempo de análise, cada porção foi retirada da respetiva embalagem em ambiente asséptico e pesada. A contagem foi realizada de acordo com a Norma ISO 11290 de 2014 inoculou-se 0,1 mL em placas com Oxford Agar e incubou-se as placas a 30ºC durante 48h. Após incubação, efetuou-se a contagem de colónias típicas, expressando os resultados em log UFC/g.

2.4.3. Análises físico-químicas

2.4.3.1. pH

Nas amostras de salpicão, mortadela com azeitonas, peito de frango e fígado de porco procedeu-se à análise em triplicado do pH. A determinação do pH foi efetuada com um medidor de pH Crison modelo micropH 2002, com um elétrodo de perfuração à temperatura ambiente. Para a mortadela com azeitonas e para o salpicão a medição realizou-se numa pasta homogénea das diferentes amostras. Para o fígado de porco e para o peito de frango, o pH foi determinado através da suspensão inicial de 10 g de amostra em 90 mL de soro fisiologico.

2.4.3.2. Parâmetros L*a*b*

Para a análise da cor nos alimentos é normalmente utilizada colorimetria (ciência que estuda os fenómenos de perceção das cores) utilizando um colorímetro que expressa a cor através de três variáveis: a tonalidade, brilho e saturação. A tonalidade é o intervalo de

longitude da onda em que se traduz a cor; o brilho é a luminosidade e a saturação o seu grau de pureza (Carrilha e Guiné, 2010).

A avaliação da cor advém do sistema L*a*b* (também conhecido como CIELab) que inclui três coordenadas: L* onde a variação da cor é medida entre o preto (0) e o branco (100); e a* e b*, coordenadas da cromaticidade que vão respetivamente do verde ao vermelho e do azul ao amarelo com valores compreendidos entre os -120 e +120 (Carrilha e Guiné, 2010).

A cor foi avaliada nos tempos e análise estipulados para os parâmetros físico-químicos tanto na mortadela com azeitonas como no salpicão. Para cada medição, a amostra foi retirada da embalagem e disposta numa superfície clara. Imediatamente logo após a abertura da embalagem, a cor foi medida diretamente na amostra, após a calibração do colorímetro. Foram registadas três leituras por amostra. O colorímetro utilizado foi o Minolta CR310 com iluminante C que registou os valores das coordenadas L*, a*, b*.

2.4.3.3. Atividade da água

A atividade da água (aw) foi determinada para a mortadela com azeitonas e para o salpicão, com o intuito de verificar se estes alimentos suportam o crescimento de *L. monocytogenes* para a realização do teste de desafio microbiológico.

A determinação da aw foi efetuada em aproximadamente 10g de amostra, num medidor de aw Rotronic Hygroskop-DT. As leituras foram medidas a aproximadamente 20 ºC.

2.5. Tratamento de dados

A comparação dos valores médios de variáveis contínuas (avaliação sensorial de frescura, contagem de microrganismos, parâmetros de cor L*a*b*) foi feita por análise de variância simples, para o fator tempo, ou fatorial com interação, quando houve cruzamento de efeitos, como no caso do tipo de embalagem nos produtos frescos. Nas variáveis em que foram detetadas diferenças significativas localizou-se a diferença entre médias com o teste de Tukey-Kramer. Nas contagens de microrganismos, quando o valor era inferior ao limite de deteção (1 log UFC/g para as sementeiras por incorporação 2 log UFC/g para as em

superfície) utilizou-se zero, para efeitos de calculo estatístico, ainda que o seu valor efetivo fosse < 1 ou <2 log UFC/g, respetivamente.

As variáveis discretas (intenção de consumo, intenção de compra) foram comparadas através do teste do Chi-quadrado. Os resultados do teste *Check All that Apply* (CATA) foram analisados por análise de coordenas principais. A frequência a indicação de caraterísticas entre os diferentes tempos de análise foi comparada pelo teste Q de Cochran. Todos os procedimentos foram realizados no programa XLSTAT 2018 (Addinsoft, 2019).

IV – Resultados e discussão

1. Revisão do prazo de validade de produtos cárneos

1.1. Estudo prévio das caraterísticas através de Grupos Focais

A escolha de determinado alimento no ato de compra por parte do consumidor é um processo influenciado tanto por caraterísticas sensoriais como por caraterísticas não sensoriais (Esmerino *et al*., 2017). Dentro das caraterísticas sensoriais estão enquadradas as propriedades físicas do alimento como a textura, a cor, o paladar e o odor (Fernqvist *et al.,* 2000). Assim sendo, dentro das não sensoriais estão enquadradas o estado fisiológico e emocional do consumidor, fatores pessoais como crenças, a personalidade e fatores económico-sociais (Fernqvist *et al.*, 2000).

O emprego da metodologia usando grupos focais (GF) surgiu no final dos anos 40 (Stewart e Shamdasani, 1998), e até hoje é uma das técnicas qualitativas mais utilizadas para tentar perceber melhor as escolhas dos consumidores (Gallo *et al*., 2017), geralmente como etapa preliminar.

Entende-se por GF as entrevistas grupais, normalmente com um máximo de 8 participantes e um moderador (Hamlin, 2016), cujo principal objetivo é reunir informações sobre um determinado assunto, conhecido pelo total dos participantes. Apresenta como principais vantagens o facto de ser uma metodologia acessível e de fácil execução, capaz de produzir uma quantidade massiva de dados sobre um tema definido, que através de outras metodologias não seriam tão facilmente adquiridos (Stewart e Shamdasani, 1998). Os resultados obtidos pelos GF são profundos, robustos e confiáveis. Não obstante, e como todas as metodologias, também esta apresenta desvantagens. Dado ser uma conversa entre vários intervenientes, alguns deles podem inibir-se perante a maioria se a sua opinião for distinta da dos restantes, sendo importante o moderador ter experiência na condução de GF para tentar minimizar esse viés (Esmerino *et al*., 2017).

No presente trabalho utilizou-se a metodologia de grupos focais para identificar o vocabulário com potencial para descrever as características de frescura/deterioração da mortadela com azeitonas e do salpicão. Foram realizados três grupos focais. Adicionalmente pretendeu-se averiguar se a congelação das amostras poderia modificá-las, de tal forma que pudesse tornar desaconselhável a utilização da estratégia de armazenamento reverso para realizar o teste de envelhecimento. Os resultados obtidos com a mortadela com azeitonas estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 - Caraterísticas sensoriais extraídas do discurso de três grupos focais que analisaram mortadela com azeitonas com diferentes tempos de armazenamento.

Mortadela com azeitonas	Embalada (não congelada e descongelada)	Sem embalagem (não congelada e descongelada)
Início da validade	Aspeto mais fresco; cor rosa	Cheiro intenso a especiarias; sabor a fécula; cheiro a noz-moscada e cravo da India; ausência de cheiro anormal
Fim da validade	Seca; aspeto desidratado; aspeto mais velho; cor amarelada	Cheiro menos intenso a especiarias
Abuso de temperatura	Húmida e brilhante; aspeto não uniforme; com manchas claras; presença de *slime*; tonalidade mais branca; com algum bolor	Cheiro a azedo e fermentado; cheiro e sabor ácidos; nota-se muito a acidez da azeitona; cheiro intenso a azeitona; cheiro acídico-fermentado; "parece que o ácido da azeitona foi para o resto da fatia"

O fim da validade corresponde ao final da validade definido pela empresa.

A mortadela com azeitonas dentro do prazo de validade estipulado pela empresa é caraterizada pela sua cor rosada e pela ausência de um cheiro anormal. É verificado também o sabor a fécula, ausente nas restantes duas amostras assim como um cheiro a noz-moscada e cravo da India. Sobre a mortadela no fim do período de validade, o seu aspeto já foi detetado como sendo mais seco, desidratado e com uma coloração amarelada. Foi notado também um cheiro menos intenso a especiarias. A mortadela sujeita ao abuso de temperatura apresentou-se com algumas notas de deterioração. Foi descrita como tendo um cheiro acídico, azedo e fermentado. O cheiro a azeitona intensificou-se e a sua apresentação exibiu-se brilhante e húmida, com manchas claras, viscosidade superficial (*slime*) e algum bolor. Não houve quaisquer indícios de que a congelação influenciasse as caraterísticas sensoriais, permitindo assim realizar, no teste de envelhecimento, os testes de consumidores recorrendo à metodologia de armazenamento reverso.

As caraterísticas identificadas no salpicão são apresentadas no Quadro 6.

Quadro 6 - Caraterísticas sensoriais extraídas do discurso de três grupos focais que analisaram salpicão com diferentes tempos de armazenamento.

Salpicão	Embalada (não congelada e descongelada)	Sem embalagem (não congelada e descongelada)
Início da validade	Seco; com mais gordura; aspeto uniforme	Cheiro intenso a curado, picante; ligeiramente condimentado; cheiro e sabor a vinho; sabor a colorau; sabor a alho; cheiro menos intenso a condimentos; "cheia a Salpicão não industrializado"
Fim da validade	Húmido e exsudativo; brilhante; tonalidades mais escuras	Cheiro mais caraterístico; salgado; ligeiramente picante; não tem um cheiro anormal; "depois que fica o sabor na boca, o palato parece não muito fresco"
Abuso de temperatura	Tonalidades muito escuras junto à superfície; humidade na superfície; presença de slime	Cheiro menos intenso a vinho, alho e fumo; ligeiro cheiro a ranço; sabor acídico; sabor adocicado; sabor amargo; sabor muito forte

O fim da validade corresponde ao final da validade definido pela empresa.

A amostra de salpicão no início do prazo de validade estipulado pela empresa foi facilmente identificado comparativamente aos restantes tempos estudados (fim da validade e abuso de temperatura), uma vez que foi detetado um intenso cheiro a curado. O seu aspeto também se destaca por ser o mais seco e mais uniforme. É de notar que esta amostra foi congelada, e 24h antes da prova, descongelada para verificar se a congelação e posterior descongelação influenciava o aspeto ou outras qualidades sensoriais. Tal não se verificou, permitindo assim a realização do teste de envelhecimento com armazenamento reverso. O salpicão no final do período de validade é apontado como sendo mais húmido e ter algumas manchas mais escuras. Sobre as notas aromáticas foi verificado um cheiro mais caraterístico e sobre o sabor foi apurado um travo ligeiramente picante e salgado. No salpicão sujeito a um abuso de temperatura foi classificado como tendo alguns aspetos caraterísticos da deterioração de produtos cárneos, como o cheiro a acídico, ranço e a fermentado. No sabor destacam-se o sabor a ácido, amargo e adocicado. Este salpicão armazenado em abuso de temperatura exibe manchas muito escuras na sua superfície, assim como humidade e alguma viscosidade superficial (*slime*).

Com base nos resultados dos grupos focais foi possível construir a lista de atributos a utilizar no teste CATA. Essa lista de atributos foi complementada com alguns que, ainda que

não tendo sido referidos durante os grupos focais, pela teoria subjacente aos fenómenos de deterioração destes produtos, poderiam ocorrer.

1.2. Revisão do prazo de validade de Mortadela com azeitonas

1.2.1. Evolução da aceitação pelo consumidor e caraterísticas sensoriais ao longo do armazenamento

No sentido de avaliar a possibilidade de aumentar o prazo e validade da mortadela com azeitonas produzida em contexto industrial foi realizado um teste de envelhecimento onde se testou as consequências de triplicar o período de validade atual do produto (30 dias). A análise sensorial foi realizada com amostras envelhecidas até 90 dias, em períodos múltiplos de duas semanas. Para agilizar a execução do teste de consumidores utilizou-se um armazenamento reverso. As amostras foram sendo congeladas à medida que vencia o seu tempo de estudo, e foram descongeladas no final, para que a prova pudesse ser realizada com todas as amostras simultaneamente.

Fez-se uma prova com um grupo de 95 consumidores, a quem foi pedido que provassem uma amostra de mortadela com azeitonas correspondente a cada tempo de análise e pontuassem a sua frescura numa escala de cinco pontos (1 – pouco fresco; 5 - muito fresco). Foi também inquirida a intenção de consumo assim como a intenção de compra do produto, atendendo à sua frescura. Adicionalmente, pediu-se aos consumidores que escolhessem de numa lista de atributos (gerada através dos grupos focais), aqueles que consideravam aplicarem-se a cada uma das amostras – teste CATA.

Na Figura 5 estão representados os resultados da intenção de consumo, assim como da intenção de compra de mortadela com azeitonas ao longo dos 90 dias. Observamos que a intenção de compra segue uma tendência muito semelhante à intenção de consumo, sendo ligeiramente inferior. Tal acontece porque existem alguns consumidores que estão dispostos a consumir o produto na perspetiva da sua frescura, mas por se tratar de um produto que não apreciam particularmente, frequentemente indicam não estar dispostos a comprá-lo. Para ambos os parâmetros existe uma ligeira quebra ao longo de todo o ensaio, ou seja, vai havendo cada vez menos consumidores dispostos a consumir o produto e a comprá-lo. Verificamos também que no último tempo de ensaio, aos 90 dias, a percentagem de

consumidores que consumiriam o produto já é muito próxima dos 50%, e a proporção de consumidores que comprariam o produto é inferior a este limite.

Atendendo à avaliação da evolução global da frescura deste mesmo produto, onde era pedido aos consumidores para situarem a frescura de cada amostra numa estala até cinco pontos, o que verificamos é que ao longo do armazenamento, esta manteve-se sempre acima do centro da escala, onde a frescura é intermédia (Figura 6). No entanto houve uma diminuição estatisticamente significativa da avaliação global da frescura na mortadela com azeitonas ao longo dos 90 dias de armazenamento. Esse decréscimo da avaliação global de frescura, apesar de significativa, foi muito lenta e só aos 45 dias é que houve uma redução significativa em meia unidade na escala de 5 pontos, o que demonstra que a deterioração foi insipiente.

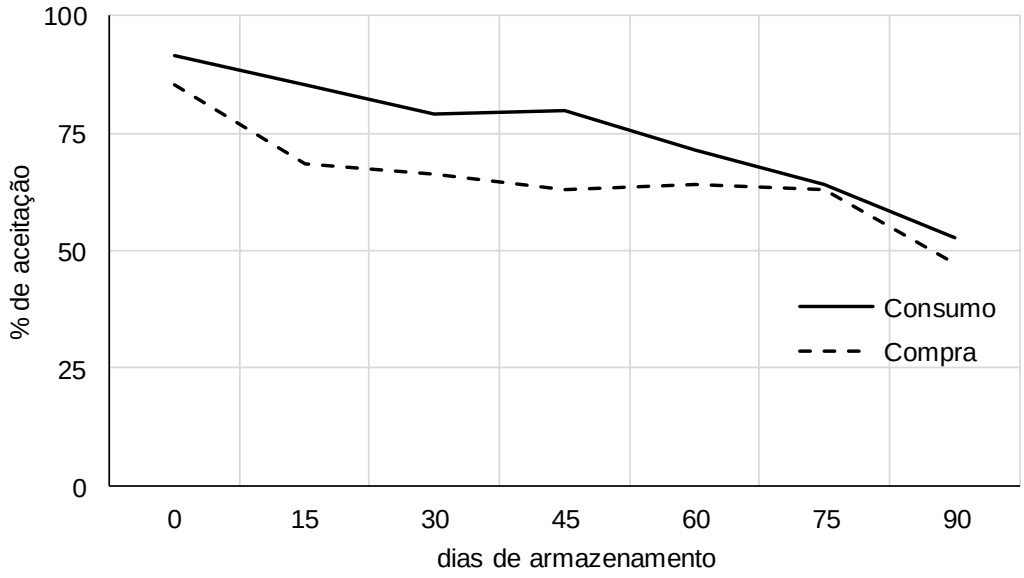

Figura 5 - Evolução da aceitação (consumo ou compra) de mortadela com azeitonas armazenado a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 90 dias por 95 consumidores.

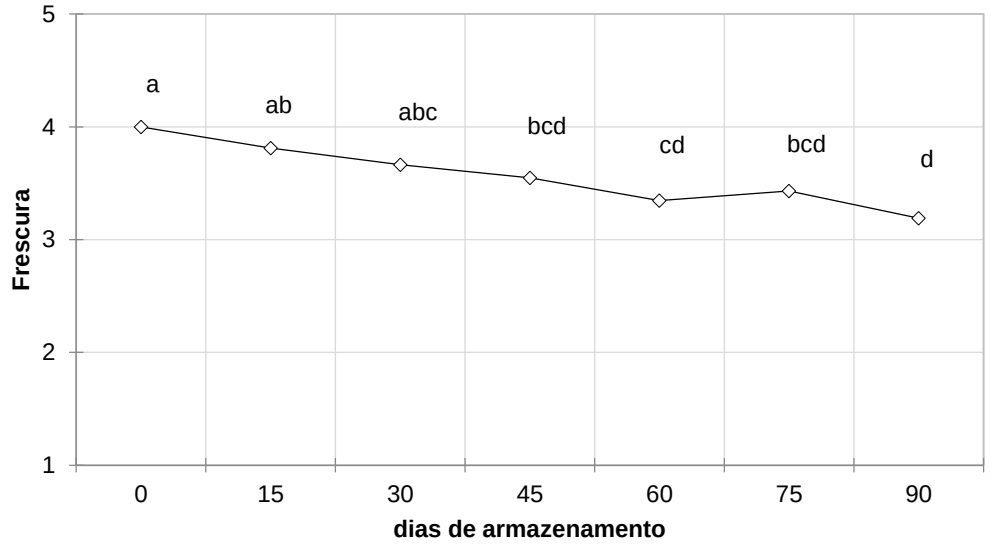

Figura 6 - Evolução da avaliação global da frescura de mortadela com azeitonas armazenada a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 90 dias por 95 consumidores; (a), (b), (c), (d) – médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p≤0,05).

Foi pedido ao mesmo grupo de consumidores que indicasse as caraterísticas que consideravam aplicar-se a cada uma das amostras (teste CATA). Nesta ficha de prova, estavam listadas as caraterísticas que a mortadela com azeitonas poderia apresentar, identificadas a partir da informação obtida a partir dos grupos focais. No Quadro 7, apresentam-se os resultados da frequência de escolha das diferentes caraterísticas, comparadas através do teste Q de Cochran.

Quadro 7 - Resultado do teste tipo CATA em mortadela com azeitonas - Frequência da indicação de caraterísticas entre os diferentes tempos de análise comparada pelo teste Q de Cochran.

