

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Influência da substituição de sal por *Salicornia ramosissima* e da adição de extrato de acerola (*Malpighia emarginata*) na conservação de hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Gonçalo Gomes Pinheiro e Melo

**Orientadora**

Professora Doutora Cristina Maria Teixeira Saraiva

**Coorientador**

Professor Doutor Humberto Rocha



Vila Real, 2019



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Influência da substituição de sal por *Salicornia ramosissima* e da adição de extrato de acerola (*Malpighia emarginata*) na conservação de hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Gonçalo Gomes Pinheiro e Melo

**Orientadora**

Professora Doutora Cristina Maria Teixeira Saraiva

**Coorientadores**

Professor Doutor Humberto Rocha

**Composição do Júri:**

Professor Doutor Dario Loureiro dos Santos

Professora Doutora Alexandra Sofia Miguens Fidalgo Esteves

Professor Doutor Francisco José de Vasconcelos L. Vieira e Brito

Professora Doutora Cristina Maria Teixeira Saraiva

Vila Real, 2019



**Este trabalho é uma obra original elaborada para a obtenção do grau de Mestre em  
Medicina Veterinária.**



## **Agradecimentos**

Quero agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na concretização desta tão importante etapa da minha vida, um especial obrigado:

Aos meus pais e ao meu irmão que sem eles este percurso teria sido impossível de concretizar;

À Professora Doutora Cristina Saraiva e ao Professor Doutor Humberto Rocha pela excelente orientação, por todo o tempo despendido e apoio incondicional ao longo da concretização deste trabalho;

À Professora Doutora Alexandra Esteves, à Professora Doutora Ângela Martins, ao Professor Doutor António Silva, à Professora Doutora Conceição Fontes e ao Professor Doutor Luís Patarata, por toda a disponibilidade e apoio demonstrados;

Ao Engenheiro Paulo Silva, ao Sr. José Manuel Ferreira por todo o conhecimento transmitido, ensinamentos e paciência;

À D. Ana Leite e à D. Helena Santos pela ajuda imprescindível, pela amizade e o encorajamento;

Aos meus colegas de laboratório Madalena Faria, Márcio Moura- Alves e Patrícia Pinto por todo o companheirismo e cooperação;

À Formulab, LDA por todo o material cedido para a realização deste trabalho

À Horta da Ria, LDA representada pelo Sr. Júlio Coelho pela Salicórnica gentilmente cedida para a realização deste trabalho;

À Promert Agrupamento de Produtores de Bovinos Mertolengos S.A. pela disponibilização da carne de Bovino utilizada nos ensaios, na pessoa do Presidente do Conselho de Administração Sr. Eduardo Mira Cruz;

A todos os meus amigos que fizeram deste percurso uma experiência extraordinária, inesquecível e que nunca me deixaram desistir, em especial à Ana Lopes, à Beatriz Cruz, ao Eduardo Almeida, à Joana Magalhães e à Melissa Silva.



## Resumo

O presente trabalho visa avaliar os efeitos da adição de *Salicornia ramosissima* em pó e da adição de *Malpighia emarginata* (acerola) em forma de extrato nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.

A carne de raça Mertolenga D.O.P. (n=3) foi transportada para o laboratório de Tecnologia Qualidade e Segurança Alimentar (TeQSA) da UTAD e produziram-se hambúrgueres (com 20g) de bovino Mertolengo D.O.P., divididos de acordo com as seguintes condições: controlo (apenas carne picada formatada), com sal (sal a 1%), com acerola (sal 1% e extrato de acerola a 0,3%), com salicórnia (1%, 1,5% e 2%). Os hambúrgueres foram embalados individualmente em atmosfera modificada (70% O<sub>2</sub> e 30% CO<sub>2</sub>), armazenados a 2°C e as amostras analisadas no dia 1, 3, 5, 7, e 10. Foi realizada a contagem e identificação de microrganismos, determinação do pH, da atividade da água, da cor (CIE-lab) e análise sensorial. Os microrganismos quantificados foram mesófilos totais, psicrotróficos totais, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, BAL, fungos. Foi ainda efetuada a pesquisa e contagem de *Salmonella* spp., *E.coli* e *Listeria monocytogenes* nas amostras no 1º dia de armazenamento.