Attributes	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias	90 dias	p
Aspeto								
Húmido	0,63 (a)	0,558 (a)	0,653 (a)	0,579 (a)	0,558 (a)	0,600 (a)	0,62 (a)	0,763
Slime	0,15 (a)	0,26 (a)	0,22 (a)	0,24 (a)	0,22 (a)	0,28 (a)	0,22 (a)	0,404
Seco	0,25 (a)	0,27 (a)	0,20 (a)	0,26 (a)	0,31 (a)	0,20 (a)	0,21 (a)	0,456
Brilhante	0,32 (a)	0,26 (a)	0,34 (a)	0,30 (a)	0,32 (a)	0,38 (a)	0,43 (a)	0,187
Rosa	0,77 (a)	0,80 (a)	0,85 (a)	0,81 (a)	0,83 (a)	0,81 (a)	0,77 (a)	0,716
Amarelado	0,04 (a)	0,03 (a)	0,02 (a)	0,04 (a)	0,02 (a)	0,06 (a)	0,02 (a)	0,622
Pálido	0,14 (a)	0,17 (ab)	0,22 (ab)	0,22 (ab)	0,18 (ab)	0,34 (b)	0,19 (ab)	0,021
Baço	0,23 (a)	0,31 (a)	0,17 (a)	0,27 (a)	0,24 (a)	0,22 (a)	0,26 (a)	0,421
Acastanhada	0,10 (a)	0,04 (a)	0,04 (a)	0,04 (a)	0,05 (a)	0,02 (a)	0,02 (a)	0,213
Manchas + claras	0,03 (a)	0,07 (a)	0,03 (a)	0,08 (a)	0,05 (a)	0,08 (a)	0,06 (a)	0,477
M. esverdeadas	0,02 (a)	0,04 (a)	0,02 (a)	0,03 (a)	0,07 (a)	0,011 (a)	0,01 (a)	0,093
Cheiro								
Noz-moscada	0,16 (a)	0,22 (a)	0,18 (a)	0,18 (a)	0,23 (a)	0,10 (a)	0,17 (a)	0,223
Pimenta	0,47 (a)	0,47 (a)	0,46 (a)	0,52 (a)	0,46 (a)	0,39 (a)	0,51 (a)	0,682
Azeitona	0,75 (a)	0,68 (a)	0,68 (a)	0,64 (a)	0,68 (a)	0,67 (a)	0,64 (a)	0,745
Especiarias	0,43 (a)	0,40 (a)	0,35 (a)	0,36 (a)	0,31 (a)	0,32 (a)	0,32 (a)	0,428
Acídico/fermentado	0,07 (a)	0,14 (a)	0,19 (a)	0,24 (a)	0,20 (a)	0,21 (a)	0,19 (a)	0,041
Manteiga	0,05 (a)	0,05 (a)	0,021 (a)	0,011 (a)	0,021 (a)	0 (a)	0 (a)	0,041
Adocicado	0,20 (b)	0,12 (ab)	0,07 (ab)	0,12 (ab)	0,03 (a)	0,06 (ab)	0,10 (ab)	0,005
Fermentado	0,05 (a)	0,06 (a)	0,14 (a)	0,13 (a)	0,10 (a)	0,08 (a)	0,17 (a)	0,081
Amoniacal	0,02 (a)	0,02 (a)	0,04 (a)	0,05 (a)	0,03 (a)	0,05 (a)	0,03 (a)	0,814
Ranço	0,03 (a)	0,03 (a)	0,02 (a)	0,01 (a)	0,02 (a)	0,01 (a)	0,04 (a)	0,748
Sabor/Flavor								
Azedo/Avin.	0,14 (a)	0,23 (ab)	0,27 (ab)	0,28 (ab)	0,36 (b)	0,30 (ab)	0,27 (ab)	0,027
Bolores	0,01 (a)	0 (a)	0 (a)	0 (a)	0,02 (a)	0,01 (a)	0 (a)	0,370
Salgado	0,58 (a)	0,55 (a)	0,50 (a)	0,58 (a)	0,57 (a)	0,41 (a)	0,54 (a)	0,147
Fécula	0,06 (a)	0,07 (a)	0,06 (a)	0,03 (a)	0,03 (a)	0 (a)	0,01 (a)	0,058
Amargo	0,04 (a)	0,07 (a)	0,20 (ab)	0,15 (ab)	0,12 (ab)	0,26 (b)	0,26 (b)	0,000

Avin. Avinagrado; (a), (b) – valores seguidos de letras diferentes apresentam diferenças significativas entre tempos (p<0,05).

Como se pode observar no Quadro 7, foram poucas as caraterísticas da mortadela com azeitonas que tiveram uma frequência de utilização diferente ao longo do tempo. Somente em seis das 26 caraterísticas testadas foram detetadas diferenças significativas, e dentro dessas as diferenças resultantes da comparação entre os diferentes tempos é pontual. Ao nível do aspeto, o "pálido" só foi distinguido entre as amostras recém produzidas e aquelas com 75 dias de armazenamento. Todos os outros tempos se mostraram iguais aos demais. O cheiro acídico/fermentado e a manteiga, embora o teste Q de Cochran tenha resultado num valor de p significativo (p=0,041), entre os diferentes tempos de análise não existem

diferenças significativas. É de notar que a nota a manteiga é tida como residual, e nos últimos dois tempos de análise não foi apontada por nenhum consumidor. É provável que esta ausência da perceção do odor a manteiga seja devida à presença de outras notas aromáticas, que possam ter levado a que os poucos consumidores que a mencionaram não a notassem nestes tempos mais avançados. O cheiro adocicado apresenta uma ligeira tendência descendente ao longo do armazenamento, ainda que a única diferença específica detetada tenha sido entre o dia zero e os 60 de armazenamento. Tal como observado com o aspeto pálido, todas as outras amostras se amostraram semelhantes (p>0,05) entre si. No que se refere às notas de sabor, só se observaram diferenças nos atributos azedo/avinagrado e amargo. Ambos foram apontados por mais consumidores à medida que aumentou o tempo de armazenamento, determinando diferenças significativas, para o azedo avinagrado entre o tempo zero e os 60 dias, e para o amargo entre os dois tempos extremos (0 e 15 contra 75 e 90 dias).

Estes resultados da comparação individual dos atributos das amostras com diferentes tempos de armazenamento vão de encontro ao que se observou na evolução da avaliação global da frescura, em que não há um ponto de inflexão claro, quer na avaliação de frescura e intenção de consumo, nem na identificação de atributos associados à deterioração.

Na análise de coordenadas principais foram analisados juntamente as caraterísticas resultantes do teste CATA com os tempos de análise. Os dois primeiros fatores contribuem com um total de cerca 73% da informação original dos dados, que é um bom indicador da qualidade da solução. Como se pode observar na Figura 7, a maior parte da informação situa-se próxima do eixo horizontal, que representa o Fator 1, que representa 54,5% da informação original. Na figura, os quadrados negros representam as caraterísticas incluídas no teste CATA. As caraterísticas associadas a uma mortadela com azeitonas fresca estão junto à origem dos eixos, do lado direito, tais como o aspeto húmido, o cheiro a pimenta, a especiarias, a azeitona e a noz-moscada, o sabor salgado e o adocicado. Já do lado esquerdo encontram-se caraterísticas potencialmente associadas à deterioração, como o sabor a amargo, cheiro a fermentado, acídico/fermentado, ácido/avinagrado e amoniacal. Curiosamente do lado direito encontram-se duas caraterísticas que poderiam ser apontadas como caraterísticas de um produto deteriorado, sendo elas a presença de manchas esverdeadas e o cheiro a ranço. A sua presença no lado direito do gráfico não indica que estão associadas ao produto fresco, uma vez que foram apontadas de forma muito residual, e tal como se observou no teste CATA não têm qualquer significado estatístico. Notamos também que a perceção da nota a manteiga, apesar de estatisticamente significativo, tal como verificamos no teste CATA, foi apontada por muitos poucos consumidores, sendo que aos 65

dias e aos 90 dias não foi mencionada, provavelmente por ter sido encoberta por outras notas aromáticas.

Analisando a projeção dos tempos de análise no gráfico, verificamos que o tempo zero dias é o que se encontra mais à direita de todos, o que reflete que os consumidores o apontaram como sendo o tempo onde a mortadela com azeitonas apresentava um maior nível de frescura. Seguem-se os 15 dias na mesma ordem de ideias. Os tempos intermédios de análise estão muito próximos uns dos outros, situando-se do lado esquerdo do gráfico, a partir dos 30 dias. Curiosamente o tempo mais afastado não é o último (90 dias) mas sim o penúltimo (75 dias). Esta observação vai de encontro com o teste CATA pois muitas das caraterísticas como o aspeto pálido, o cheiro acídico fermentado e o sabor azedo/avinagrado são superiores, em termos absolutos, aos 75 dias do que aos 90 dias, apesar de estatisticamente não serem diferentes (p>0,05), o que pode ter resultado nessa inversão de ordem. Considerando que se trata de um produto muito pouco deteriorado, globalmente não se nota um grande efeito do envelhecimento, uma vez que todos os tempos se encontram muito próximos da origem do Fator 1. O tempo correspondente aos 60 dias está projetado sobre a origem do Fator 1, sugerindo que se trata de uma mortadela que nem é caraterizada pelos indicadores de frescura que estão ao lado direito da figura, nem pelos de deterioração que se encontram projetados do lado esquerdo.

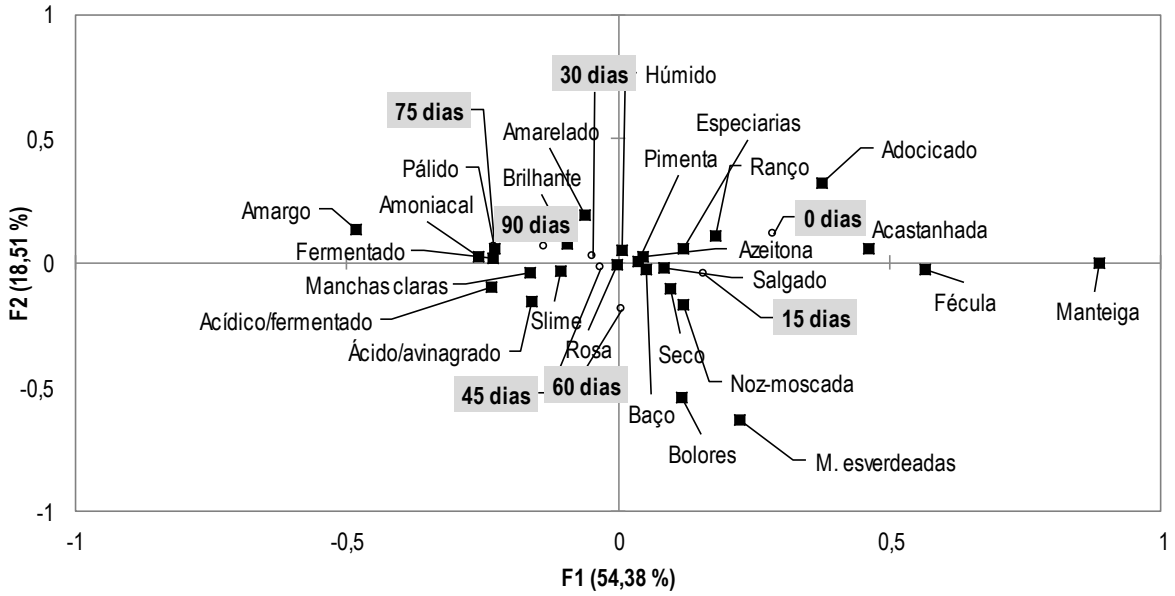

Figura 7- Análise fatorial das caraterísticas (quadrado negro) da mortadela com azeitonas armazenada a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 90 dias (circulo aberto) por 95 consumidores, no espaço definido pelos primeiros dois fatores, que conjuntamente contribuem 72,98% da informação explicada pelo gráfico.

1.2.2. . Evolução da microbiota ao longo do armazenamento

Ao atentarmos para a microbiota que a mortadela com azeitonas suportou ao longo do tempo de armazenamento, atendemos que apenas existe o desenvolvimento de BAL e bolores e leveduras (Quadro 8). A multiplicação de BAL não foi detetado no produto recém preparado (0 dias), mas ao fim de 30 dias já apresentava uma contagem elevada, de aproximadamente 7 log UFC/g. A multiplicação deste grupo de microrganismos apresenta diferenças altamente significativas ao longo do tempo ($p<0,001$), sendo que todos os tempos de análise são estatisticamente diferentes. Aos 90 dias a multiplicação de BAL aumentou cerca de sete unidades logarítmicas desde o início do estudo. Estudos realizados com produtos cárneos cozidos (fiambre fatiado e salsichas) demostram que, no início do estudo, BAL encontravam-se abaixo do limite de deteção, sendo que a sua multiplicação fez-se notar do sétimo dia de armazenamento para o décimo segundo (Hamasaki *et al*., 2003). Ao observar a tendência exibida por bolores e leveduras, verificamos que a sua deteção só ocorre mais tarde, cerca dos 60 dias, e a partir daí a sua multiplicação intensifica-se até ao último tempo de análise, mas ainda com um valor muito reduzido (2,61±0,36 log UFC/g).

Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp. mantiveram-se até ao final dos 90 dias sempre abaixo do nível de deteção. Segundo Pereira *et al*. (2015b) estes valores tão baixos são expectáveis uma vez que se trata de um produto cozido, em que durante o processo térmico, houve redução destes grupos de microrganismos.

Quadro 8 - Parâmetros microbiológicos de mortadela com azeitonas ao longo do armazenamento (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3).

Grupo de microrganismos	**Tempo (dias)**				**p**
	0	**30**	**60**	**90**	**(tempo)**
BAL	< LD(d)	6,72 ± 0,12(c)	7,69 ± 0,23(b)	8,48 ± 0,23(a)	**< 0,001**
Enterobacteriaceae	< LD	< LD	< LD	< LD	-
Pseudomonas spp.	< LD	< LD	< LD	< LD	**-**
Bolore e leveduras	< LD(b)	< LD(b)	0,90 ± 1,56(ab)	2,61± 0,36(a)	**0,012**

(a), (b), (c) – médias, na mesma linha, seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05)

1.2.3. Evolução do pH e parâmetros de cor (L*a*b*) ao longo do armazenamento

O pH foi determinado a cada 30 dias a fim de observar quais as diferenças ao nível da acidez que a mortadela com azeitonas experimentou ao longo dos 90 dias de armazenamento (Figura 8).

É facilmente observável que ao longo do tempo ocorre uma descida significativa do pH, sendo destacada, principalmente, nos primeiros 30 dias. No início do estudo, (0 dias), o pH da mortadela com azeitonas era de 6,05, e ao fim de 30 dias diminuiu para valores da ordem dos 4,57, período que corresponde à fase exponencial de multiplicação da população de BAL, uma vez que esses microrganismos atingem valores já superiores a 6 log UFC/g ao fim de um mês de armazenamento. Dos 30 dias até ao final do ensaio, este parâmetro continuou a descer significativamente, mas de forma menos acentuada, sendo que aos 60 dias apresentava valores de pH de 4,45 e no final do ensaio (90 dias) valores na ordem dos 4,31.

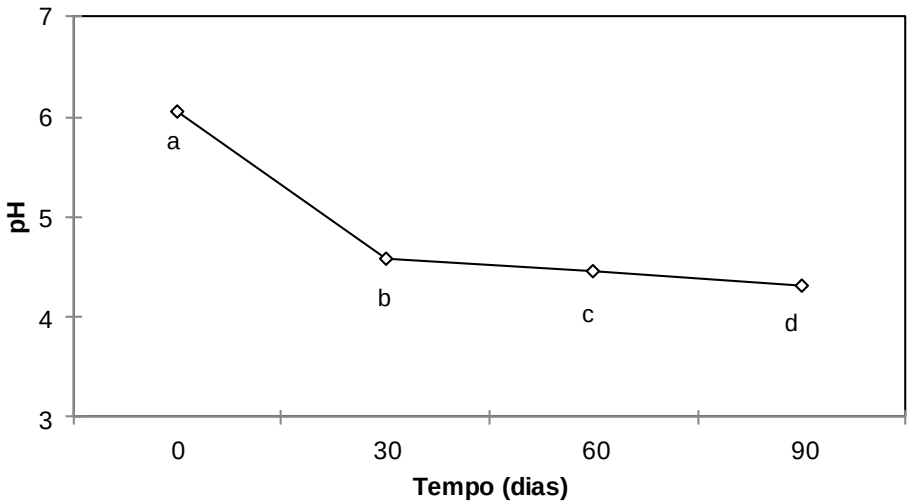

Figura 8 - Evolução do pH em fatias de mortadela com azeitonas, embaladas em vácuo, ao longo de 90 dias de armazenamento a 6ºC (n=3). (a), (b), (c), (d) – médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas.

Segundo Dutra *et al*. (2011), a cor estimada pelo sistema CIELab de enchidos tipo mortadela comercial apresenta valores de luminosidade (L*) de 55,51, índice de vermelho (a*) de +22,98 e índice de amarelo (b*) de +12,21. Podemos verificar, atendendo ao Quadro 9, que os valores não são discrepantes comparativamente com a biografia, havendo pequenas disparidades na luminosidade e índice de amarelo. Podemos também constatar que o tempo não teve qualquer influência na cor sendo que não são observadas quaisquer diferenças significativas (p>0,05). Isto quer dizer que após 90 dias de armazenamento, a cor (L*a*b*) manteve-se inalterável.

Quadro 9 - Valores padrão dos parâmetros L*, a* e b* de mortadela com azeitonas em cada tempo de análise (Média ± desvio-padrão, n=3).

Parâmetros	**Tempo (dias)**			***P***
	30	**60**	**90**	**Tempo**
L*	63,29 ± 4,02	63,60 ± 2,68	60,55 ± 1,84	0,438
a*	14,28 ± 2,95	16,57 ± 3,38	13,00 ± 3,04	0,421
b*	12,14 ± 2,23	12,13 ± 0,58	12,60 ± 1,52	0,492

Ainda que esta mortadela estivesse, até ao final dos 90 dias, com uma aceitação pelo consumidor ligeiramente superior a 50%, há indicações de que foi sofrendo alguma deterioração, ainda que insipiente. Esse processo é caraterizado por uma redução das características *sui generis* do produto fresco, como algum cheiro a especiarias e a azeitonas e o aumento de características associadas à deterioração, como o cheiro acídico/fermentado e o respetivo sabor ácido, e o sabor amargo. A ocorrência destas caraterísticas está provavelmente associada ao aumento nas contagens de BAL, que estava abaixo do limite de deteção (2 log UFC/g) no tempo zero, mas que logo ao fim de trinta dias já era da ordem dos 7 log UFC/g, sugerindo que a população de BAL já estava na fase final da fase exponencial (Audenaert *et al*., 2010). Assim, é possível que durante o armazenamento da mortadela tenha havido acumulação de metabolitos relacionados com a sua atividade metabólica. A acumulação de ácido lático, e eventualmente ácido acético, dependendo das espécies envolvidas, terá sido a responsável pelo cheiro acídico/fermentado e pelo gosto ácido das amostras (Labadie, 2007). Quanto ao sabor amargo, o aumento da referência a esse atributo pode ter dois motivos. Por um lado, como as provas foram feitas com consumidores, poderá ter havido alguma confusão entre ácido e amargo, que é comum em indivíduos sem experiência em análise sensorial, e tratar-se simplesmente de uma outra forma de se referirem à sensação produzida pelo ácido. Por outro lado, decorrente da atividade catabólica das BAL, e também dos bolores e leveduras que já começavam a crescer nas fases mais avançadas do armazenamento, poderão ter determinado alguma atividade proteolítica e aminopeptidásica, o que poderá estar na base da deteção do sabor amargo, pois a libertação de péptidos com determinados aminoácidos na extremidade da cadeia, ou a sua libertação pode aumentar o sabor amargo do alimento. Kato *et al*., (1989) apontam a alanina, a leucina, a fenilalanina e a metionina como aminoácidos com sabor amargo em solução aquosa.

As BAL configuram-se como um dos microrganismos específicos de deterioração de produtos cárneos cozidos, pois algumas estirpes mais termodúricas conseguem escapar ao tratamento de pasteurização que estes produtos sofrem (Dušková et al., 2016), e encontram condições muito favoráveis para a sua multiplicação, pois sendo anaeróbias ou microaerófilas não são afetadas pela embalagem sob vácuo (Pothakos *et al*., 2015). Adicionalmente, a maioria das estirpes encontra condições para se multiplicar em refrigeração e não é afetada pela presença de nitrito, pelo que tendem a dominar o ecossistema microbiano destes produtos (Hamasaki *et al*., 2003).

As leveduras e bolores, ainda que tenham sido encontrados em número modesto no final do período de armazenamento testado, são microrganismos que, *à proiori*, não constituem a maior preocupação na conservação destes produtos, pois necessitam de

oxigénio para se multiplicar, que é residual na embalagem em vácuo em que o teste de envelhecimento foi conduzido.

As bactérias gram-negativas estudadas, são geralmente bastante sensíveis a tratamentos pelo calor, pelo que a sua eliminação pela pasteurização combinada com as boas práticas de higiene que evitam que o produto seja contaminado durante a fase de fatiagem e de embalagem, resulta na ausência do microrganismo, a níveis que não permitem qualquer deteção durante os três meses em que decorreu o teste de envelhecimento.

1.2.4. Comportamento de *L. monocytogenes* ao longo do armazenamento de Mortadela com azeitonas e efeito da utilização de extrato de fumo na embalagem

A mortadela com azeitonas é um produto cárneo cozido o que, carateristicamente, pode suportar a multiplicação de *L. monocytogenes* uma vez que apresenta um valor de pH e uma aw moderadamente elevada (6,05 e 0,95 respetivamente). Tratando-se de um produto cárneo cozido, a única hipótese que há deste ser contaminado com *L. monocytogenes* é através de uma contaminação acidental durante a fase de fatiagem e de embalagem (Teixeira et al., 2018). Ainda que os muito elevados padrões de higiene que são usados, durante as fases de fatiar e embalamento quase que eliminem a probabilidade de contaminação com *L. monocytogenes*, que é devidamente vigiada através da aplicação da metodologia HACCP, poderá ser recomendável desafiá-la neste produto embalado, a fim de garantir que – no pior cenário de haver uma contaminação – esse microrganismo não se multiplica a níveis perigosos para o consumidor dentro do período de vida útil estabelecido (Vestergaard, 2001).

No presente trabalho, observou-se (Figura 9) que até aos 15 dias de armazenamento, *L. monocytogenes* não aumentou. A partir dos 30 dias de armazenamento observou-se um ligeiro aumento, que na embalagem normal ultrapassou já uma unidade logarítmica, e nas embalagens pulverizadas com extrato de fumo se manteve ligeiramente abaixo desse limite (0,9 log UFC/g). Esta discrepância no comportamento de *L. monocytogenes* nas embalagens pulverizadas e não pulverizadas com o extrato defumo tornou-se mais evidente ao fim dos 45 dias de armazenamento em que, na embalagem não pulverizada, o aumento atingiu cerca de 1,8 log UFG/g (em relação à contaminação inicial) e naquelas que foram pulverizadas com o extrato de fumo, manteve-se abaixo de 1 log UFC/g em cerca de 0,6 log UFC/g. Tendo em consideração o limite de 1 log UFC/g que é habitualmente apontado como critério para estabelecer o fim da validade em produtos que possam suportar a multiplicação de *L. monocytogenes*, pois indica que o microrganismo já ultrapassou a fase lag (Pereira *et al*.,

2015c). Neste caso, esse limite encontrar-se-ia algures entre os 15 e os 30 dias nas embalagens sem o extrato de fumo. Nas embalagens pulverizadas com extrato de fumo esse limite poderia ser estendido além dos 45 dias, tendo-se detetado um aparente efeito inibidor do extrato, ainda que não seja estatisticamente significativo (p>0,05).

Há ainda que ter em consideração que, no presente trabalho, se utilizou uma contaminação com *L. monocytogenes* elevada, sempre muito superior aquela que poderia ocorrer acidentalmente numa secção de fatiagem e embalagem de mortadela. Estes resultados evidenciam a importância de garantir a não contaminação do produto na fase de fatiagem, principalmente quando se pretende aumentar a validade do produto para além dos 30 dias de validade atual que, como se verificou, pelos testes de aceitação pelos consumidores pode extender-se até 90 dias.

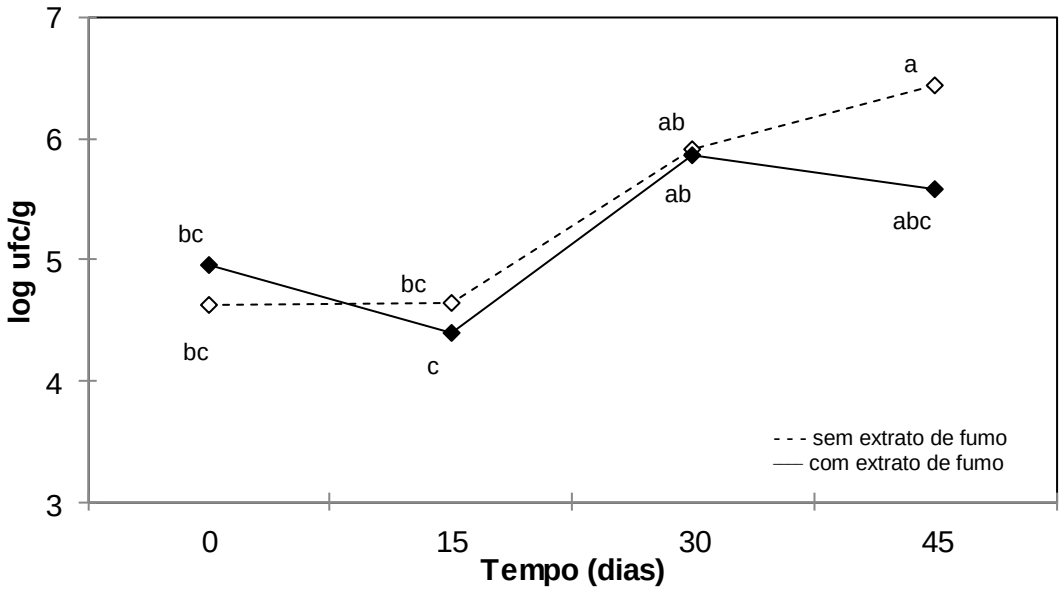

Figura 9 - Evolução da contagem de *L. monocytogenes*, inoculada na superfície de mortadela com azeitonas fatiada, ao longo do armazenamento a 6ºC, embalada sob vácuo em embalagem normal e em embalagem pulverizada com extrato de fumo (n=3). (a), (b), (c) – médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05).

1.3. Revisão do prazo de validade de Salpicão

1.3.1. Evolução da aceitação pelo consumidor e caraterísticas sensoriais ao longo do armazenamento

No sentido de avaliar a possibilidade de prolongar o prazo de validade de salpicão produzido em contexto industrial, fez-se um ensaio onde foi duplicado o prazo de validade atual. A empresa prevê para este produto uma validade de 60 dias, e no presente trabalho a validade foi testada até aos 126 dias, mais objetivamente utilizou-se múltiplos de 21 dias até ao total de 126 dias. Estes salpicões foram estudados por um grupo de 81 consumidores que o provaram e aos quais foi pedido para avaliar a sua frescura numa escala de um a cinco, em que o um correspondia ao produto pouco fresco e o cinco ao produto muito fresco. Inquiriu-se também qual a sua potencial intenção de consumir aquele produto tendo em consideração a sua frescura assim como qual a possibilidade de o vir a comprar ou a repetir a compra, no sentido de se manter fiel à marca.

Na Figura 10 estão representados os resultados da proporção de consumidores que manifestaram estarem dispostos a consumir o produto e dispostos a comprá-lo. Um dos aspetos que se observa é que, tal como esperados, as intenções consumo e de compra seguem uma tendência muito semelhante. No entanto, as intenções de compra são ligeiramente inferiores às de consumo. Tal acontece pelas mesmas razões apontadas para a mortadela com azeitonas: existem consumidores que estão dispostos a consumir o produto na perspetiva da sua frescura, mas por se tratar de um produto que não apreciam particularmente, frequentemente indicam não estar dispostos a comprá-lo.

No presente trabalho duplicou-se o prazo de validade previsto pela empresa na expetativa de que os últimos tempos fossem virtualmente académicos e onde houvesse uma taxa de rejeição bastante elevada pelos consumidores o que nos poderia permitir fazer outra abordagem, à análise de dados, a análise de sobreviventes. Não obstante, aquilo que se observou é que este produto tem uma boa capacidade de conservação e que, até ao último tempo de análise (126 dias), existe sempre uma proporção elevada de consumidores que estão dispostos, quer a consumi-lo quer a comprá-lo. Existe, de facto, em ambos os parâmetros uma ligeira quebra, e vai havendo progressivamente menos consumidores dispostos a consumir e a comprar o produto, no entanto, esses valores situam-se sempre acima dos 50% do nível de aceitação. Ou seja, quando consideramos que 50% é um dos valores de corte que habitualmente se considera para definir prazos de validade, com base em testes de consumidores, neste produto, mesmo ao fim dos 126 dias, o nível de aceitação

observa-se muito acima. Mesmo quando consideramos as recomendações feitas por alguns autores (Hough *et al*., 2003), quando trabalhamos com produtos topo de gama ou que queremos que o produto se mantenha com muito boas caraterísticas ainda no fim do prazo de validade, nesses casos, poder-se-á apontar para níveis de corte na ordem dos 75 % de aceitação. Mesmo nessa situação, ao longo de todo o prazo de validade estudado, a esmagadora maioria dos consumidores mostrou disponibilidade para consumir o produto, podendo-se, nesse caso específico, estender a validade do salpicão para os 105 dias.

Face a estes resultados, poder-se-á claramente ampliar o prazo de validade para os 126 dias sem que haja, aparentemente, alguma desvantagem. Note-se, que este ligeiro decréscimo na aceitação do produto é um padrão muito similar ao observado na apreciação global de frescura, representado pela Figura 11. Quando se solicitou aos consumidores para eles pontuarem a frescura numa escala de cinco pontos, em que o um correspondia ao produto pouco fresco e cinco ao produto muito fresco, observa-se que há um decréscimo, essencialmente entre o primeiro tempo de análise e o terceiro tempo de análise. Os dois primeiros tempos de análise não são estatisticamente diferentes entre si. É a partir do terceiro tempo de análise (42 dias) que é evidente uma diferença significativa na evolução da frescura. A inclinação desta curva é muito semelhante à da aceitação (Figura 10), mostrando-nos que de facto, a avaliação da frescura foi utilizada de forma bastante ponderada pelos consumidores para formularem a sua decisão de consumir ou não consumir o produto.

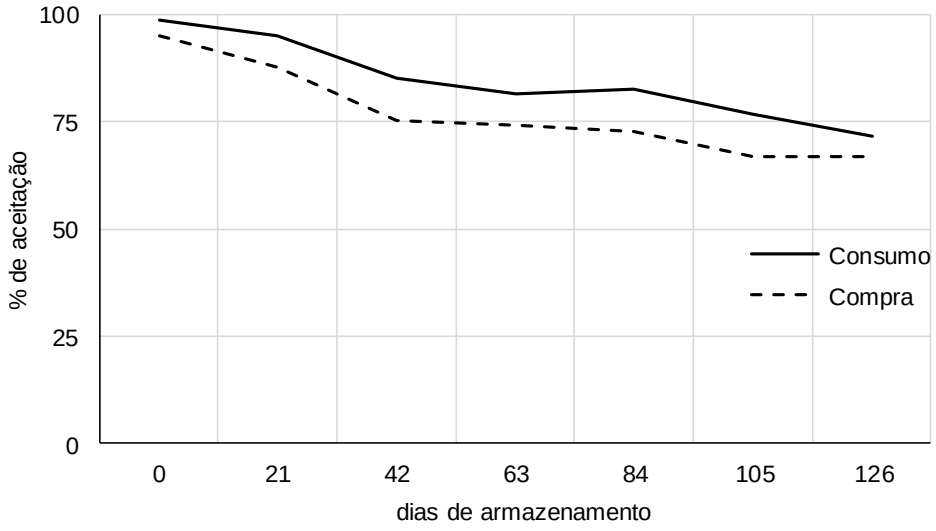

Figura 10 - Evolução da aceitação (consumo ou compra) de salpicão armazenado a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 126 dias por 81 consumidores.

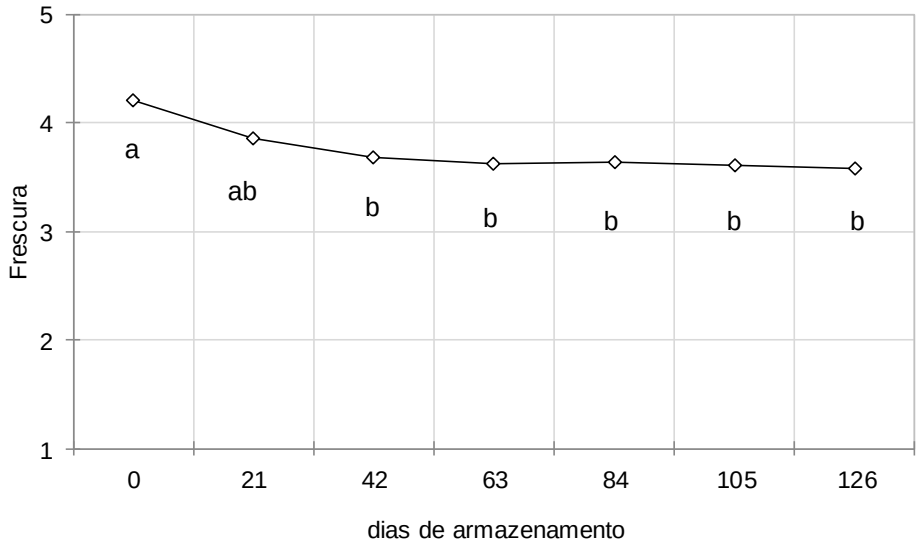

Figura 11 - Evolução da avaliação global da frescura de salpicão armazenado a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 126 dias por 81 consumidores; (a), (b) – médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas ($p<0,05$).

Foi pedido também a esse grupo de consumidores, que preenchessem uma ficha tipo CATA. Nesta ficha (Anexo III) eram descritas caraterísticas que o salpicão poderia apresentar. Essa lista de caraterísticas foi construída a partir da informação obtida com o trabalho de três grupos focais e, portanto, em termos de execução pediu-se aos consumidores que para cada uma das amostras que provaram, indicassem quais as caraterísticas que consideravam estarem presentes. Contudo, o que se observa, quando comparamos a frequência de indicação das diferentes caraterísticas (Quadro 10) que foram comparadas pelo teste Q de Cochran, é que a maioria das caraterísticas ao longo do tempo não apresenta diferenças significativas, o que, de alguma forma, vai de encontro aos dados anteriores, uma vez que na apreciação geral da frescura e em termos de intenção de compra, também as diferenças eram muito ténues ao longo do tempo.

Quadro 10 - Resultado do teste tipo CATA em salpicão - Frequência da indicação de caraterísticas entre os diferentes tempos de análise comparada pelo teste Q de Cochran.

Característica	0 dias	21 dias	42 dias	63 dias	84 dias	105 dias	126 dias	*p*
Aspeto								
Húmido	0,38 (a)	0,35 (a)	0,28 (a)	0,26 (a)	0,42 (a)	0,26 (a)	0,31 (a)	0,173
Slime	0,06 (a)	0,11 (a)	0,17 (a)	0,10 (a)	0,14 (a)	0,17 (a)	0,16 (a)	0,216
Seco	0,58 (a)	0,56 (a)	0,52 (a)	0,62 (a)	0,42 (a)	0,58 (a)	0,52 (a)	0,201
Brilhante	0,30 (a)	0,28 (a)	0,35 (a)	0,32 (a)	0,38 (a)	0,38 (a)	0,46 (a)	0,248
Curado	0,79 (a)	0,75 (a)	0,63 (a)	0,68 (a)	0,65 (a)	0,63 (a)	0,61 (a)	0,097
Acastanhada	0,12 (a)	0,07 (a)	0,10 (a)	0,06 (a)	0,10 (a)	0,14 (a)	0,10 (a)	0,708
Baço	0,14 (a)	0,25 (a)	0,259 (a)	0,28 (a)	0,19 (a)	0,26 (a)	0,19 (a)	0,183
M. mais escuras	0,05 (a)	0,04 (a)	0,198 (a)	0,10 (a)	0,10 (a)	0,09 (a)	0,11 (a)	0,020
M. esverdeadas	0 (a)	0 (a)	0 (a)	0 (a)	0,04 (a)	0 (a)	0 (a)	0,006
Aroma/flavour/sabor								
Vinho	0,53 (a)	0,52 (a)	0,506 (a)	0,59 (a)	0,61 (a)	0,63 (a)	0,53 (a)	0,585
Alho	0,25 (a)	0,42 (a)	0,370 (a)	0,37 (a)	0,37 (a)	0,32 (a)	0,37 (a)	0,358
Fermentado	0,03 (a)	0,05 (a)	0,074 (a)	0,07 (a)	0,11 (a)	0,07 (a)	0,07 (a)	0,519
Fumo	0,53 (b)	0,33 (ab)	0,40 (ab)	0,35 (ab)	0,27 (a)	0,35 (ab)	0,28 (a)	0,010
Curado	0,85 (c)	0,64 (abc)	0,70 (bc)	0,69 (abc)	0,49 (ab)	0,56 (ab)	0,46 (a)	0,000
Ranço	0 (a)	0,01 (a)	0,037 (a)	0,03 (a)	0,03 (a)	0,03 (a)	0,03 (a)	0,788
Enxofre	0 (a)	0 (a)	0,012 (a)	0 (a)	0 (a)	0,01 (a)	0 (a)	0,544
Bolores/mofo	0 (a)	0,01 (a)	0,025 (a)	0 (a)	0 (a)	0 (a)	0,01 (a)	0,370
Amoniaco/podre	0 (a)	0 (a)	0,012 (a)	0,01 (a)	0 (a)	0,01 (a)	0 (a)	0,609
Manteiga	0,04 (a)	0,01 (a)	0,012 (a)	0,03 (a)	0 (a)	0,01 (a)	0,03 (a)	0,677
Azedo/Avin.	0,04 (a)	0,11 (a)	0,160 (a)	0,15 (a)	0,19 (a)	0,17 (a)	0,21 (a)	0,045
Salgado	0,53 (a)	0,59 (a)	0,617 (a)	0,53 (a)	0,52 (a)	0,59 (a)	0,54 (a)	0,791
Picante	0,24 (b)	0,04 (a)	0,074 (ab)	0,07 (ab)	0,12 (ab)	0,14 (ab)	0,10 (ab)	0,002
Adocicado	0,10 (a)	0,16 (a)	0,123 (a)	0,14 (a)	0,07 (a)	0,09 (a)	0,05 (a)	0,225
Ácido	0,06 (a)	0,11 (a)	0,20 (a)	0,120 (a)	0,20 (a)	0,20 (a)	0,22 (a)	0,047

Avin. Avinagrado; (a), (b), (c) – valores seguidos de letras diferentes apresentam diferenças significativas entre tempos ($p<0,05$).