A *Salicornia ramosissima* adicionada a 1% diminuiu o cheiro a deteriorado no último tempo analisado quando em comparação com o controlo (p<0,05). Todas as amostras com salicórnia adicionada diminuíram a a<sub>w</sub> em relação ao controlo. Por outro lado, a adição de salicórnia causou um impacto negativo acrescido no parâmetro a (p<0,001) e na avaliação por parte do painel de avaliadores que considerou as amostras com salicórnia com uma cor mais escura quando comparada com o controlo (p<0,001). Por outro lado, *Malpighia emarginata* demonstrou melhoria na análise sensorial, particularmente na estabilidade da cor, na apreciação global de frescura e na diminuição do cheiro a deteriorado, em particular no último tempo em análise, onde mostrou diferenças significativas quando comparada com o controlo (p<0,01). Considera-se que a *Malpighia emarginata* aumentou a vida útil das amostras em um dia quando comparado com o controlo. Não se observaram diferenças significativas em relação ao efeito nos microrganismos analisados nas várias condições em estudo.

**Palavras-chave:** hambúrguer, *shelf life*, qualidade objetiva da carne fresca, salicórnia, acerola, substâncias naturais.



## Abstract

The present work aims to verify the effects of the addition of *Salicornia ramosissima* powder and the addition of *Malpighia emarginata* (acerola) in the form of extract as on microbiological, physicochemical and sensory characteristics in Mertolenga D.O.P. hamburgers.

The Mertolenga D.O.P. beef (n = 3) was transported to UTAD's Laboratory of Quality and Food Safety (TeQSA) and hamburgers (with 20g) were produced, divided according to the following conditions: control (only formatted minced meat), salt (1% salt), acerola (1% salt and 0.3% acerola extract), salicornia (1%, 1.5% and 2%). The burgers were individually packed in a modified atmosphere (70% O<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub>), stored at 2°C and samples analyzed on days 1, 3, 5, 7, and 10. Microorganism identification and counting, pH determination, water activity measurement, instrumental color (CIE-lab) and sensory analysis were performed. The microorganisms tested were mesophilic and psychrotrophic populations, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, BAL, fungi. The identification and counting of *Salmonella* spp., *E. coli* and *Listeria monocytogenes* in the samples on the 1st day of storage were also carried out.

*Salicornia ramosissima* added to 1% decreased the deteriorated smell in the last analyzed time when compared to the control (p > 0.05). All samples with Salicornia added decreased a<sub>w</sub> compared to the control. On the other hand, the addition of Salicornia caused a negative impact in parameter a (p < 0.001) and the sensorial analysis panel determine that samples with Salicornia had a darker color when compared with the control (p < 0.001). On the other hand, *Malpighia emarginata* showed improvement in the sensory analysis, particularly in the color stability, overall freshness rating and in the decrease of deteriorated smell, in the last time in analysis where it showed significant differences when compared with the control (p < 0.01). It is considered that *Malpighia emarginata* increase shelf life by one day compared to the control.

No significant differences were observed in relation to the effect on the microorganisms analyzed in the various conditions under study.

**Key-words:** hamburger, shelf life, objective quality of fresh meat, salicornia, acerola, natural substances.



## Índice Geral

CAPÍTULO I – Introdução .....	1
1.1 Enquadramento temático.....	3
1.2 Caraterísticas da carne de raça Mertolenga D.O.P.....	4
1.3 Deterioração da carne.....	6
1.3.1 Deterioração química .....	7
1.3.2. Deterioração microbiana .....	9
1.4 Fatores envolvidos na deterioração .....	12
1.4.1 Principal microbiota da carne.....	12
1.4.1.1 Microrganismos mesófilos totais .....	12
1.4.1.2 Microrganismos psicrotróficos totais .....	13
1.4.1.3 Enterobacteriaceae .....	14
1.4.1.4. <i>Pseudomonas</i> spp. ....	15
1.4.1.5 Bactérias do ácido láctico .....	16
1.4.1.6 <i>Brochothrix thermosphacta</i> .....	16
1.4.1.7 Fungos .....	17
1.4.1.7.1 Bolores .....	18
1.4.1.7.2 Leveduras .....	18
1.4.2. Características físico-químicas.....	19
1.4.2.1 Cor.....	19
1.4.2.2 pH.....	21
1.4.2.3 Atividade da água.....	23
1.5 Análise sensorial .....	24
1.6 Técnicas para aumentar a vida útil de produtos alimentares.....	25
1.6.1 Controlo da temperatura.....	27
1.6.2 Embalagem em atmosfera modificada .....	29
1.6.3 Aditivos .....	32
1.6.3.1 Reguladores de acidez.....	32
1.6.3.1.1 Ácido acético e seus sais .....	33
1.6.3.1.2 Ácido láctico e seus sais.....	33
1.6.3.2 Antioxidantes .....	33
1.6.3.2.1 Ácido ascórbico e seus sais .....	34
1.6.3.2.2 Ácido cítrico e seus sais .....	34