Há um aspeto curioso nestes resultados. As diferenças situam-se não tanto em caraterísticas que fossem *à priori* associadas a deterioração tais como cheio a ranço, a enxofre, a bolores e mofo ou a amoníaco, mas sim ao nível de caraterísticas *sui generis* do próprio salpicão, como o cheiro a fumo e curado, onde são verificadas diferenças muito significativas e altamente significativas respetivamente.

Curiosamente é ao nível do cheiro a fumo e do cheio a curado que se nota uma redução considerável ao longo do tempo, verificando-se que os produtos ao fim dos 126 dias apresentam um menor número de consumidores que indicram que aquelas caraterísticas estão presentes, sugerindo que a perda de frescura deste alimento, dentro deste intervalo

com que trabalhámos, permaneceu sempre razoavelmente muito fresco, até ao fim. O que se nota é que este grupo de consumidores conseguiu demonstrar que a perda de frescura é determinada não tanto pelo aumento de caraterísticas associadas à deterioração, mas pela perda de caraterísticas próprias deste tipo de enchido, como o cheiro a fumo e a curado.

Na avaliação global de frescura, nota-se um decréscimo significativo entre o início do estudo e os 42 dias de armazenamento. A partir da análise do teste CATA verificamos que até aos 42 dias, caraterísticas como o *flavour* a fumo e curado têm valores elevados, para os tempos seguintes a sua perceção pelos consumidores vai sempre diminuindo.

A perda destas caraterísticas pode estar relacionada com diferentes aspetos nomeadamente com a permeabilidade do material de embalagem e com a eventual absorção de compostos aromáticos por parte deste material. Esse aspeto já foi observado com vários compostos aromáticos lipossolúveis em alimentos (Ducruet *et al*., 2001). Quanto à perda do cheiro a curado, pode estar relacionado com dois mecanismos: alguns destes compostos poderão, de alguma forma, ficar absorvidos pelo material de embalagem, uma vez que o armazenamento é extenso, e desta forma não serem tão percetíveis por parte dos consumidores, ou, pode ter havido modificações químicas dos compostos que compõem a fração aromática reconhecida como cheiro a curado (Perea-Sanz *et al*., 2019). Por exemplo, o cheiro a curado está associado a alguns aldeídos muito específicos como o 3-metilbutanal, 2-metilbutanal e 2-metilpropanal, tal como os álcoois e ácidos correspondentes, obtidos por redução ou oxidação desses aldeídos. Estes aldeídos são muito aromáticos, mas são também relativamente instáveis, podendo ser oxidados ou reduzidos, sendo que os ácidos ou álcoois correspondentes podem ser aromaticamente menos ativos (Berdagué *et al*., 1993; Montel *et al*., 1996).

Das caraterísticas que poderíamos associar à deterioração o cheiro a ácido e o cheiro a azedo/avinagrado são os que se destacam mais. Ao nível das manchas escuras e manchas esverdeadas, mostraram-se significativas ao longo do tempo. No entanto, quando comparamos as frequências de indicação dessas manchas em cada tempo de armazenamento, observamos que nestas caraterísticas não são detetadas diferenças pontuais em nenhuma delas, o que estará relacionado com a sua indicação por parte dos consumidores ter sido bastante errante. Não obstante, há uma ligeira tendência das manchas escuras aumentarem um pouco ao longo do tempo. As manchas esverdeadas aparecem-nos com uma referência residual aos 84 dias e, nos tempos seguintes não foram referidas pelos consumidores. Ao nível do *flavour* ácido, o padrão que foi encontrado é um padrão esperado. Como se verificou, este produto suporta muito bem a multiplicação de bactérias do ácido

láctico, e de facto há um aumento do número de consumidores que percecionou um aumento de uma nota ácida.

Quando se procede a uma análise fatorial dos dados CATA simultaneamente das caraterísticas e dos tempos de análise, verificamos que os dois fatores contribuem conjuntamente para 68,2% de informação original dos dados. Na Figura 12, observamos que a maior parte da informação obtida é exposta pelo Fator 1, ou seja, pelo eixo horizontal, que contribui com 45,01% da informação original.

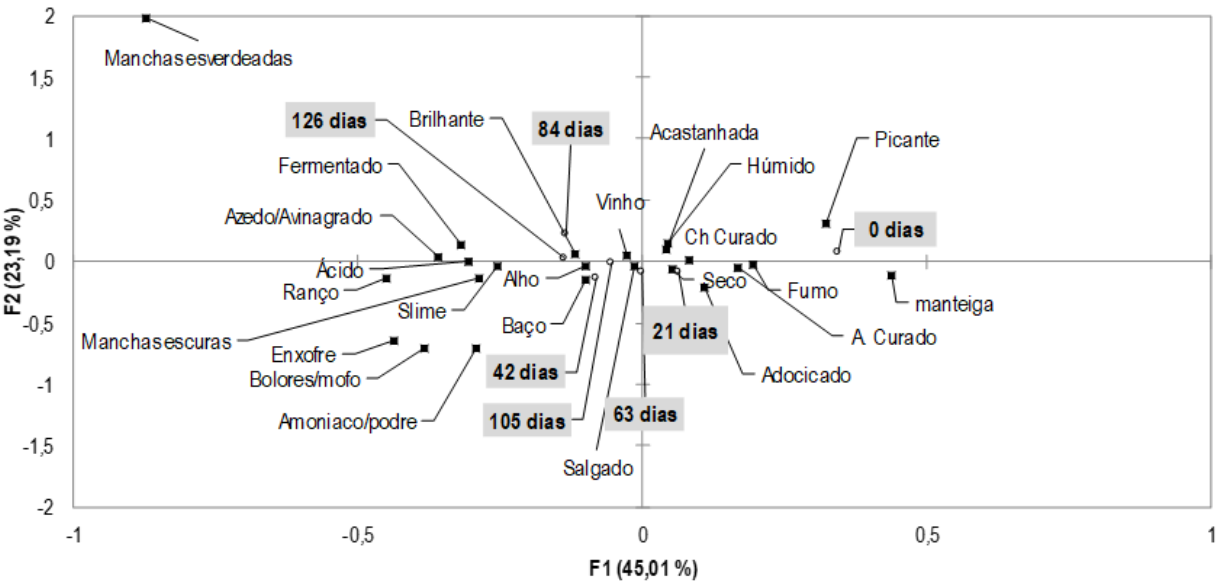

Figura 12 - Análise fatorial das características (quadrado negro) do salpicão armazenado a 6ºC desde o início do armazenamento até aos 126 dias (circulo aberto) por 81 consumidores, no espaço definido pelos primeiros dois fatores, que conjuntamente contribuem com68,2% da informação explicada pelo gráfico. (A. Aspeto; Ch Cheiro).

Quando observamos a Figura 12, denota-se que as caraterísticas analisadas, assinaladas com quadrados negros, estão quase todas próximas do eixo horizontal, e são discriminadas sobre este com a exceção das manchas esverdeadas, que também está associada ao Fator 2, juntamente com outras notas associadas a produtos muito deteriorados, como o cheiro a enxofre, amoníaco/podre e a bolor/mofo. Quando analisamos a relação entre os atributos, observa-se que do lado direito estão projetadas essencialmente aquelas caraterísticas que podemos associar ao produto fresco, tais como a perceção do cheiro e aspeto a curado, cheiro a fumo e o picante. Do lado oposto, e mais afastadas do eixo, observamos caraterísticas que poderiam estar associadas a um produto menos fresco como

a presença de *slime*; o cheiro amoniacal/podre; o cheiro a enxofre, mofo; o sabor azedo, ácido ou a ranço.

Note-se que à medida que a projeção das caraterísticas se afastam da origem, vão ter uma maior importância para esta discriminação, e de facto é aqui que nos deparamos o cheiro fermentado, ranço, azedo/avinagrado. Ou seja, estas caraterísticas são descritas como indicadoras do produto deteriorado. Esta observação mais uma vez confirma que a prestação deste grupo de consumidores é muito coerente, distinguindo claramente as caraterísticas de frescura do produto das deterioriativas. Quando se projetam os diferentes tempos de armazenamento, que são indicados em retângulos cinzentos, atentamos que tal como seria de esperar, mais à direita temos o tempo zero, que corresponde ao salpicão mais fresco de todos, sendo que do lado oposto do mesmo quadrante temos o tempo seguinte, correspondendo aos 21 dias. Daí em diante seguem os demais dias o que, curiosamente, nem sempre estão por ordem sendo que o último tempo é sempre o que sugere o salpicão menos fresco, os 126 dias.

É de reparar que, apesar do dia zero estar relativamente afastado da origem dos fatores, todos os restantes dias situam-se muito próximo da origem das coordenadas, o que indica que esta discriminação, ainda que exista, é relativamente fraca, o que vai de encontro com os anteriores resultados da avaliação de frescura e da aceitação do produto.

1.3.2. Evolução da microbiota ao longo do armazenamento

Os resultados dos parâmetros microbiológicos avaliados no salpicão ao longo do armazenamento estão expressos no Quadro 11. Podemos verificar que ao longo do total de 126 dias, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. mantiveram-se sempre inferiores ao limite de deteção (2 log UFC/g). No entanto, BAL e bolores e leveduras apresentaram uma multiplicação altamente significativo nas fatias de salpicão ($p \leq 0{,}001$).

A contagem de BAL manteve-se inferior ao limite de deteção até aos 63 dias. Aos 84 dias é verificada a sua presença, que aumenta de modo significativo até aos 126 dias. De modo semelhante, acontece quando observamos a mutiplicação de bolores e leveduras, que se mantiveram indetetáveis até aos 63 dias. No entanto a sua multiplicação dos 84 dias de análise até aos 126 não se mostrou significativa.

Quadro 11 - Parâmetros microbiológicos de salpicão ao longo do armazenamento (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3).

Grupo de microrganismos	Tempo (dias)					*p* (tempo)
	0	42	63	84	126	
BAL	< LD(c)	< LD(c)	< LD(c)	8,61 ± 0,13(b)	9,04 ± 0,08(a)	**< 0,001**
Enterobacteriaceae	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	-
Pseudomonas spp.	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	**-**
Bolores e leveduras	< LD(b)	< LD(b)	< LD(b)	2,74 ± 0,71(a)	3,14 ± 0,79(a)	**< 0,001**

(a), (b), (c)– médias, na mesma linha, seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05)

Tal como observado com a mortadela, a microbiota deste produto no início do armazenamento é residual. O salpicão alvo do presente trabalho é um produto pasteurizado, e com uma atividade da água reduzida, da ordem dos 0,91. Assim, as BAL mais termodúricas que possam ter sobrevivido ao tratamento de pasteurização, demoram a sair da fase de adaptação e a multiplicar-se de forma exponencial, pois o conjunto de condições do salpicão eventualmente condiciona a sua viabilidade, nomeadamente a reduzida aw combinada com outros obstáculos presentes no enchido, como a presença de nitrito, vinho e outros ingredientes com potencial atividade antimicrobiana. Será algures, entre os 63 e os 84 dias de armazenamento, que acontece a fase logarítmica de multiplicação destes microrganismos. A presença da microflora lática em salpicão não deve ser vista como deteriorativa (Stolzenbach *et al*., 2009). Trata-se de um grupo de microrganismos que estão habitualmente presentes em enchidos curados em elevado número, e dominam a microflora do produto (Geeraerts *et al*., 2017; Stolzenbach *et al*., 2009;). Do ponto de vista da conservação, a sua presença é potencialmente benéfica, pois contribui para o controlo de outros microrganismos potencialmente nocivos (patogénicos ou deteriorativos) que possam estar acidentalmente presentes no enchido (Fraqueza *et al*., 2016). Este tipo de salpicão, que é pasteurizado para produzir uma redução muito significativa da sua microflora, tem um ecossistema microbiano ligeiramente diferente do salpicão tradicional. No salpicão tradicional, que não é pasteurizado, a microflora lática atinge valores da ordem dos 6 a 8 log UFC/g logo nos primeiros dias após enchimento (Fraqueza e Patarata, 2018). No salpicão alvo do presente trabalho essa microflora só vem a estabelecer-se muito mais tarde, uma vez que sofre uma acentuada redução pelo tratamento térmico. Estes tratamentos térmicos são muito interessantes do ponto de vista da segurança sanitária, pois habitualmente são concebidos para produzir uma redução em microrganismos patogénicos de baixa dose infeciosa (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.) da ordem dos 5D. Porém, em termos de desenvolvimento de

caraterísticas sensoriais, poderá ficar um pouco aquém do fabrico mais tradicional, ficando o seu aroma exclusivamente dependente da aromatização feita no tempero e pela fumagem, havendo uma limitada formação de compostos com interesse no aroma a curado do produto.

1.3.3. Evolução do pH e parâmetros de cor (L*a*b*) ao longo do armazenamento

Ao analisarmos a evolução do valor de pH que o salpicão experimentou ao longo de todo o armazenamento (Figura 13), observamos claramente que, apesar de ténue houve uma diminuição significativa ao longo de todo o ensaio. No início do estudo, o pH era de 5,8, e até aos 42 dias desceu para valores na ordem dos 5,23, o que se mostrou significativo. Dos 63 dias, em que apresentava valores de 5,17, até aos 84 dias continuou a descer significativamente até aos 4,99, valor que não sofreu alterações até aos 126 dias.

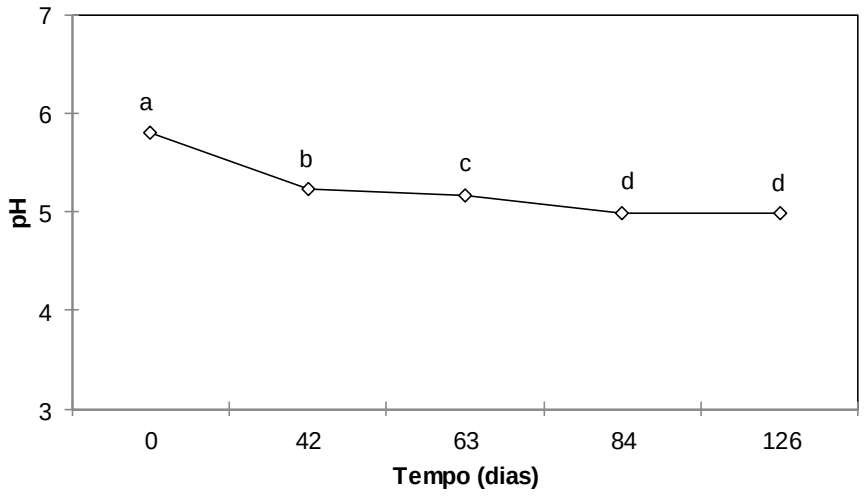

Figura 13 - Evolução do pH em fatias de salpicão, embaladas em vácuo, ao longo de 126 dias de armazenamento a 6ºC (n=3). (a), (b), (c), (d) — médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05).

Esta descida do pH mais intensificada do início do estudo até aos 42 dias, ao contrário do que aconteceu com a mortadela, que coincidiu com o período de tempo da multiplicação exponencial de BAL, no salpicão, aos 42 dias BAL ainda se encontravam abaixo do limite de deteção (2 log UFC/g). No entanto ao observar o teste CATA verificamos que aos 42 dias foram apontadas, por mais consumidores, caraterísticas associadas a um produto deteriorado, como a presença de manchas mais escuras e o aroma/sabor a ranço, enxofre,

bolores/mofo e amoníaco/podre. Estas notas de aroma/sabor, apesar de não serem significativas ao longo do tempo, nem quando comparamos as suas frequências de indicação, podem ter alguma influência na descida do pH. Estes valores vão reforçar a ideia de que a multiplicação de BAL não é um indicador de deterioração (Kreyenschmidt *et al*., 2010).

Relativamente aos parâmetros de cor (L*a*b*) no salpicão, expressos através do Quadro 12, são verificadas diferenças significativas apenas no parâmetro da luminosidade. Os tempos de análise correspondentes aos 42 e 63 dias são significativamente diferentes dos restantes tempos (84 e 126 dias), o que se traduz num escurecimento a partir dos 84 dias.

Quadro 12 - Valores padrão dos parâmetros L*, a* e b* de salpicão em cada tempo de análise (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3).

Parâmetros	Tempo (dias)				*p*
	42	63	84	126	
L*	52,95 ± 2,35(a)	50,47 ± 0,60(a)	45,05 ± 1,31(b)	41,16 ± 1,57(b)	0,000
a*	21,21 ± 3,03	21,47 ± 0,24	22,73 ± 1,81	+ 22,82 ± 1,60	0,658
b*	7,52 ± 1,89	6,76 ± 0,21	5,99 ± 0,44	6,42 ± 0,75	0,388

a), (b) — médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05).

1.3.4. Comportamento de *L. monocytogenes* ao longo do armazenamento de Salpicão e efeito da utilização de um extrato de fumo na embalagem

Como podemos verificar ao analisar a Figura 14, ao longo do tempo de armazenamento *L. monocytogenes* não aumentou. Ao fim 21 dias a contagem manteve-se semelhante àquela após inoculação. A partir dos 42 dias, as contagens de *L. monocytogenes* era significativamente diferentes das observadas no início do ensaio. A partir desse momento houve uma redução, que aos 63 dias de armazenamento alcançou cerca de 1 unidade logarítmica. Uma vez que o comportamento do microrganismo foi sempre descendente, não se prolongou mais o teste de desafio microbiológico pois não havia qualquer indício de que este microrganismo pudesse multiplicar-se. Apesar do salpicão fumado alvo do presente estudo apresentar uma aw média de 0,93 e valor de pH 5,8, que de acordo com o recomendado pelo Regulamento CE 1441 de 2007 que altera o Regulamento CE 2073 de 2005, que dita que os alimentos prontos para consumo não suscetíveis de permitir a

multiplicação de *L. monocytogenes*, que apresentam um pH ≤ 4,4 ou com aw ≤ 0,92, os produtos com um pH ≤ 5,0 e com aw ≤ 0,94, ou seja, o presente salpicão configura-se como um produto que suporta a multiplicação deste microrganismo, o que neste estudo não se verificou. A combinação de fatores intrínsecos, como a aw que já não é muito favorável à sua multiplicação, a presença de nitrito e as condições de anaerobiose terão contribuído para essa inibição. A competição com BAL é comumente apontada como um dos fatores que contribuem para a inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* (Gray *et al*., 2018). Não obstante, no presente trabalho, até aos 63 dias, a contagem de BAL encontrava-se abaixo do limite de deteção (100 UFC/g) como observado anteriormente no Quadro 11. Apesar de ser inferior ao limite de deteção, é provável que já apresentasse alguma atividade pois no tempo de análise seguinte (84 dias) a sua contagem foi de quase 9 log UFC/g, e por isso a competição com *L. monocytogenes* poder-se-á ter refletido nestes resultados. Para além da inibição, BAL também produzem bacteriocinas capazes de retardar a multiplicação de *L.* monocytogenes. (Silva *et al*., 2018).