1.6.4 Sal.....	35
1.7 <i>Salicornia ramosissima</i> .....	36
1.8 <i>Malpighia ermaginata</i> .....	38
CAPÍTULO II - Objetivos.....	41
CAPÍTULO III - Material e Métodos .....	43
3.1 Preparação, embalagem, armazenamento e processamento das amostras .....	45
3.2 Análise microbiológica .....	47
3.2.1 Normas de enumeração microbiológica.....	48
3.2.1.1 Isolamento e contagem de microrganismos mesófilos (aeróbios totais a 30°C) .....	48
3.2.1.2 Isolamento e contagem de microrganismos psicrotróficos (aeróbios totais a 7°C).....	48
3.2.1.3 Isolamento e contagem de Enterobacteriaceae.....	48
3.2.1.4 Isolamento e contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	49
3.2.1.5 Isolamento e contagem de <i>Brochotrix thermosphacta</i> .....	49
3.2.1.6 Isolamento e Contagem de Bactérias do ácido láctico.....	49
3.2.1.7 Isolamento e contagem de Fungos (bolores e leveduras).....	50
3.2.1.8 Isolamento e contagem de <i>Salmonella</i> spp. ....	50
3.2.9 Isolamento e contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	50
3.3 Análises físico-químicas .....	51
3.3.1 pH.....	51
3.3.2 Atividade da água.....	51
3.3.3 Cor instrumental.....	51
3.4 Análise Sensorial.....	52
3.5 Análise de dados.....	53
CAPÍTULO IV - Resultados e Discussão .....	55
4.1 Determinações microbiológicas .....	57
4.1.1 Determinações microbiológicas da carne fresca de bovino Mertolengo D.O.P.....	57
4.1.2 Determinações microbiológicas nos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P. 58	
4.1.2.1 Mesófilos.....	58
4.1.2.1.1 Acerola .....	58
4.1.2.1.2 Salicórnia.....	59
4.1.2.2 Psicrotróficos.....	61
4.1.2.2.1 Acerola .....	61
4.1.2.2.2 Salicórnia.....	62

4.1.2.3 Enterobacteriaceae .....	64
4.1.2.3.1 Acerola .....	64
4.1.2.3.2 Salicórnia.....	65
4.1.2.4 <i>Pseudomonas</i> spp .....	67
4.1.2.4.1 Acerola .....	67
4.1.2.4.2 Salicórnia.....	68
4.1.2.5 <i>Brochotrix thermosphacta</i> .....	69
4.1.2.5.1 Acerola .....	70
4.1.2.5.2 Salicórnia.....	71
4.1.2.6 Bactérias do ácido láctico .....	73
4.1.2.6.1 Acerola .....	73
4.1.2.6.2 Salicórnia.....	74
4.1.2.7 Fungos .....	76
4.1.2.7.1 Acerola .....	76
4.1.2.7.2 Salicórnia.....	77
4.1.3 Análise sumária das variáveis microbiológicas .....	79
4.2 Determinações físico-químicas nos hambúrgues de bovino Mertolengo D.O.P. ....	81
4.2.1 pH.....	81
4.2.1.1 Acerola .....	81
4.2.1.2 Salicórnia.....	83
4.2.2 Atividade da água.....	84
4.2.2.1 Acerola .....	84
4.2.2.2 Salicórnia.....	86
4.2.3 Coordenadas de cor CIE-L*a*b* .....	87
4.2.3.1 Parâmetro L* .....	88
4.2.3.1.1 Acerola .....	88
4.2.3.1.2 Salicórnia.....	89
4.2.3.2 Parâmetro a*.....	91
4.2.3.2.1 Acerola .....	91
4.2.3.2.1 Salicórnia.....	92
4.2.3.3 Parâmetro b* .....	94
4.2.3.3.1 Acerola .....	94
4.2.3.3.1 Salicórnia.....	96
4.3 Análise sensorial .....	97

4.3.1 Cor.....	97
4.3.1.1 Acerola .....	97
4.3.1.2 Salicórnia.....	99
4.3.2 Cheiro a deteriorado .....	101
4.3.2.1 Acerola .....	101
4.3.2.2 Salicórnia.....	103
4.3.3 Avaliação global de frescura .....	104
4.3.3.1 Acerola .....	105
4.3.3.2 Salicórnia.....	106
4.4. Correlação de Pearson.....	108
CAPÍTULO V – Conclusão .....	111
CAPÍTULO VI - Referências Bibliográfica.....	115
CAPÍTULO VII – Anexos .....	125