O extrato de fumo utilizado na pulverização do interior da embalagem com o objetivo de inibir *L. monocytogenes* teve um efeito negligenciável, não se verificando diferenças significativas ao longo do tempo (p>0,05).

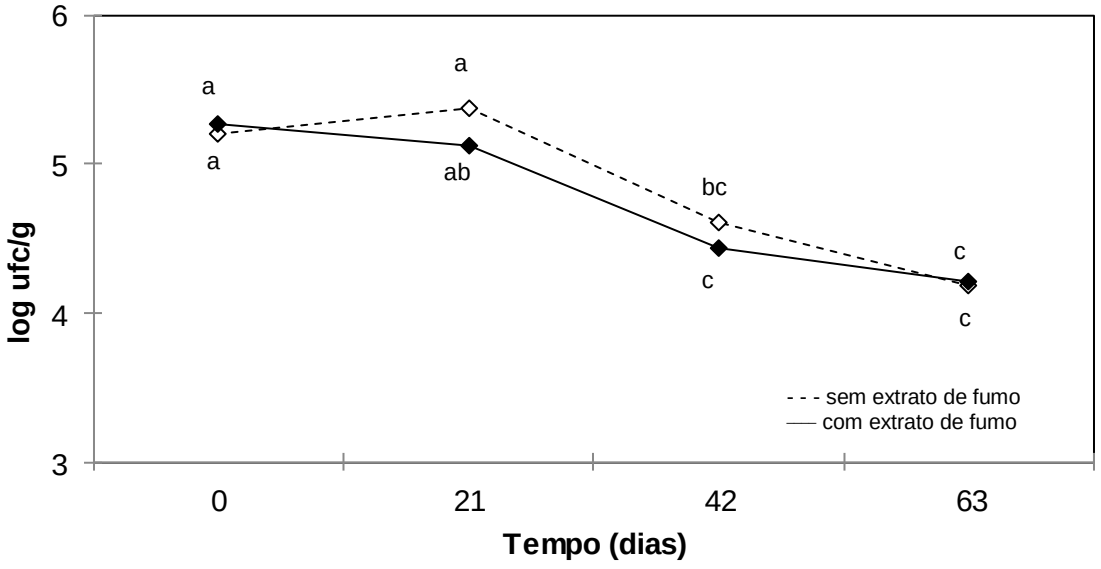

Figura 14 - Evolução da contagem de *L. monocytogenes*, inoculada na superfície de Salpicão fatiado, ao longo do armazenamento a 6ºC, embalada sob vácuo em embalagem normal e em embalagem pulverizada com extrato de fumo. (a), (b), (c) — médias seguidas de letras de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05).

2. Revisão do prazo de validade de fígado de porco e peito de frango embalado em vácuo e atmosfera modificada

2.1. Fígado de porco

2.1.2. Evolução da aceitação pelo consumidor com base no aspeto e cheiro ao longo do armazenamento

O fígado de porco tem uma validade curta. A empresa tem essa validade estabelecida em três dias, independentemente do tipo de embalagem. O estudo da possibilidade de prolongamento da validade foi realizado tendo como ponto de partida a validade atual, tendo-se acrescentado dois períodos de dois dias. Como o aspeto dos produtos frescos é um dos critérios mais importantes na sua apreciação pelo consumidor (Grebitus *et al*., 2013) e no momento de compra o único critério, no presente trabalho, demos particular importância a essa dimensão sensorial. Como os tempos de análise eram muito próximos, e dada a dificuldade de conciliar o vencimento dos tempos de análise com a disponibilidade de consumidores, registou-se o aspeto dos produtos em fotografia, realizadas sempre nas mesmas condições e com o mesmo equipamento e fotógrafo. Adicionalmente, foram congeladas porções dos produtos em cada tempo de armazenamento, para se poder, posteriormente, avaliar o cheiro.

A abordagem com os consumidores foi realizada com duas estratégias. Uma sessão presencial com os consumidores, em que se pediu para classificar a frescura da imagem do fígado desembalado, combinado com a apreciação do cheiro. A outra abordagem consistiu em pedir a um grupo maior de consumidores que classificassem a frescura do fígado a partir da sua imagem registada em fotografia, também desembalado, usando uma plataforma de inquéritos online.

Para as provas presenciais foram apresentados ao consumidor fotografias de fígado de porco e porções do produto em tubos Falcon em três estágios da sua validade, no fim da validade proposta pelo fabricante, após dois dias e após quatro dias do vencimento da validade proposta pelo fabricante. Em todos os cenários, quer para o fígado de porco embalado em MAP, assim como para o embalado em vácuo, houve uma diminuição altamente significativa na avaliação global da frescura (Quadro 13), sendo que esta diminuição é mais notória no fígado embalado em MAP, do que no embalado em vácuo. É de notar que a escala utilizada para avaliar a frescura era composta por cinco pontos, em que o um correspondia ao produto pouco fresco e cinco ao produto muito fresco, e face aos resultados obtidos, no fígado

de porco embalado em MAP, o fim da validade proposta pelo fabricante apresenta valores de frescura aproximados àqueles que constituem um produto fresco, na ordem dos quatro valores, sendo que nos tempos seguintes vai diminuindo significativamente. Verificamos também que nas provas ao vivo, onde foi incluído a avaliação do aspeto e do cheiro, existem diferenças significativas em todos os tempos de análise. Nas provas onde apenas é avaliado o aspeto online apenas existem diferenças significativas entre os dois primeiros tempos de análise, que correspondem ao fim da validade proposta pelo fabricante e dois dias após. Estes resultados indicam que a inclusão de uma prova de cheiro na apreciação do produto torna a sua avaliação mais completa.

Quadro 13 - Avaliação global da frescura de fígado de porco embalado em MAP e em vácuo ao longo do armazenamento além da validade estabelecida pelo fabricante (f.v.). (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=183 consumidores online; 44 ao vivo).

Embalagem	**Tempo (dias)**			***P* (tempo)**
MAP	**f.v.**	**f.v. + 2**	**f.v. + 4**	
Aspeto e cheiro ao vivo	4,02 ± 1,15(a)	2,00 ± 0,89(b)	1,48 ± 0,87(c)	<0,001
Aspeto online	4,12 ± 0,85(a)	2,01 ± 0,97(b)	1,80 ± 0,91(b)	<0,001
Vácuo	**f.v.**	**f.v. + 2**	**f.v. + 4**	
Aspeto e cheiro ao vivo	2,71 ± 0,89(a)	2,48 ± 1,09(a)	1,73 ±1,03(b)	<0,001
Aspeto online	3,20 ± 0,98(a)	3,12 ± 1,09(a)	1,86 ± 0,93(b)	<0,001

f.v. – fim de validade previsto pelo industrial; (a), (b), (c) — médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes (p<0,05).

No fígado de porco embalado em vácuo atendemos que a avaliação da frescura, numa escala de cinco pontos apresenta valores que caraterizam um produto já não muito fresco no primeiro tempo de análise (f.v.), tendo o valor de 2,71 e 3,20 na avaliação ao vivo e online respetivamente. Existem diferenças significativas na frescura do segundo tempo de análise (f.v.+2) para o último tempo de análise (f.v.+4). Contrariamente ao fígado de porco embalado em MAP onde o cheiro tem uma influência estatisticamente significativa, tal não acontece com o fígado de porco embalado em vácuo.

Curiosamente, a avaliação do produto ao vivo apresenta sempre valores de frescura ligeiramente inferiores aos valores da avaliação online, o que demonstra que os consumidores ou não estão familiarizados com o cheiro do fígado pois no dia-a-dia este produto tem um

consumo limitado, e não é comum o consumidor, em geral, cheirar o produto crú, mas sim já cozinhado.

Quando estudamos a intenção de consumo de fígado de porco embalado em atmosfera modificada (Figura 15), verificamos que no primeiro tempo de análise (f.v.) o fígado foi aceite por 87,4% e 60,4% dos consumidores atendendo ao aspeto online e apreciação ao vivo, respetivamente. No tempo de análise correspondendo a dois dias após o vencimento da validade definida pelo fabricante (f.v.+2), a percentagem de aceitação cai consideravelmente para 21,2% na apreciação ao vivo e 13,2% na apreciação online. Estes resultados vão ao encontro com o teste de frescura, uma vez que este tempo de análise é estatisticamente diferente do primeiro (f.v.). Observando o último tempo de análise (f.v.+4) constatamos que a percentagem de aceitação na apreciação online é 9,3% e na apreciação ao vivo é 3,9%. Verificamos que a descida acentuada que se verifica do primeiro tempo de análise (f.v.) para o segundo tempo de análise (f.v.+2) é notória, quer na avaliação global de frescura, quer na intenção de consumo de fígado de porco embalado em atmosfera modificada, o que reflete uma conformidade na avaliação por parte dos consumidores.

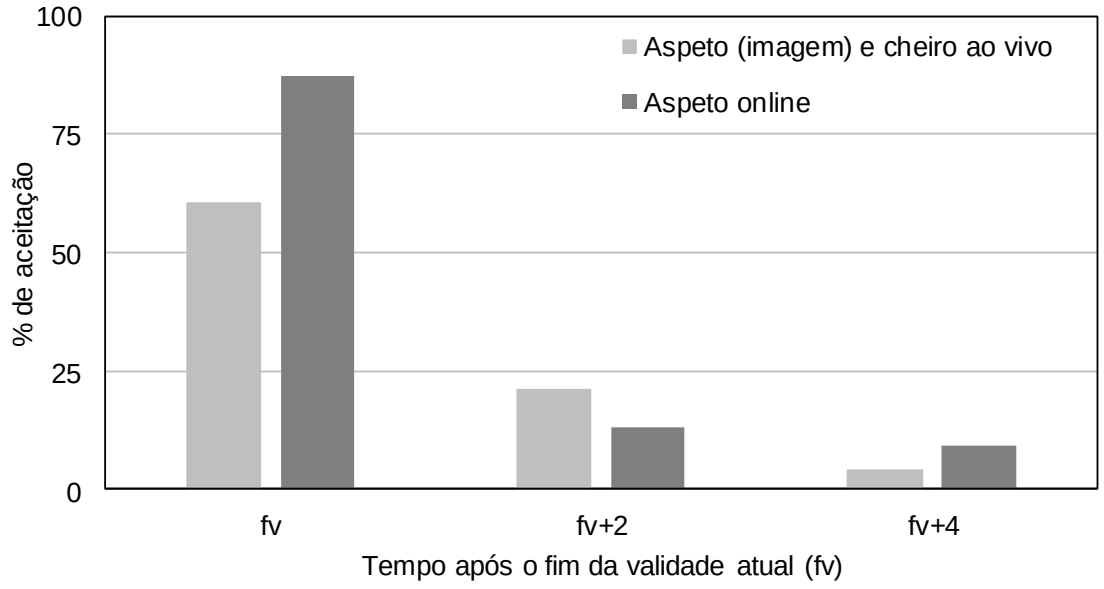

Figura 15 - Intenção de consumo de fígado de porco embalado em MAP manifestada pelos consumidores por avaliação do aspeto (fotografia) e cheiro ao vivo (n=44) e só aspeto online (n= 183) no fim da validade estabelecido pela empresa (f.v.) e em dois tempos de armazenamento subsequentes, a que se acrescentou 2 e 4 dias.

No fígado de porco embalado em vácuo, apesar de na avaliação global de frescura ser estatisticamente igual à do primeiro tempo de análise (f.v.) para o segundo tempo de análise (f.v.+2), a percentagem de aceitação é relativamente diferente (Figura 16). No fim da validade proposta pelo fabricante (f.v), a percentagem de aceitação é pouco superior a 50%, sendo os parâmetros de avaliação, apreciação online e apreciação ao vivo muito semelhantes, correspondendo a 57,7% e 54,7%, respetivamente. Nos restantes tempos, a percentagem de aceitação diminui consideravelmente à exceção do aspeto online no segundo tempo de análise (f.v.+2), que apresenta um valor de 51,1% e ao vivo de 30,8%. Por fim, o último tempo de análise (f.v.+4) tem valores de aceitação na ordem dos 7,8% e 9,9% na apreciação ao vivo e online respetivamente. É notório que a apreciação online, apenas visual, apresenta sempre uma percentagem de aceitação superior à apreciação ao vivo, que é complementada pelo cheiro do produto.

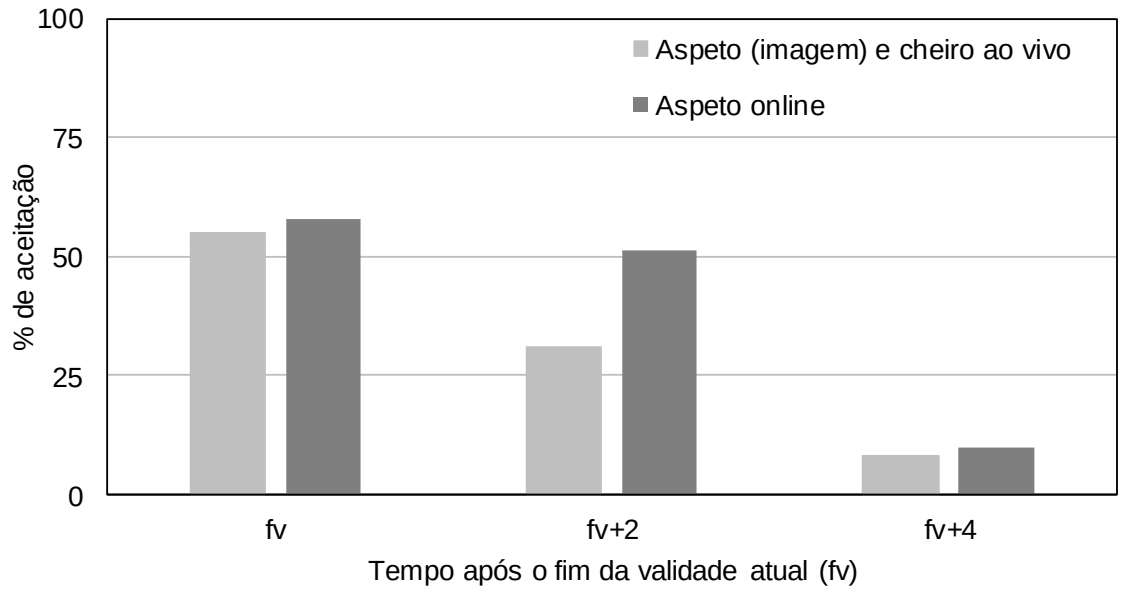

Figura 16 - Intenção de consumo de fígado de porco embalado em vácuo manifestada pelos consumidores por avaliação do aspeto (fotografia) e cheiro ao vivo (n=44) e só aspeto online (n=183) no fim da validade estabelecido pela empresa (f.v.) e em dois tempos de armazenamento subsequentes, a que se acrescentou 2 e 4 dias.

Estes resultados vão de encontro com os da avaliação global da frescura uma vez que os consumidores apontaram que o primeiro tempo de análise (f.v.) apresenta uma frescura que já se encontra no meio da escala de frescura, e a sua intenção de consumo está perto dos 50%.

É de ter em consideração que no presente trabalho, dos consumidores que foram usados, quer para as provas sensoriais analíticas ao vivo como para o inquérito online, apenas uma fração era consumidor regular de fígado de porco. Os consumidores não estão habituados a cheirar o fígado cru, e a vê-lo inteiro (normalmente veem-no cortado em escalopes), o que pode, de alguma forma, ter influenciado a aceitação do consumidor.

2.1.1. Evolução da microbiota e pH ao longo do armazenamento

Na Figura 17 está descrita a evolução do pH de fígado de porco. Podemos verificar que não existem diferenças significativas até ao fim dos quatro dias que excedem a validade do produto definida pelo fabricante. Valores de pH semelhantes foram registados por (Devatkal *et al*., 2004).

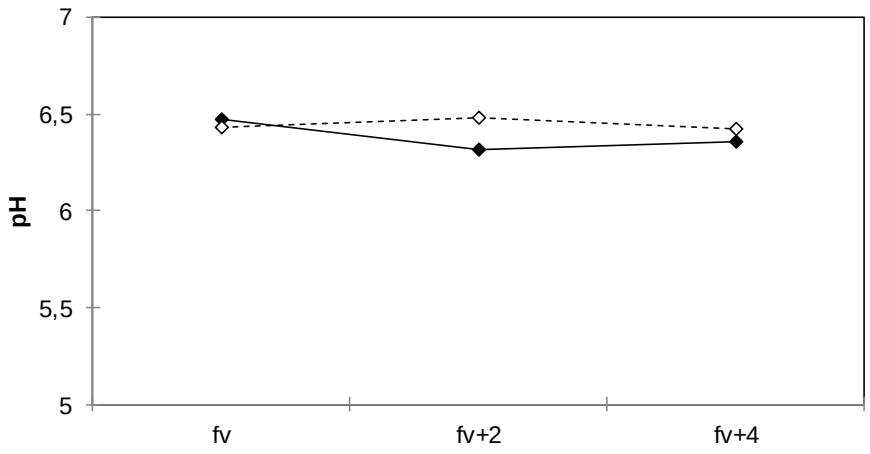

Figura 17 - Evolução do pH de fígado de porco embalado em atmosfera modificada (linha contínua) ou vácuo (linha descontinua) ao longo do armazenamento além do fim da validade atual definido pela empresa (f.v.). (n=3)

No sentido de determinar o prazo de validade do fígado de porco embalado em vácuo e em atmosfera modificada, procedeu-se à monitorização da microbiota deteriorativa em três tempos distintos de análise. Os resultados dos parâmetros microbiológicos estão expressos no Quadro 14. Verificamos, logo à partida, que o valor das contagens no final do estudo são menores que no início do mesmo. Esta diminuição, mesmo que não seja estatisticamente significativa, foi também detetada por Berry *et al*., (1982) na contagem de microrganismos

aeróbicos totais em bifes de fígado durante o transporte. Comparando estatisticamente os tempos de armazenamento de fígado de porco embalado em atmosfera modificada, são indicadas diferenças significativas no tempo dois dias após o vencimento da validade e no tempo correspondente a quatro dias após o vencimento da validade para a multiplicação de microrganismos psicotróficos totais e *Pseudomonas* spp.. A multiplicação de ambos os microrganismos diminuiu significativamente. Com este tipo de embalagem, a multiplicação de BAL não é significativa, sendo que resultados semelhantes foram descritos por Teresa Rivas *et al*., (1992). Quando observamos os parâmetros microbiológicos de fígado de porco embalado em vácuo, detetamos diferenças significativas em duas unidades logarítmicas na multiplicação de BAL, dos dois primeiros tempos de análise (f.v. e f.v.+2) para o último tempo de análise (f.v.+4). Para os restantes valores microbiológicos não são verificadas quaisquer diferenças significativas, tanto no fígado embalado em vácuo como em atmosfera modificada.

Quadro 14 - Parâmetros microbiológicos de fígado de porco embalado em atmosfera modificada e em vácuo. (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3).