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Associação de microrganismos dominantes em carne fresca armazenada a 0-4°C sob diferentes atmosferas de gás adaptado de NYCHAS <i>et al</i> (2008).....	31
<b>Tabela 2:</b> Planeamento experimental do efeito da acerola em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P. ....	45
<b>Tabela 3:</b> Planeamento experimental do efeito da salicórnia em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P. ....	466
<b>Tabela 4:</b> Contagens de microrganismos (média e desvio padrão) em carne fresca de bovino D.O.P. embalada a vácuo. ....	57
<b>Tabela 5:</b> Contagens de microrganismos mesófilos totais (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	59
<b>Tabela 6:</b> Contagens de microrganismos mesófilos totais (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	60
<b>Tabela 7:</b> Contagens de microrganismos psicrotróficos totais (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	62
<b>Tabela 8:</b> Contagens de microrganismos psicrotróficos totais (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	63
<b>Tabela 9:</b> Contagens de Enterobacteriaceae (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	65
<b>Tabela 10:</b> Contagens de Enterobacteriaceae (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	66
<b>Tabela 11:</b> Contagens de <i>Pseudomonas</i> spp. (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	68

<b>Tabela 12:</b> Contagens de <i>Pseudomonas</i> spp (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	69
<b>Tabela 13:</b> Contagens de <i>Brochotrix thermosphacta</i> . (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	71
<b>Tabela 14:</b> Contagens de <i>Brochotrix thermosphacta</i> . (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	72
<b>Tabela 15:</b> Contagens de BAL (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	74
<b>Tabela 16:</b> Contagens de BAL (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	75
<b>Tabela 17:</b> Contagens de fungos (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	77
<b>Tabela 18:</b> Contagens de fungos (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	78
<b>Tabela 19:</b> Valores de pH (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. .	82
<b>Tabela 20:</b> Valores de pH (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. .	84
<b>Tabela 21:</b> Valores de $a_w$ (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. .	85
<b>Tabela 22:</b> Valores de $a_w$ (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. .	87
<b>Tabela 23:</b> Valores do parâmetro $L^*$ (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	89

<b>Tabela 24:</b> Valores do parâmetro L* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	90
<b>Tabela 25:</b> Valores do parâmetro a* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	92
<b>Tabela 26:</b> Valores do parâmetro a* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	94
<b>Tabela 27:</b> Valores do parâmetro b* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	95
<b>Tabela 28:</b> Valores do parâmetro b* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	97
<b>Tabela 29:</b> Cor vermelha e castanha observada (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	99
<b>Tabela 30:</b> Cor vermelha e castanha observada (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	101
<b>Tabela 31:</b> Cheiro a deteriorado (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	103
<b>Tabela 32:</b> Cheiro a deteriorado (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	104
<b>Tabela 33:</b> Avaliação global de frescura (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	106
<b>Tabela 34:</b> Avaliação global de frescura (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo. ....	108

<b>Tabela 35:</b> Correlação de Person das amostras analisadas em relação a todos os parâmetros em estudo.....	110
--	-----

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Touro Mertolengo. Pelagem Rosilho ou Mil Flores ( <a href="http://www.mertolenga.com/">http://www.mertolenga.com/</a> , 2015).....	5
<b>Figura 2:</b> Os efeitos do estado redox da mioglobina, ligantes e valência do ferro na cor da superfície do músculo post-mortem. (MANCINI, 2005).....	20
<b>Figura 3:</b> <i>Salicornia ramosissima</i> na ria de Aveiro ( <a href="http://www.ilha.ilhadospuxadoiros.pt/galeria.aspx">http://www.ilha.ilhadospuxadoiros.pt/galeria.aspx</a> ) .....	38
<b>Figura 4:</b> Árvore e fruto <i>Malpighia emarginata</i> ( <a href="https://ntbg.org/database/plants/detail/malpighia-emarginata">https://ntbg.org/database/plants/detail/malpighia-emarginata</a> ).....	39
<b>Figura 5:</b> Gráfico da evolução das contagens de microrganismos mesófilos totais das amostras controlo, sal e acerola.....	58
<b>Figura 6:</b> Gráfico da evolução das contagens de microrganismos mesófilos totais das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. .....	60
<b>Figura 7:</b> Gráfico da evolução das contagens de microrganismos psicrotróficos totais das amostras controlo, sal e acerola.....	61
<b>Figura 8:</b> Gráfico da evolução das contagens de microrganismos psicrotróficos totais das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. .....	63
<b>Figura 9:</b> Gráfico da evolução das contagens de Enterobacteriaceae das amostras controlo, sal e acerola.....	64
<b>Figura 10:</b> Gráfico da evolução das contagens de Enterobacteriaceae das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%......	66
<b>Figura 11:</b> Gráfico da evolução das contagens de <i>Pseudomonas</i> spp. das amostras controlo, sal e acerola. ....	67
<b>Figura 12:</b> Gráfico da evolução das contagens de <i>Pseudomonas</i> spp das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%......	69
<b>Figura 13:</b> Gráfico da evolução das contagens de <i>Brochotrix thermosphacta</i> das amostras controlo, sal e acerola.....	70
<b>Figura 14:</b> Gráfico da evolução das contagens de <i>Brochotrix thermosphacta</i> das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. .....	72
<b>Figura 15:</b> Gráfico da evolução das contagens de BAL das amostras controlo, sal e acerola. .....	73

<b>Figura 16:</b> Gráfico da evolução das contagens de BAL das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.....	75
<b>Figura 17:</b> Gráfico da evolução das contagens de fungos das amostras controlo, sal e acerola. ....	76
<b>Figura 18:</b> Gráfico da evolução das contagens de fungos das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. ....	78
<b>Figura 19:</b> Gráficos da evolução dos microrganismos analisados de acordo com a condição. ....	80
<b>Figura 20:</b> Gráfico da evolução do pH das amostras controlo, sal e acerola. ....	82
<b>Figura 21:</b> Gráfico da evolução do pH das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. ....	83
<b>Figura 22:</b> Gráfico da evolução da $a_w$ das amostras controlo, sal e acerola. ....	85
<b>Figura 23:</b> Gráfico da evolução da $a_w$ das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. ....	86
<b>Figura 24:</b> Gráfico da evolução do parâmetro $L^*$ das amostras controlo, sal e acerola.	88
<b>Figura 25:</b> Gráfico da evolução do parâmetro $L^*$ das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. ....	90
<b>Figura 26:</b> Gráfico da evolução do parâmetro $a^*$ das amostras controlo, sal e acerola.	91
<b>Figura 27:</b> Gráfico da evolução do parâmetro $a^*$ das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. ....	93
<b>Figura 28:</b> Gráfico da evolução do parâmetro $b^*$ das amostras controlo, sal e acerola.	95
<b>Figura 29:</b> Gráfico da evolução do parâmetro $b$ das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. ....	96
<b>Figura 30:</b> Gráfico da evolução da cor observada das amostras controlo, sal e acerola.	98
<b>Figura 31:</b> Gráfico da evolução da cor observada das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. ....	100
<b>Figura 32:</b> Gráfico da evolução do cheiro a deteriorado nas amostras controlo, sal e acerola. ....	102
<b>Figura 33:</b> Gráfico da evolução do cheiro a deteriorado nas amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.....	103
<b>Figura 34:</b> Gráfico da evolução da avaliação global de frescura das amostras controlo, sal e acerola. ....	105

**Figura 35:** Gráfico da evolução da avaliação global de frescura das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. ..... 107



## **Lista de Abreviaturas**

**AGF** - Apreciação global de frescura

**a<sub>w</sub>** - Atividade da água

**BAL** - Bactérias do ácido lático

**Esc.** – Escurecimento

**Int.** - Intensidade

**MAP** - Embalagem de atmosfera modificada

**Salic. 1%** - Salicórnia a 1%

**Salic. 1,5%** - Salicórnia a 1,5%

**Salic. 2 %** - Salicórnia a 2%

**Sig.** – Significância

**Ufc** – Unidades formadoras de colónias



# **CAPÍTULO I – Introdução**



## 1.1 Enquadramento temático

A carne é a principal fonte de proteína de alto valor biológico na alimentação humana, com uma tendência para o aumento do consumo em termos globais, apesar de se observar uma diminuição em vários países europeus (European Environmental Agency, 2018). Assim, é importante garantir a segurança e qualidade da carne e seus produtos.

A carne picada e seus derivados como preparados de carne picada incluindo a carne picada para *burguer meat* são produtos muito procurados pelo consumidor atual, devido à sua qualidade nutricional e facilidade de preparação. No entanto estes produtos são submetidos a um processo de picagem, pelo que ocorre um aumento significativo da área de superfície exposta ao ambiente externo, havendo um maior risco de contaminação e ocorrência de processos deteriorativos, levando à diminuição do tempo de vida útil em comparação a carne fresca (LIMBO *et al.*, 2010).