Embalagem	**Tempo (dias)**			***P* (tempo)**
Grupo de microrganismos	**f.v.**	**f.v. + 2**	**f.v. + 4**	
MAP				
Mesofilos totais	5,69 ± 0,12	6,04 ± 0,26	5,37 ± 0,45	0,097
Psicotróficos totais	5,44 ± 0,18(ab)	5,65 ± 0,15(a)	4,95 ± 0,42(b)	0,052
Enterobacteriaceae	3,75 ± 0,63	3.61 ± 0.54	2,76 ± 0,70	0,194
Pseudomonas spp.	4,75 ± 0,02(ab)	4,95 ± 0,48(a)	3,98 ± 0,39(b)	0,034
BAL	3,51 ± 0,47	4,47 ± 0,15	3,30 ± 0,82	0,085
VAC				
Mesofilos totais	4,94 ± 0,10	4,97 ± 0,55	4,88 ± 0,66	0,971
Psicotróficos totais	4,78 ± 0,57	5,16 ± 0,59	4,66 ± 0,59	0,460
Enterobacteriaceae	3,32 ± 0,26	3,12 ± 0,25	2,15 ± 0,83	0,070
Pseudomonas spp.	3,35 ± 0,10	3,18 ± 0,24	3,16 ± 0,75	0,859
BAL	4,24 ± 0,03(a)	4,01 ± 0,19(a)	2,71 ± 0,78(b)	0,014

(a), (b) – médias, na mesma linha, seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05)

Ao nível da relação entre a aceitação sensorial e a quantidade de microrganismos no fígado de porco embalado em atmosfera modificada e em vácuo, verificamos que a multiplicação de microrganismos psicotróficos totais, *Enterobacteriaceae* e BAL não influenciaram claramente a aceitação do produto por parte dos consumidores.

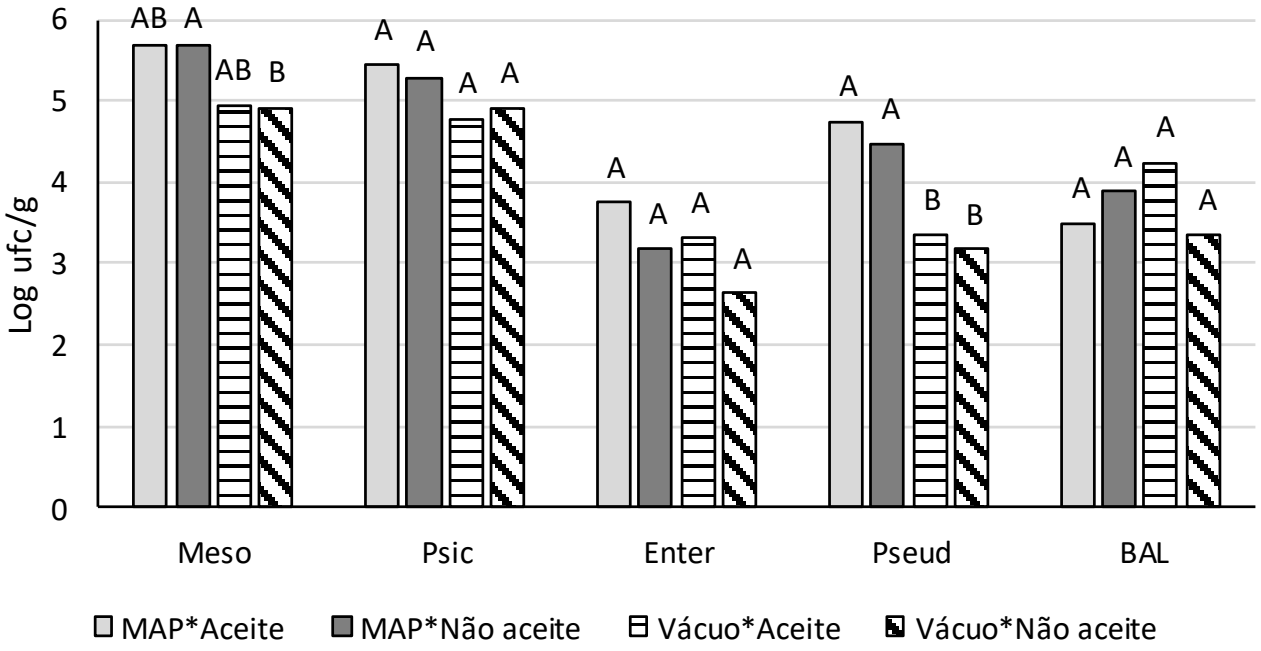

Figura 18 - Relação entre a aceitação (ao vivo com base no aspeto imagem e cheiro.) e a contagem de microrganismos em fígado de porco embalado em MAP ou em vácuo. Barras com letras diferentes, dentro de cada grupo de microrganismos, apresentam diferenças significa Meso – Microrganismos totais mesófilos, Psic - microrganismos psicotróficos totais, Enter – *Enterobacteriaceae*, Pseud – *Pseudomonas* spp., BAL – Bactérias do ácido lático.

Como se pode observar na Figura 18, as amostras de fígado aceites e não aceites têm, em muitas das circunstâncias, uma contagem similar, ou até, as não aceites uma contagem menor de microrganismos deteriorativos. Por exemplo, se nos situarmos na contagem de *Enterobacteriacea,* observa-se que, quer em MAP quer em vácuo, a contagem nas amostras não aceites é, ainda que estatisticamente semelhante ($p>0,05$), ligeiramente menor. Estes resultados sugerem que a utilização de critérios baseados na contagem de microrganismos pode ser frágil para estabelecer um prazo de validade. Para além dos fenómenos desencadeados por essa microflora deteriorativa, há aspetos relacionados com a cor dos produtos que nem sempre são influenciados pela microflora. Autores apontam como limite de contagem de microrganismos totais para definir o fim da vida útil de um alimento perecível os 6 a 8 log UFC/g. Como se pode observar neste trabalho, todas as amostras estão abaixo desse limite, e porém, muitas delas não foram aceites pelo consumidor, enquanto que outras foram.

2.2. Peito de frango

2.2.1. Evolução da aceitação pelo consumidor com base no aspeto e cheiro ao longo do armazenamento

Na avaliação da aceitação do peito de frango seguiu-se uma estratégia metodológica semelhante à utilizada com o fígado de porco. Os tempos de validade testados além da validade estabelecida pela empresa (f.v.) foram ligeiramente diferentes, e tiveram em consideração a vida útil que têm atualmente. No Quadro 15 apresentam-se os resultados médios da apreciação de frescura efetuada pelos consumidores. Na escala de cinco pontos utilizada para avaliar a frescura, onde o um correspondia ao produto pouco fresco e cinco ao produto muito fresco verificamos que o peito de frango embalado em MAP, no término da validade definida pelo fabricante (f.v.), apresenta valores que já definem um produto não fresco. Estudos semelhantes demonstram que em peito de frango embalado em atmosfera modificada não apresentam uma qualidade sensorial aceitável após 8 dias da evisceração, o que no presente estudo corresponde ao segundo tempo de análise (f.v.+3) (Chmiel e Słowiński, 2018).

Quadro 15 - Avaliação global da frescura de peito de frango embalado em atmosfera modificada e em vácuo ao longo do armazenamento além da validade estabelecida pelo fabricante (f.v.). (Média log UFC/g ± desvio-padrão, n=173 consumidores online; 44 ao vivo).

Embalagem	**Tempo (dias)**			***P* (tempo)**
MAP	**f.v.**	**f.v. + 3**	**f.v. + 6**	
Aspeto e cheiro ao vivo	2,49 ± 1,03(a)	2,04 ± 1,18(a)	1,54 ± 0,80(b)	<0,001
Aspeto online	2,65 ± 1,06(a)	2,03 ± 0,86(b)	1,43 ± 0,67(c)	<0,001
Vácuo f.v.	**f.v. + 5**	**f.v. + 10**	**f.v. + 10**	
Aspeto e cheiro ao vivo	3,61 ± 1,02(ab)	3,82 ± 1,21(a)	3,21 ± 1,04(b)	0,021
Aspeto online	3,71 ± 0,98	3,22 ± 1,06	3,18 ± 0,94	0,171

(a), (b), (c) – médias, na mesma linha, seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05)

Pode observar-se que existem diferenças altamente significativas no peito de frango embalado em atmosfera modificada. Ao nível do aspeto e do cheiro ao vivo, diferenças significativas (p<0,05) fazem-se notar entre os dois primeiros tempos de análise (f.v. e f.v.+3)

para o último tempo de análise (f.v.+6). Existe um decréscimo na avaliação da frescura, sendo que a apreciação entre o final da validade atual e após três dias não é significativamente diferente. Considerando apenas o aspeto online, todos os tempos de análise apresentam diferenças entre si, sendo que a avaliação da global da frescura tende sempre a decrescer.

No peito de frango embalado em vácuo a frescura já apresenta valores que se situam perto do quarto ponto na escala no primeiro tempo de análise (f.v.), sugerindo um produto com alguma frescura. Observa-se uma ligeira variação da avaliação global da frescura, estatisticamente não significativa. Atendendo aos resultados do inquérito online, verificamos que o tempo não teve qualquer influência no aspeto do peito de frango embalado em vácuo.

Atendendo à intenção de consumo de peito de frango embalado em atmosfera modificada (Figura 19), a percentagem de aceitação, para o primeiro tempo de análise (f.v) é de 56,9% ao vivo e 53,5% online. Após três dias do primeiro tempo de análise (f.v.+3) a percentagem de consumidores desceu consideravelmente, sendo que atendendo ao aspeto online, a percentagem de aceitação é inferior a 25%. Neste tempo, apenas 26,0% dos consumidores que participaram nas provas sensoriais ao vivo aceitavam o produto, e 16,3% dos consumidores que participaram no inquérito online aceitavam o peito de frango. No último tempo de análise (f.v.+6) apenas 7,7% aceitavam o peito de frango tendo em conta o seu aspeto e cheiro e 4,7% dos consumidores aceitavam o produto tendo em conta o seu aspeto online. Estes resultados vão de encontro com os resultados da avaliação global de frescura, uma vez que no peito de frango embalado em atmosfera modificada são observadas diferenças altamente significativas ($p<0,001$) entre os diferentes tempos para a apreciação online e ao vivo.

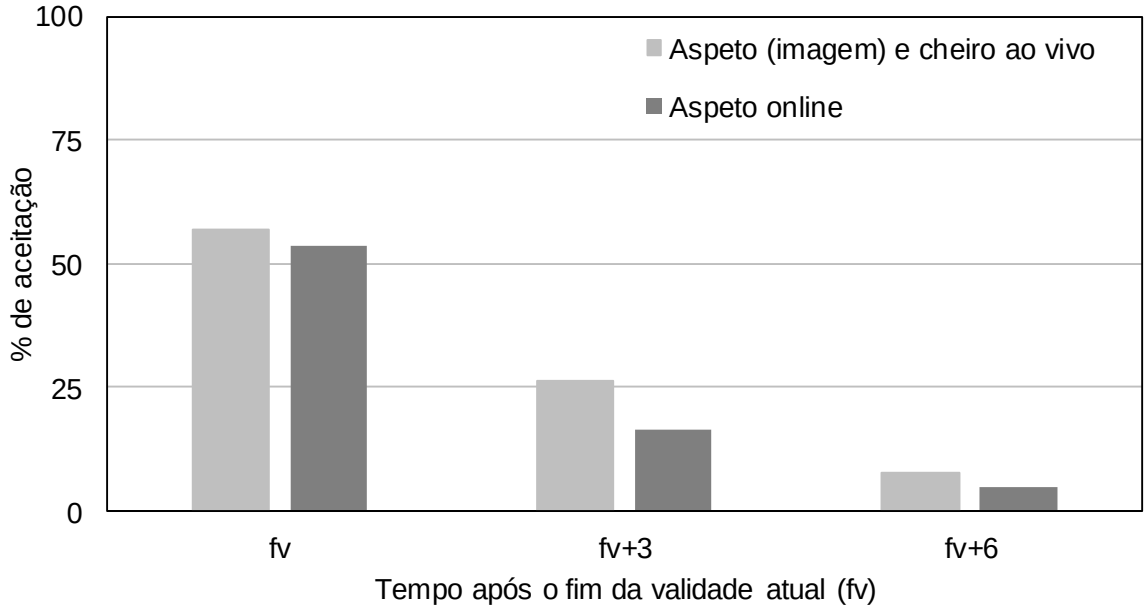

Figura 19 - Intenção de consumo de peito de frango embalado em atmosfera modificada manifestada pelos consumidores por avaliação do aspeto (fotografia) e cheiro ao vivo (n=44) e só aspeto online (n= 173) no fim da validade estabelecido pela empresa (f.v.) e em do e em dois tempos de armazenamento subsequentes, a que se acrescentou 3 e 6 dias

Ao contrário do peito de frango embalado em MAP, a intenção de consumo de peito de frango embalado em vácuo é sempre superior a 50% (Figura 20). O aspeto online em todos os tempos de análise foi sempre muito semelhante, apresentando valores de 67,4%, 66,3% e 59,3% no primeiro (f.v.), segundo (f.v.+5) e terceiro (f.v.+10) tempos de análise respetivamente. Tal também pode ser verificado através do Quadro 14 onde a avaliação global de frescura do peito de frango embalado em vácuo, a apreciação online não apresenta diferenças significativas (p>0,05). Atendendo à apreciação ao vivo (aspeto complementado com o cheiro), verificamos que nos dois primeiros tempos de análise a percentagem de aceitação é superior a 75%, correspondendo a valores de 84,3% e 80,0%. No último tempo de análise (f.v.+10), a percentagem de aceitação é de 55,8%, pelo que olhando para estes resultados poderíamos estender o prazo de validade do peito de frango embalado em vácuo por mais 10 dias.

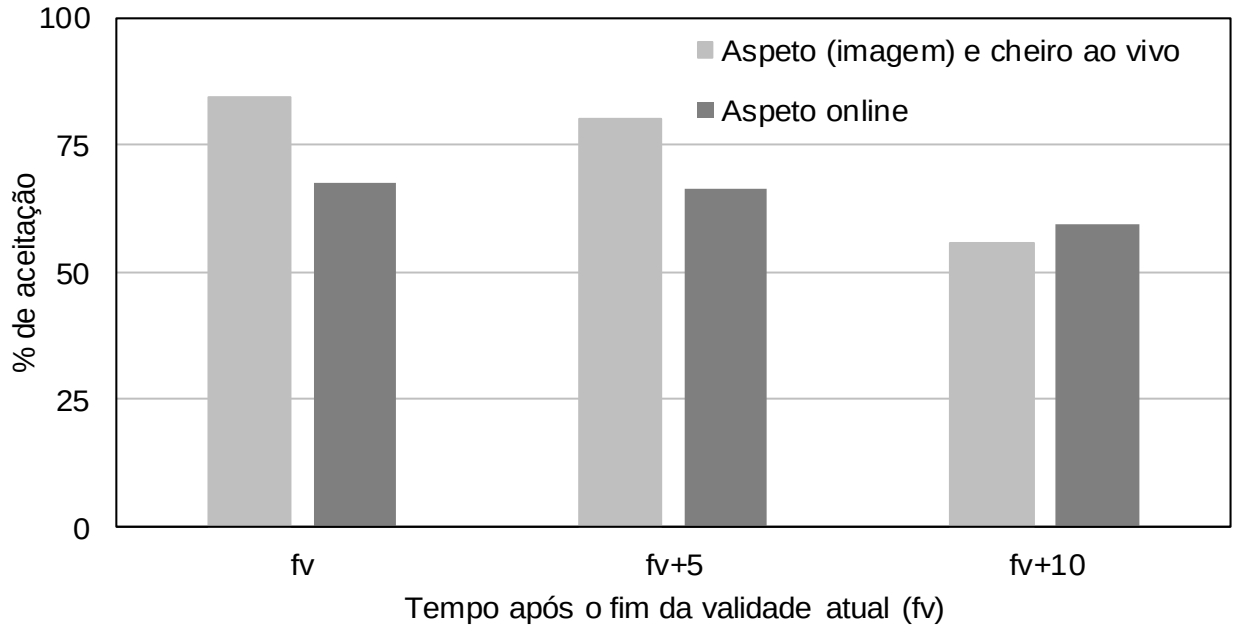

Figura 20 - Intenção de consumo de peito de frango embalado em vácuo manifestada pelos consumidores por avaliação do aspeto (fotografia) e cheiro ao vivo (n=44) e só aspeto online (n= 173) no fim da validade estabelecido pela empresa (f.v.) e em dois tempos de armazenamento subsequentes, a que se acrescentou 5 e 10 dias.

Estes resultados vão de encontro com os da avaliação global da frescura, pois referem que o peito de frango ao apresentar uma frescura na ordem dos quatro/três valores numa escala de cinco sugere uma aceitação sempre superior a 50%. Mais uma vez a conformidade com as respostas dos consumidores é evidente.

2.1.1. Evolução da microbiota e pH ao longo do armazenamento

Com o objetivo de monitorizar a evolução do pH no peito de frango, este parâmetro foi medido em três estágios do seu armazenamento (Figura 21). Semelhantemente, ao que ocorreu com o fígado de porco, também não foram registadas quaisquer diferenças significativas ao longo do tempo.

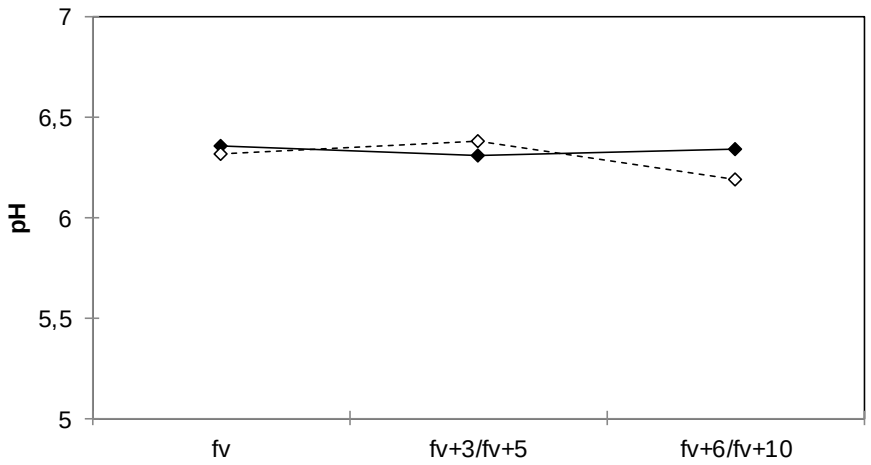

Figura 21 - Evolução do pH de peito de frango embalado em atmosfera modificada (linha contínua) ou vácuo (linha descontinua) ao longo do armazenamento além do fim da validade atual definido pela empresa (f.v.). (n=3)

Os resultados dos parâmetros microbiológicos do peito de frango embalado em atmosfera modificada e em vácuo estão expressos no Quadro 16.

Quadro 16 - Parâmetros microbiológicos de peito de frango embalado em atmosfera modificada e em vácuo. (média log UFC/g ± desvio-padrão, n=3).