Segundo o Regulamento (CE) nº 853/2004 do Parlamento Europeu, os preparados de carne correspondem a “carne fresca, incluindo carne que tenha sido reduzida a fragmentos, a que foram adicionados outros géneros alimentícios, condimentos ou aditivos ou que foi submetida a um processamento insuficiente para alterar a estrutura das suas fibras musculares e eliminar assim as características de carne fresca”, incluindo-se nesta definição hambúrgueres, almondegas e outros produtos similares.

Para atender às exigências do mercado, reguladores e produtores concentram-se no desenvolvimento de sistemas de garantia de segurança e prevenção de risco através do controlo, monitorização e registo de parâmetros críticos ao longo de todo o ciclo de vida dos produtos. Estes sistemas incluem produção primária e estendem-se idealmente até ao consumidor final. O controlo sistemático da segurança de produtos cárneos via HACCP inclui seleção de matérias-primas, controlo das condições durante o processamento e distribuição.

Com o intuito de aumentar a segurança alimentar e o tempo de prateleira (*shelf life*) destes produtos, é necessário adotar estratégias para minimizar a multiplicação de microrganismos patogénicos e deteriorativos, bem como retardar ou inibir a deterioração química. Para tal podem ser adotadas diversas medidas ou metodologias, no entanto, a utilização de aditivos em carnes e produtos transformados é uma estratégia-chave na sua conservação, sendo um dos métodos mais difundidos, juntamente com o controlo da temperatura e a manipulação da atmosfera que envolve o alimento (LAMBERT *et al.*, 1991; SALLAM e SAMEJIMA, 2004).

O consumidor atual dá cada vez mais importância a produtos alimentares mais naturais, começando a excluir os aditivos de síntese, e procurar alternativas ao modelo atualmente utilizado na indústria alimentar. Há uma percepção crescente de que os ingredientes de origem natural têm menor impacto negativo na saúde e, por estas razões, existe a necessidade de pesquisar ingredientes naturais que possam ter um impacto positivo quando adicionados aos produtos alimentares (WANG *et al.*, 2008).

O presente trabalho pretende verificar se o “sal verde” (*Salicornia ramosissima*) e o extrato de acerola (*Malpighia emarginata*), são opções viáveis como aditivos de origem natural e se estes apresentam um impacto positivo na qualidade e segurança de hambúrgueres de carne de bovino.

A necessidade crescente de valorizar os produtos de origem nacional vem ao encontro da utilização de carne Mertolenga D.O.P. (denominação de origem protegida) na realização do presente trabalho. É uma carne obtida a partir de bovinos da raça Mertolenga, cujo solar da raça é a região do Ribatejo e Alentejo. É uma raça exclusivamente criada em território Português.

## **1.2 Características da carne de raça Mertolenga D.O.P.**

A raça Mertolenga D.O.P. proveniente de Mértola e de Alcoutim, sendo que a área geográfica de produção da raça Mertolenga D.O.P. abrange os distritos de Beja, Évora, Portalegre, Santarém e Setúbal. A produção tem vindo a contribuir para o rendimento da população local, o que por sua vez tem contribuído para a preservação da raça. A produção é feita em regime extensivo, com uma elevada percentagem de forragem na alimentação dos animais (DGADR, 2012).



Figura 1: Touro Mertolengo. Pelagem Rosilho ou Mil Flores (<http://www.mertolenga.com/>, 2015)

A carne da raça Mertolenga D.O.P. pode apresentar-se como carne de vitela, quando os animais são abatidos entre os 6 e os 10 meses de idade (peso entre 90 e 120 kg), vitelão, se o abate for entre os 10 e os 15 meses de idade, ou novilho, quando são abatidos entre os 15 e os 30 meses (peso máximo de 180 kg) (DGADR, 2012).

O peso médio ao desmame (210 dias) dos animais puros e cruzados é de  $171.1 \pm 39.9$  kg. O rendimento médio após desmancha é de  $74.6 \pm 2.6$  % (Associação de Criadores de Bovinos Mertolengos, 2008).

O ganho médio diário é de  $936 \pm 188$  g/ dia e o índice de conversão médio é de  $6.18 \pm 1.22$  kg de concentrado por 1 kg de ganho de peso (Associação de Criadores de Bovinos Mertolengos, 2008).

A gordura apresenta coloração branca (vitela) a amarela (adulto), é não exsudativa e firme. A carne é rosa escura a vermelha escura, com pH inferior a 6 (DGADR, 2012).

São passíveis de certificação as carcaças inteiras, hemicarcaças ou quartos, peças embaladas em vácuo, cuvetes e carnes elaboradas (DGADR, 2012).

A criação de animais em regime extensivo apresenta uma pegada ecológica maior se medida em Kg de gases de estufa produzidos por Kg de produto final e menor se medida em área por Kg de emissão de gás. Por outro lado, o impacto ecológico dos regimes extensivos tende a ser menor, havendo uma integração nos ecossistemas locais e benefícios a longo prazo para a fauna e flora local, bem como uma menor produção de outros tipos de poluição, incluindo a do solo e a das águas (GARNETT, 2010).

### 1.3 Deterioração da carne

O Regulamento (CE) nº 853/2004 do Parlamento Europeu define carne fresca como “carne não submetida a qualquer processo de preservação que não a refrigeração, a congelação ou a ultracongelação, incluindo carne embalada em vácuo ou em atmosfera controlada.”

A deterioração da carne é um processo que tem início imediatamente após o abate do animal e que dificilmente é interrompido na totalidade, podendo, no entanto, ser retardado. Define-se deterioração como o conjunto de reações físicas e químicas a que a carne está sujeita, seja por ação microbiológica, fisiológica ou ambiental, e que vai conduzir à alteração das suas propriedades. A deterioração da carne nem sempre é evidente e é normalmente perceptível pelos consumidores quando ocorre descoloração ou alteração da cor e a presença de odores desagradáveis. Estes fatores constituem os principais critérios qualitativos para a rejeição de carne. Em geral, a deterioração corresponde a um julgamento subjetivo do consumidor, que pode ser influenciado por considerações culturais e económicas (LAMBERT *et al.*, 1991; GRAM *et al.*, 2002).

Em termos químicos, a carne é composta por quatro componentes principais – água, proteína, lípidos e hidratos de carbono – e vários microcomponentes – vitaminas, enzimas, pigmentos e compostos aromáticos. A proporção relativa destes componentes é o que confere à carne estrutura, textura, sabor, cor e valor nutritivo característicos (LAMBERT *et al.* 1991).

Vários fatores contribuem para a alteração das propriedades da carne e, portanto, para a deterioração da mesma, nomeadamente temperatura de conservação, concentração de oxigénio, enzimas intrínsecas, atividade da água, luz e, acima de tudo, presença de microrganismos. Apesar de se poder observar deterioração na ausência de microrganismos (por ação das enzimas intrínsecas e da oxidação lipídica), a sua multiplicação é o principal fator no que concerne à deterioração da qualidade da carne. Grande parte das medidas para prevenção ou diminuição da deterioração tem como objetivo diminuir a carga microbiana ou inibir a multiplicação dos microrganismos presentes (DOULGERAKI *et al.*, 2012; NYCHAS *et al.*, 2008).

Como referido anteriormente a carne picada é mais propensa à deterioração e tem consequentemente um tempo de vida útil menor que a carne fresca devido a diversos motivos, entre eles:

- a) Maior contaminação microbiológica devido à maior manipulação e maior processamento a que estes produtos estão sujeitos;
- b) O processo de picagem causa destruição do sistema membranar muscular, resultando na destruição da barreira que separa lipídios, catalisadores de oxidação e enzimas responsáveis pela oxidação lipídica reunindo assim todos estes compostos;
- c) O aumento da área de exposição a que a carne é sujeita, catalisa a oxidação lipídica devido à exposição dos componentes lipídicos ao oxigénio, mas também potencia a ação de microrganismos deteriorativos e patogénico;
- d) Os microrganismos inicialmente contidos na superfície do músculo antes do processamento passam a estar dispersos por toda a carne depois do processo de picagem (LAMBERT *et al.*, 1991; ZHOU *et al.*, 2010).

### 1.3.1 Deterioração química

A oxidação lipídica, uma forma de deterioração físico-química da gordura é uma causa preponderante na deterioração da carne e pode ocorrer nos triglicéridos armazenados e nos fosfolípidos dos tecidos (CASABURI *et al.*, 2015, LOVE e PEARSON, 1971).

Os lípidos presentes na carne podem ser classificados em duas categorias: intermuscular ou intramuscular. Os lípidos intermusculares costumam encontrar-se em depósitos adiposos de dimensões consideráveis, envoltos por tecido conjuntivo especializado. Já os lípidos intramusculares, por seu lado, encontram-se integrados no tecido muscular e apresentam uma vasta distribuição por toda a sua extensão (CASABURI *et al.*, 2015).