Embalagem	**Tempo (dias)**			**P (tempo)**
Grupo de microrganismos	**f.v.**	**f.v. + 3**	**f.v. + 6**	
MAP				
Mesofilos totais	5,49 ± 0,47(b)	5,59 ± 0,21(b)	7,10 ± 0,48(a)	0,005
Psicotróficos totais	4,96 ± 0,19(c)	5,91 ± 0,14(b)	6,83 ± 0,53(a)	0,001
Enterobacteriaceae	3,08 ± 0,23	3,32 ± 0,21	2,76 ± 0,77	0,412
Pseudomonas spp.	4,63 ± 0,27(b)	5,53 ± 0,53(ab)	5,94 ± 0,39(a)	0,021
BAL	3,21 ± 0,40(b)	4,33 ± 0,87(ab)	5,12 ± 0,66(a)	0,036
VAC	**f.v.**	**f.v. + 5**	**f.v. + 10**	f.v. + 10
Mesofilos totais	5,02 ± 0,39(b)	7,05 ± 0,80(a)	6,42 ± 0,27(a)	0,009
Psicotróficos totais	4,96 ± 0,43(b)	6,24 ± 0,53(a)	6,24 ± 0,44(a)	0,024
Enterobacteriaceae	3,00 ± 0,14	3,74 ± 1,03	3,99 ± 0,87	0,344
Pseudomonas spp.	3,94 ± 0,42	5,01 ± 0,25	3,92 ± 0,74	0,065
BAL	4,54 ± 0,48	5,04 ± 0,35	4,76 ± 0,49	0,436

(a), (b), (c) – médias, na mesma linha, seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05)

Como se pode observar no Quadro 16, no peito de frango embalado em atmosfera modificada, verificamos que, excecionando a família *Enterobacteriaceae,* houve uma

tendência para que os últimos tempos de armazenamento apresentarem uma contagem superior ao início do estudo. O único grupo de microrganismos que não registou diferenças significativas ao longo do tempo foi o grupo *Enterobacteriaceae.* Estatisticamente, verificamos que o aumento dos microrganismos psicotróficos totais ao longo do tempo de armazenamento é muito significativo, distinguindo-se todos os tempos uns dos outros. Tal pode ser fundamentado pelo facto das BAL e *Pseudomonas* spp. serem capazes de se multiplicar a temperaturas de refrigeração, sendo que as últimas crescem a uma maior velocidade que a restante microflora (Gill, 1983). É importante referir que a atmosfera onde o peito de frango é embalado é constituída por oxigénio, dióxido de carbono e azoto nas proporções de 70%, 20% e 10% respetivamente, e a baixa quantidade de CO_2 favorece a multiplicação de *Pseudomonas* spp. (Franke *et al*., 2017). Podemos verificar também que no comportamento de BAL e *Pseudomonas* spp o primeiro tempo é estatisticamente diferente do último, sendo que o segundo tempo não difere dos restantes. Ao analisar o comportamento dos microrganismos mesofilos totais reparamos num aumento superior a uma unidade logarítmica do segundo tempo de análise (f.v.+ 3) para o último (f.v.+6).

A contagem da microflora aeróbica nos últimos tempos de análise (f.v.+3 e f.v.+6) é muito próxima ou até superior a 5,2 log UFC/g. Este valor é sugerido pela bibliografia como sendo suficiente para ser produzida uma quantidade de p-nitroanilina suficiente para causar um coloração amarelada no peito de frango, visível a olho nu (Guevara-Franco e Alonso-Calleja, 2010). Essa coloração amarelada pode estar na origem da diminuição da intenção de consumo por parte dos consumidores nos últimos tempos de análise.

No caso do peito de frango embalado em vácuo, e tal como observado nas amostras embaladas em atmosfera modificada, os microrganismos que apresentam uma evolução significativa ao longo do tempo têm contagens superiores nos tempos de análise mais avançados. As diferenças são significativas na contagem dos microrganismos mesófilos totais e na contagem dos microrganismos psicotróficos totais as diferenças são muito significativas. Em ambos os casos, existem dois grupos estatisticamente diferentes, sendo que o tempo correspondente ao fim da validade (f.v.) difere dos restantes (f.v.+5 e f.v.+10). A contagem mais elevada de mesófilos e psicotróficos totais, *Pseudomonas* spp. e BAL ocorre no segundo tempo de análise (f.v.+5) e que curiosamente corresponde ao tempo de análise que os consumidores apontaram como tendo uma maior frescura.

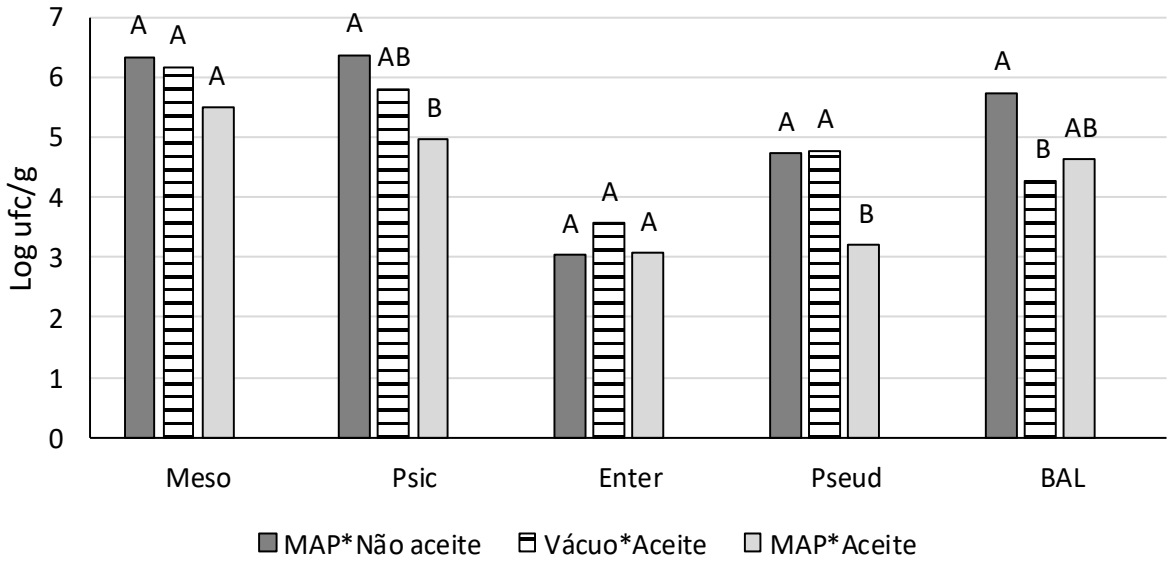

Figura 22 - Relação entre a aceitação (ao vivo com base no aspeto imagem e cheiro.) e a contagem de microrganismos em peito de frango embalado em MAP ou em vácuo. Barras com letras diferentes, dentro de cada grupo de microrganismos, apresentam diferenças significa Meso – Microrganismos totais mesófilos, Psic - microrganismos psicotróficos totais, Enter – *Enterobacteriaceae*, Pseud – *Pseudomonas* spp., BAL – Bactérias do ácido lático.

No sentido de avaliar a potencial relação entre a contagem de microrganismos e a aceitação pelo consumidor, apresenta-se na Figura 22 a contagem de cada grupo de microrganismos, comparando as amostras aceites e as não aceites. Ao contrário do observado para o fígado, no frango não há amostras não aceites embaladas em vácuo, pois mais de metade dos consumidores consideraram as amostras observadas e/ou cheiradas aptas para consumo. Ao contrário do observado com o fígado, nas amostras de frango há uma tendência para as amostras não aceites terem uma contagem de microrganismos superior, particularmente nas amostras em MAP (comparando as duas colunas cinza escuro e cinza claro). Porém, comparando as contagens das amostras em vácuo – todas aceites – com as MAP rejeitadas, observamos que a contagem de microrganismos é muito semelhante ($p>0,05$), ainda que ligeiramente inferior, exceto no caso das BAL em que a contagem é claramente inferior ($p<0,05$).

V – Conclusões

Face aos resultados do presente trabalho pode concluir-se que é possível prolongar a validade da mortadela com azeitonas, atualmente definida em 30 dias, até aos 90 dias, tendo em consideração o nível de aceitação de 50% pelos consumidores. Se for pretendida uma aceitação de 75% dos consumidores, a validade teria que ser limitada a cerca de 45 dias. O produto apresentou um ligeiro decréscimo na apreciação da frescura logo na primeira quinzena, que se fez sentir fundamentalmente na intenção de compra. Depois dos 15 dias de armazenamento, a intenção de consumo e de compra sofreu somente um decréscimo muito ténue. A apreciação global de frescura seguiu basicamente o mesmo padrão que a intenção de compra. A perda de frescura, ainda que ligeira, terá sido devida à multiplicação de BAL, que se refletiu no pH do produto. Essas modificações foram detetadas pelos consumidores como cheiro acídico ou fermentado, cheiro adocicado sabor azedo ou avinagrado. Prolongamento da validade da mortadela só é viável se forem garantidas condições de ausência de *L. monocytogenes* após a fatiagem, pois este microrganismo multiplica-se, ainda que lentamente, nas fatias embaladas em vácuo, tendo alcançado um aumento de cerca de uma unidade logarítmica ao fim de trinta dias de armazenamento.

O salpicão fatiado é atualmente comercializado com uma validade de 60 dias. No presente trabalho demonstrou-se que é possível duplicar essa validade, tendo em consideração o nível de aceitação dos consumidores de 50%. Se a empresa preferir definir a validade com base numa aceitação de 75%, a validade deveria ser definida em cerca de 90 dias. A apreciação global de frescura manteve-se sempre acima do centro da escala, tendo, como seria de esperar, apresentado uma evolução similar à da intenção de consumo e de compra. Este produto apresentou uma microbiota muito reduzida ao longo de todo o período de armazenamento, ocorrendo somente a multiplicação de BAL nos últimos tempos analisados e bolores e leveduras, ainda que estes em número reduzido. A perda de frescura do salpicão, que foi pouco percetível pelos consumidores, foi devida essencialmente à perda de aromas característicos – a curado e a fumo - o que se pode dever à adsorção de compostos aromáticos de carácter lipossolúvel no material da embalagem. Do ponto de vista da segurança sanitária, considerando a possibilidade de multiplicação de *L. monocytogenes*, o aumento do prazo de validade não se configura como representando perigo, pois quando este microrganismo foi desafiado em salpicão fatiado, observou-se que, não só não se multiplicou como veio a apresentar alguma letalidade.

A utilização do extrato de fumo na pulverização da embalagem não surtiu efeito no comportamento de *L. monocytogenes* em ambos os produtos testados, salvo exceções pontuais.

Nos produtos frescos estudados – fígado de porco e peito de frango, embalado em vácuo e em MAP, estudou-se a possibilidade de conseguir um pequeno prolongamento da validade. O fígado embalado em MAP apresentou uma redução assinalável de aceitação pelo consumidor logo dois dias após o fim da validade atual. Somente quando embalado em vácuo se vislumbra a possibilidade de conseguir um pequeno aumento de dois dias, ainda que já com uma quebra grande da aceitação, situando-se já próxima dos 50%. No mesmo sentido, o peito de frango embalado em MAP não apresenta uma aceitação pelo consumidor que sustente a possibilidade de um aumento da validade. Já no produto embalado em vácuo o alargamento da validade em 10 dias ainda resulta num produto aceitável para o consumidor.

A microbiota destes dois produtos frescos apresenta contagens dentro do habitualmente considerado aceitável para um produto desta natureza dentro da validade. Quando se cruza a informação de aceitação dos consumidores com as contagens de microrganismos deteriorativos, observou-se que há alguma independência entre a microbiota e a aceitação pelo consumidor, sugerindo que a deterioração e determinada não só pela ação microbiana, mas também por outros fenómenos que modificam o aspeto e o cheiro dos produtos.

Ambos os produtos cárneos estudados suportam bem um prolongamento do prazo de validade, tendo em consideração a aceitação pelo consumidor. Como durante o tempo de armazenamento testado no presente trabalho as amostras mantiveram-se maioritariamente aceites, não foi possível realizar a abordagem de análise de sobreviventes que se adequa à definição dos prazos de validade.

A perda de segurança sanitária durante o armazenamento prolongado pode ocorrer em mortadela se houver contaminação por *L. monocytogenes*. Em salpicão esse problema não se coloca.

Da análise global dos resultados do presente trabalho, conclui-se que a utilização de testes de consumidores é uma estratégia adequada para definir prazos de validade, e que a contagem de microrganismos deteriorativos tem uma utilidade limitada, pois é tendencialmente não relacionada com a aceitação ou não pelo consumidor.

VI - Anexos

Anexo I - Guião de entrevista para os Grupos Focais

Análise Sensorial de Salpicão e Mortadela com azeitonas com tempos de armazenamento diferentes

AMOSTRAS FATIADAS

I. Introdução (breve)

Moderador: Objetivos e orientações da entrevista (falar um de cada vez, diretamente para o computador; não há participações corretas ou incorretas – todas são úteis por muito disparatadas que possam parecer; se entenderem que outro dos respondentes disse aquilo que queriam dizer, devem repeti-lo ou referenciar que concordam com….);

Informar que a entrevista vai ser transcrita e pedir autorização aos intervenientes.

Cada respondente:

a) Nome (género implícito)
b) Idade;
c) Hábitos de consumo de chouriço ou enchidos em geral

II. Descritores para o salpicão e mortadela com azeitonas

a) Apresentar as amostras fatiadas aos respondentes;
b) Pedir para descrever cada um dos produtos – que palavras usariam para as descrever
   - prestar particular atenção às caraterísticas de deterioração.
   - Pedir para descrever (uma dimensão de cada vez para cada volta aos respondentes):
      1. Aspeto
      2. Cheiro
      3. Sabor / flavor
      4. Textura

III. Fecho

Das várias caraterísticas que analisámos no salpicão e mortadela com azeitonas, destaque as 3 que considera mais distintivos tendo em consideração as notas relacionadas com a deterioração.

Anexo II – Ficha de Prova para a mortadela com azeitonas

AMOSTRA

FICHA DE PROVA – Mortadela com Azeitonas

Nome:		
Idade:		
Profissão:		
É consumidor habitual de produtos cárneos:	Sim	Não

Para cada amostra apresentada responda ao conjunto de questões de cada caixa.

1. Pontue a frescura do produto na escala de 5 pontos.

Frescura (ausência de deterioração)	Pouco fresca		Médio		Muito fresca
	1	2	3	4	5

2. Considerando EXCLUSIVAMENTE a frescura da amostra:

Consumiria este produto no seu dia-a-dia?	Sim	Não
Compraria este produto (repetia a compra)?	Sim	Não

3. Da seguinte lista selecione os atributos que acha que se aplicam a esta amostra:

	Aspeto/Textura		Cor		Cheiro		Sabor
	Húmido		Brilhante		Noz-moscada		Salgado
	Viscosidade superficial		Rosa		Pimenta		Fécula
	Seco		Amarelado		Azeitona		Amargo
			Pálida		Especiarias		
			Baço		Acídico/fermentado		
			Acastanhada		Manteiga		
			Manchas mais claras		Adocicado		
			Manchas esverdeadas		Fermentado		
					Amoniacal		
					Ranço		
					Azedo/ácido/avinagrado		
					Bolores/odores estranhos		

Obrigada pela atenção

Anexo II – Ficha de Prova para o salpicão

AMOSTRA

FICHA DE PROVA - Salpicão

Nome:		
Idade:		
Profissão:		
É consumidor habitual de enchidos:	Sim	Não

Para cada amostra apresentada responda ao conjunto de questões de cada caixa.

1. Pontue a frescura do produto na escala de 5 pontos.

Frescura (ausência de deterioração)	Pouco fresca		Médio		Muito fresca
	1	2	3	4	5

2. Considerando EXCLUSIVAMENTE a frescura da amostra:

Consumiria este produto no seu dia-a-dia?	Sim	Não
Compraria este produto (repetia a compra)?	Sim	Não

3. Da seguinte lista selecione os atributos que acha que se aplicam a esta amostra:

	Aspeto/Textura		Cor		Cheiro		Sabor
	Húmido		Brilhante		Vinho		Salgado
	Viscosidade superficial		Curado		Alho		Vinho
	Seco		Acastanhada		Fermentado		Picante
			Baço		Fumo		Adocicado
			Manchas mais escuras		Curado		Ácido
			Manchas esverdeadas		Ranço		
					Enxofre		
					Bolores/mofo		
					Amoníaco/podre		
					Manteiga		
					Azedo/ácido/avinagrado		

Obrigada pela atenção

VII – Bibliografia

Abreu, V., Pereira, A., Freitas, E., Trevisan, M., Costa, J., e Cruz, C. (2018) “Lipid and color stability of the meat and sausages of broiler fed with calcium anacardate”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), pp. 2124–2131.

Addinsoft (2019). XLSTAT Statistical and data analysis solution. Long Island, NY, USA. https://www.xlstat.com.

Alfaro, B., M, Nuin., e B, Ibañez. (2011) “Survival analysis applied to sensory shelf-life prediction of ready to eat vegetable products”, *Italian Journal of Food Science*, 23, pp. 162–165.

Amaral, A., Silva, M., e Lannes, S. (2018) “Lipid oxidation in meat : mechanisms and protective factors – a Review”, *Journal of Food Science and Technology*, 38(1), pp. 1–15.

Araneda, M., Hough, G., e Penna, E. (2007) “Current-status survival analysis methodology applied to estimating sensory shelf life of ready-to-eat lettuce (Lactuca Sativa)”, *Journal of Sensory Studies*, 23(2), pp. 162–170.

Audenaert, K., D'Haene, K., Messens, K., Ruyssen, T., Vandamme, P., e Huys, G. (2010) “Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis”, *Food Microbiology*, 27(1), pp. 12–18.

Berdagué, J.-L., Monteil, P., Montel, M. C., e Talon, R. (1993) “Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage”, *Meat Science,* 35(3), pp. 275-287.

Berry, B. W., Rothenberg, C. A., Oblinger, J. L., Miller, W. R, Bonger, A.J. e Labots, H. (1982) “Changes in the microbiological and shelf-life characteristics of beef tonges and livers following transcontinental and transoceanic shipment”, *Meat Science*, 7(2), pp. 81–91.

Borch, E., Kant-Muermans, M., e Blixt, Y. (1996) “Bacterial spoilage of meat and cured meat products”, *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), pp. 103–120.

Boxstael, S. Van., Devlieghere, F., Berkvens, D., Vermeulen, A., e Uyttendaele, M. (2014) “Understanding and attitude regarding the shelf life labels and dates on pre-packed food products by belgian consumers”, *Food Control,* 37(1), pp. 85–92.

Buchrieser, C. (2007) “Biodiversity of the Species *Listeria monocytogenes* and the Genus Listeria”, *Microbes and Infection*, 9(10), pp. 1147–1155.

Calle, M. Luz., Hough, G., Curia, A., e Gómez, G. (2006) “Bayesian survival analysis modeling applied to sensory shelf life of foods”, *Food Quality and Preference*, 17(3–4), pp. 307–312.

Carrilha, F., e Guiné, R. (2010), “Avaliação da cor de peras secadas por dierentes métodos”, *1º Encontro Português de Secagem de Alimentos*.

Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G., Villani, F., e Ercolini, D. (2015) “Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage”, *Food Microbiology,* 45, pp. 83–102.

Cheftel, J. C. (2005) “Food and nutrition labelling in the European Union”, *Food Chemistry,* 93(3), pp. 531–550.

Chilled Food Association. (2010) “Shelf life of ready to eat food in relation to *L. monocytogenes* - Guidance for food business operators”, Chilled Food Association Ltd, Kettering, UK. Consultado em 2018. Disponível em: http://www. chilledfood.org.

Chmiel, M., e M; Słowiński. (2018) “Effect of storage in display cases on the sensory quality of chicken breast meat (M. Pectoralis)”, *Brazilian Journal of Poultry Science*, 20(1), pp. 91–98.

Corradini, M., e Peleg, M. (2007) “Shelf-life estimation from accelerated storage data”, Trends in *Food Science & Technology*, 18(1), pp. 37-47.

Demirok, A., Ranzijn, C., Lardy, J., Florquin, S., e Bouts, A. (2018) “Evaluation of the current post - transplantation Human Leukocyte Antigen antibody screening in pediatric renal transplant recipientes”, *Pediatric Transplantation,* 23(2), pp. 1–9.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., e Bakker, B. M. (2013) “The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism”, *Journal of Lipid Reserarch*, 54(9), pp. 2325–2340.

Devatkal, S., Mendiratta, S.K., Kondaiah, N., Sharma, M.C., e Anjaneyul, A.S.R. (2004) “Physicochemical, functional and microbiological quality of buffalo liver”, *Meat Science*, 68(1), pp. 79–86.

Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villan, F., e Nychas, G. (2012) “Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions”, *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), pp. 130–141.

Ducruet, V., Fournier, N., Saillard, P., Feigenbaum, A., e Guichard, E. (2001) “Influence of packaging on the aroma stability of strawberry syrup”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), pp. 2290-2297.

Dutra, M., Ramos, E., Cardoso, G., e Leal, A. (2011) “Radiação gama e tempo de armazenamento sobre a oxidação lipídica, cor objetiva, pigmentos heme e nitrito residual de mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito”, *Ciência Rural*, 41(12), pp. 2203-2209.

EFSA (2005) “Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards one request from the commission related to *Clostridium* spp in foodstuffs”, *EFSA Journal*, 3(4), pp. 1-65.

Esmerino, E., Ferraz, J., Filho, E., Pinto, L., Freitas, M., Cruz, A e Bolini, H. (2017) “Consumers’ perceptions toward 3 different fermented dairy products: insights from focus groups, word association, and projective mapping”, *Journal of Dairy Science,* 100(11), pp. 8849–8860.

FAO/WHO (2003) “Versão Portuguesa Codex Alimentarius CAC/RCP 1-1969 Rev. 4 - 2003”.

FAO (2012) “Manual on Food Packaging for Small and Medium-Size Enterprises in Samoa”, Food and Agriculture Organization of the United Nations Sub-Regional Office for the Pacific Islands, Apia.

FAO (2018) “Characteristics of packaging”. Consultado em 2018. Disponível em: http://www.fao.org/3/x5016e/X5016E03.HTM#3.

Feiner, G. (2006) *Meat products handbook: practical science and technology*. Cambridge: Wood- head Publishing.

Fernqvist, F., Spendrup, S., e Ekelund, L. (2000) “Changing consumer intake of potato, a focus group study”, *British Food Journal*, 117(1), pp. 210–221.

Flores, M. (2018) “Understanding the implications of current health trends on the aroma of wet and dry cured meat products”, *Meat Science,* 144, pp. 53–61.

Food and Drug Administration (2012) “*Bad Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*”, pp. 22–25.

Food Safety Authority of Ireland (2017) “Guidance Note - Validation of Product Shelf-Life (Revision 3)”.

Fraqueza, MJ., Patarata, L., e Laukova, A. (2016) “Protective Cultures and Bacteriocins in Fermented Meats”. Em Zdolec, N. (Ed.) *Fermented Meat Products. Health Aspects*. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton. pp. 228-269.

Fraqueza M.J. e Patarata L. (2018) “Produtos cárneos tradicionais. O regresso ao passado como caminho para o futuro”, Revista da *ACPA*, pp.36-41.

Fraqueza, MJ., Borges, A., e Patarata, L. (2018) “Strategies to reduce the formation of carcinogenic chemicals in dry cured meat products (Chapter 9)”, *Food Control and Biosecurity,* Academic Press, pp. 295-342.

Franke, C., Höll, L., Langowski, H., Petermeier, H., e Vogel, F. (2017) “Sensory evaluation of chicken breast packed in two different modified atmospheres”, *Food Packaging and Shelf Life,* 13, pp. 66–75.

Gallo, K., Swaney-Stueve, M., e Chambers, D. (2017) “A focus group approach to understanding food-related emotions with children using words and emojis”, *Journal of Sensory Studies,* 32(3), pp. 1–10.

Gámbaro, A., Ares, G., e Giménez, A. (2005) “Shelf-life estimation of apple-baby food”, *Journal of Sensory Studies,* 21(1), pp. 101–11.

Geeraerts, W., Pothakos, V., Vuystl L., e Leroy, F. (2017) “diversity of the dominant bacterial species on sliced cooked pork products at expiration date in the Belgian retail”, *Food Microbiology*, 65, pp. 236-243.

Giménez, A., Ares, F., e Ares, G. (2012) “Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches”, *Food Research International*, 49(1), pp. 311-325.

Gill, C O. (1983) “Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat”, *Journal of Food Protection*, 46(5), pp. 444-452.

Giménez, A., Gagliardi, A., e Ares, G. (2017) “Estimation of failure criteria in multivariate sensory shelf life testing using survival analysis”, *Food Research International*, 99, pp. 542-549.

Gorris, L. G. M., e Peppelenbos, H. W. (1992) “Modified atmosphere and vacuum packaging to extend the shelf life of respiring food products”, *HortTechnology*,2(3), pp. 303-309.

Gracey, J., Collins, D., e Huey, R. (1999) *Gracey’s Meat Hygiene*. 10th ed.

Gray, J., Chandry, P., Kaur, M., Kocharunchitt, C., Bowman, J., e Fox, E. (2018) “Novel biocontrol methods for *Listeria Monocytogenes* biofilms in food production facilities”, *Frontiers in Microbiology,* 9, pp. 1–12.

Grebitus, C., Jensen, H., Roosen, J., e Sebranek, J. (2013) “Fresh meat packaging: consumer acceptance of modified atmosphere packaging including carbon monoxide”, *Journal of Food Protection,* 76(1), pp. 99–107.

Guerra, S., Lagazio, C., Manzocco, L., Barnabà, M., e Cappuccio, R. (2008) “Risks and pitfalls of sensory data analysis for shelf life prediction: data simulation applied to the case of coffee”, LWT - *Food Science and Technology*, 41(10), pp. 2070–2078.

Guevara-Franco, A., e Alonso-Calleja, C. (2010) “Aminopeptidase activity by spoilage bacteria and its relationship to microbial load and sensory attributes of poultry legs during aerobic cold storage”, *Journal of Food Protection,* 73(2), pp. 322–26.

Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., e Mrita, H. (2003) “Behavior of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria isolated from spoiling cooked meat products”, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), pp. 3668–3671.

Hamlin; R. P. (2016) “The consumer testing of food package graphic design”, *British Food Journal*, 118(2), pp. 379-395.

Hawkes, C. (2010) “Food Packaging: The Medium Is the Message”, *Public Health Nutrition,* 13(2), pp. 297–299.

Hough, G. (2010) “Survival analysis applied to sensory shelf life”, *Sensory Shelf Life Estimation of Products,* pp. 83-112.

Hough, G., Langohr, K., Gómez, G., e Curia,A. (2003) “Survival analysis applied to sensory shelf life of foods”, *Journal of Food Science,* 68(1), pp. 359–362.

Hough, G., e Garitta, L. (2012) “Methodology for sensory shelf-life estimation: a review”, *Journal of Sensory Studies,* 27(3), pp. 137–147.

Irmãos Monteiro. (2015) “Irmãos Monteiro SA.” Consultado em 2017. Disponível em: http://www.irmaosmonteiro.pt/.

ISO (International Organization for Standardization) 11290-1:2014 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of Listeria spp. - Part 1: Detection method.

ISO (International Organization for Standardization) 13681, (1995) Meat and meat products. Enumeration of yeasts and moulds.

ISO (International Organization for Standardization) 4833, (1991) General guidance for the enumeration of micro-organisms. Colony count technique at 30 ºC.

ISO (International Organization for Standardization) 21528-1:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment.

Jayasingh, P., Cornforth, D.P., Brennand, C.P., Carpenter, C.E., e Whittier, D.R. (2002) "Sensory evaluation of ground beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging", *Journal of Food Science,* 67(9), pp. 3493-3496.

Jiménez, S. M., Salsi, M, S., Tiburzi, M, C., Rafaghelli, R. C., Tessi, M. A., e Coutaz, V. R. (1997) "Spoilage microflora in fresh chicken breast stored at 4°C: influence of packaging methods", *Journal of Applied Microbiology*, 83(5), pp. 613–618.

Jin, S. K., e Choi, J. S. (2017) "Effect of packaging methods on quality characteristics of fermented dry-cured hams during cold storage at 4°C", *Journal of Food Measurement and Characterization,* 11(4), pp. 2052–2060.

Kalschne, D., Womer, R., Mattana, A., Sarmento, C., Colla, L., e Colla, E. (2015) "Characterization of the Spoilage Lactic Acid Bacteria in " sliced vacuum-packed cooked ham"", *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), pp. 173–181.

Kamleh, R., Toufeili, I., Ajib, R., Kanso, B., e Haddad, J. (2012) "Estimation of the shelf-life of halloumi cheese using survival analysis", *Czech Journal of Food Sciences,* 30(6), pp. 512–519.

Kato, A., Ibrahim, H.R., Watanabe, H., Honnma, K. e Kobayashi, K. (1989) "New approach to improve the gelling and surface functional properties of dried egg white by heating in dry state", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(2), pp.433–437.

Kosowska, M., Majcher, M., e Fortuna, T. (2017) "Volatile compounds in meat and meat products", *Food Science and Technology*, 37(1), pp. 1–7.

Kreyenschmidt, J., Hubner, A., Beierle, E., Chonsch, L., Scherer, A., e Petersen, B. (2010) "Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of Lactic Acid

Bacteria in different steps of the chain" *Journal of applied microbiology,* 108(2), pp. 510–520.

Kumar, M., e Berwal, J. S. (1998) "Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*)" *Journal of Applied Microbiology,* 84(2), pp. 213-215.

Labadie, J. (2007) "Spoilage microorganisms: Risks and control*", Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing. pp. 421-426.

Leong, D., Alvarez-Ordóñez, A., Jooste, P., e Jordan, K. (2016) "*Listeria monocytogenes* in food: control by monitoring the food processing environment" *African Journal of Microbiology Research,* 10(1), pp. 1–14.

Liu, D. (2006) "Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen", *Journal of Medical Microbiology,* 55(6), pp. 645–659.

Macedo, R., Rossa, L., Nunes, L., Biasi, R., Gomes, C., Galeb, L., e Kirschnik, P. (2010) "Atmosferas modificadas para conservação de carnes frescas: tendências e aplicabilidade tecnológica do monóxido de carbono" *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, 7(4), pp. 469–482.

Maldonado-Pereira, L., Schweiss, M., Barnaba, C., e Medina-meza, I. (2018) "The role of cholesterol oxidation products in food toxicity*", Food and Chemical Toxicology,* 118, pp. 908–939.

Mantilla, S., Mano, S., Vital, H., e Franco, R. (2010) "Atmosfera modificada na conservação de alimentos", *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, 8(4), pp. 437–448.

Manzocco, L., Rumignani, A., e Lagazio, C. (2012) "Use of images in shelf life assessment of fruit salad", *Journal of Food Science*, 77(7), pp. 258–262.

Manzocco, L. (2015) "The acceptability limit in food shelf life studies", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), pp. 1640-1646.

Martins, M. (2010) "Efeito do tratamento térmico no comportamento de *Escherichia c*oli O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. e nas caraterísticas organoléticas de salpicão tradicional". Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, UTAD, 2010, pp.88.

Mcmillin, Kenneth W. (2017) "Advancements in Meat Packaging", *Meat Science,* 132, pp. 153–562.

MPI-NZG. (2016) “Guidance Document How to Determine the Shelf Life of Food”, *Industry, M. for primary* 35.

Montel, M. C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, J.-L., e Rousset-Akrim, S. (1996) “Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model”, *Food Microbiology,* 13(6), pp. 489-499.

Norma Francesa V04-503. (1988) Viandes et produits à base de viande-Dénombrement des bactéries lactiques, Paris: Association Française de Normalisation.

Norma Francesa V04-504. (1998) Meat and meat products. Enumeration of *Pseudomonas* spp. Paris: Association Française de Normalisation.

Norma Portuguesa 2307 (1987) Microbiologia alimentar: regras gerais para a contagem de microrganismos psicotróficos. Lisboa: Instituto Português da Qualidade

Notermans, S., Veld, P., Wijtzes, T., e Mead, G.C. (1993) “A user's guide to microbiological challenge testing for ensuring the safety and stability of food products”, *Food Microbiology,* 10(2), pp. 145-157.

Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., e Koutsoumanis, K. P. (2008) “Meat spoilage during distribution”, *Meat Science*, 78(1-2), pp. 77-89.

Regulamento (CE) nº 1441 de 2007 do Parlamento Europeu e do Conselho que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, *Jornal Oficial Da União Europeia L 322,* pp. 12–29.

Regulamento (CE) nº 1169 de 2011 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) nº 1924 de 2006 e (CE) nº 1925 de 2006”, *Jornal Oficial Da União Europeia L 304,* pp. 18–63.

Patarata, L. (2002) “Caracterização e avaliação da aptidão tecnológica de bactérias do ácido láctico e Micrococcaceae em produtos de salsicharia. Efeito da sua utilização em culturas de arranque e de formulação acidificante no fabrico de linguiça tradicional transmontana”, Doutoramento, UTAD.

Pennacchia, C., Ercolini, D., e Villani, F. (2009) “Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix Thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat”, *International Journal of Food Microbiology,* 134(3), pp. 230–236.

Perea-Sanz, L., Montero, R., Belloch, C., e Flores, M. (2019) “Microbial changes and aroma profile of nitrate reduced dry sausages during vacuum storage”, *Meat Science*, 147, pp. 100–107.

Pereira, J. A., Dionísio, L., Matos, T. J. S., e Patarata, L. (2015a) “Sensory lexicon development for a Portuguese cooked blood sausage - Morcela de Arroz de Monchique - to predict its usefulness for a geographical certification”, *Journal of Sensory Studies*, 30, pp. 56-67.

Pereira, J. A., Dionísio, L., Patarata, L., e Matos, T. J. S. (2015b) “Effect of packaging technology on microbiological and sensory quality of a cooked blood sausage, Morcela de Arroz, from Monchique region of Portugal” *Meat Science*, 101, pp. 33-41.

Pereira, J. A., Silva, P., Matos, T.J. e Patarata, L. (2015c) “Shelf life determination of sliced Portuguese traditional blood sausage--Morcela de Arroz de Monchique through microbiological challenge and consumer test” *Journal of Food Science, 80*(3), M642-M64.

Pereira, J.A., Ferreira-Dias, S., Dionisio, L., Patarata, L., e Matos, T. (2017) “Application of unsteady-state heat transfer equations to thermal process of Morcela de arroz from Monchique Region, a Portuguese traditional blood sausage”, *Journal of Food Processing and Preservation,* 41, e12870.

Pereira, J.A., Dionísio, L., Patarata, L., e Matos, T. (2019) “Multivariate nature of a cooked blood sausage spoilage along aerobic and vacuum package storage” *Food Packaging and Shelf Life,* 20, 100304.

Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., e Ercolini, D. (2015) “Lactic Acid Bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage”, *Meat Science*, 109, pp. 66–74.

Rahman, M. S. (2007) "Allicin and other functional active components in garlic: health benefits and bioavailability", *International Journal of Food Properties,* 10(2), pp. 245 – 268.

Richards, M., De Kock, H., e Buys, E. (2014) “Multivariate accelerated shelf-life test of low fat UHT milk”, *International Dairy Journal,* 36(1), pp. 38–45.

Rivas, T., Herrera, A., e Yanguela, J. (1992) “Microbial and organoleptic qualities of lamb liver during storage at 0 or 3ºC”, *Journal of Food Protection,* 55(11), pp. 874–79.

Robertson, Gordon L. (2009). *Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide.* CRC Press.

Stewart, D. W., e Shamdasani, P. N. (1998) “Focus group research: Exploration and discovery”, In L. Bickman & D. J. Rog (Eds.), *Handbook of applied social research methods* (pp. 505-526). Thousand Oaks, CA, US: Sage Publications, Inc.

Singh, P., Singh, T., e Gandhi, N. (2018) “Prevention of lipid oxidation in muscle foods by milk proteins and peptides : a review”, *Food Reviews International,* 34(3), pp. 226–247.

Silva, C., Silva, S., e Ribeiro, S. (2018) “Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation”, *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 594

Stolzenbach, S., Leisner, J., e Byrne, D. (2009) “Sensory shelf life determination of a processed meat product ‘rullepølse’ and microbial metabolites as potential indicators”, *Meat Science*, 83(2), pp. 285–292.

Talon R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E.H., Zanardi, E., Lanieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, L., e Laukova, A. (2011) “Microbial ecosystem of traditional dry fermented sausages in Mediterranean countries and Slovakia”, Chapter book In *Mediterranean Ecosystems: Dynamics, Management and Conservation*. Earth Sciences in the 21st Century Environmental Science, Engineering and Technology Ed. Columbus F., Nova Science Publishers Inc.. Editors: Gina S. Williams ISBN: 978-1-61209-146-4.

Teixeira, J., Repková, L.,, Gänzle, M., e Mcmullen, L. (2018) “Effect of pressure, reconstituted RTE meat microbiota, and antimicrobials on survival and post-pressure growth of *Listeria monocytogenes* on ham bacterial strains and growth conditions”, *Frontiers in Microbiology,* 9, pp. 1–11.

Tompkin, R B. (2002) “Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment”, *Journal of Food Protection,* 65(4), pp. 709–725.

Torrieri, E., Monaco, R. Di., Cavella, S., e Masi, P. (2008) “Fresh-cut annurca apples: acceptability study and shelf-life determination”, *Journal of Sensory Studies,* 23(3), pp. 377–397.

Veld, H. (1996) “Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview”, *International Journal of Food Microbiology,* 33(1), pp. 1-18.

Vestergaard E. M. (2001) “Building product confidence with challenge studies”, *Dairy Food Environmental Sanitation,* 21(3), pp. 206-209.

Wang, J., Zhang, M., Gao, Z e Adhikari, B. (2018) “Smart storage technologies applied to fresh foods : a review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(16), pp. 2689-2699.

Yang, Y., Zhang, X., Wang, Y., Pan, D., Sun, Y., e Cao, J. (2017) “Study on the volatile compounds generated from lipid oxidation of chinese bacon (unsmoked) during processing”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(10), 1600512.

Zhou, G. H., Xu, X. L., e Liu, Y. (2010) “Preservation technologies for fresh meat – a review”, *Meat Science*, 86(1), pp. 119–128.