Os lípidos intracelulares existem em relação próxima com as proteínas e constituem uma larga porção dos fosfolípidos totais, que contribuem em cerca de 1% do peso do tecido. A fração de triglicéridos é cerca de cinco vezes maior. Apesar do conteúdo em fosfolípidos ser relativamente pequeno na carne, a sua suscetibilidade à oxidação torna-os extremamente importantes na preservação da qualidade da carne. Esta suscetibilidade deve-se à elevada percentagem de ácidos gordos insaturados, particularmente ácido araquidónico e linoleico, na sua composição, por oposição aos triglicéridos. Para além disso, os fosfolípidos também se encontram em contacto estreito com os tecidos catalisadores da oxidação, o que aumenta a sua tendência para oxidar. Há uma grande variação da quantidade total de lípidos na carne de diferentes espécies, no entanto, a quantidade de fosfolípidos é relativamente constante entre animais e localizações na carcaça. No entanto a composição em ácidos gordos insaturados

destes fosfolípidos varia conforme a localização na carcaça, o que explica a propensão de alguns cortes de carne apresentarem maior tendência para a oxidação lipídica do que outros (ZHOU *et al.*, 2010).

Como dito anteriormente uma importante causa da deterioração da qualidade dos alimentos musculares é a oxidação lipídica e as alterações associadas à mesma. A oxidação lipídica consiste num complexo processo que começa na fase de iniciação com a perda de um átomo de hidrogénio proveniente de uma cadeia de ácidos gordos, mais especificamente do grupo metileno formando um radical livre que rapidamente reage com o oxigénio molecular formando um radical peróxido. Este radical peróxido formado subtrai um átomo de hidrogénio a outra cadeia de hidrocarbonetos formando um hidroperóxido e um novo radical livre, possibilitando a perpetuação da cadeia de radicais livres, sendo esta a fase de propagação. Portanto um único evento de iniciação tem a capacidade de formar diversas moléculas de peróxido devido à reação em cadeia. A oxidação primária é seguida por uma série de reações secundárias que levam à degradação dos lípidos e à formação de diversos compostos voláteis de baixo peso molecular (aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos, ésteres, furanos e lactonas) que levam ao desenvolvimento de rancidez oxidativa. Fatores como as condições de processamento e armazenamento, o tipo de ingredientes utilizado e a concentração de antioxidantes, são muito importantes na determinação da taxa de desenvolvimento e dos possíveis efeitos deteriorativos da oxidação lipídica. Os problemas associados à oxidação lipídica ganharam muito interesse por se relacionarem com a deterioração do sabor, presença de *off-odors*, perda do valor nutricional e segurança dos produtos cárneos (LAMBERT *et al.*, 1991; ZHOU *et al.*, 2010).

Os pigmentos férricos do grupo heme encontram-se implicados como fatores pro-oxidantes durante a oxidação lipídica, uma vez que este processo e a oxidação dos pigmentos se encontram relacionados: os pigmentos férricos do grupo heme promovem a oxidação dos lípidos mas não a induzem, o que por sua vez resulta na destruição dos tais pigmentos. Na carne fresca pré-embalada, a cor castanha e a rancidez são características muito pouco apelativas para o consumidor. A carne cozinhada também sofre oxidação lipídica, em ambos os casos, a exposição ao ar (oxigénio) é o principal fator indutor da reação (NYCHAS, 2008).

O cloreto de sódio acelera e promove o início da oxidação dos triglicéridos, havendo uma relação exponencial com a atividade da água presente no produto cárneo, pois a água promove a oxidação através da sua atividade solvente. Os efeitos provocados pelo cloreto de

sódio são atribuídos à ação que o íão cloreto tem sobre os lípidos e à modificação das hemoproteínas catalisando assim a oxidação lipídica (HE, 2010).

As carnes refrigeradas ou congeladas também estão sujeitas a este processo, apesar das temperaturas baixas diminuírem a sua escala. As variações bruscas e frequentes de temperatura potenciam a oxidação lipídica (NYCHAS *et al.*, 2008).

Com o crescimento da indústria de carne processada e pré-embalada, o controlo da oxidação lipídica tem-se tornado da maior importância. Antioxidantes e agentes quelantes, sobretudo polifosfatos, são os inibidores mais eficazes da oxidação lipídica.

O controlo da oxidação lipídica com recurso à redução do oxigénio não é tão eficaz como a adição de antioxidantes. A aplicação de medidas que permitam a manutenção das características da carne dentro de parâmetros aceitáveis para o consumidor, sobretudo a cor, é o principal desafio no combate da oxidação lipídica (LADIKOS e LOUGOVOIS, 1990).

### **1.3.2. Deterioração microbiana**

A constituição da carne é um ótimo substrato para a flora microbiológica, contendo todos os substratos necessários para o seu desenvolvimento. A qualidade microbiológica da carne depende do estado do animal antes e no momento do abate, do tipo de processamento a que está sujeito e das condições de transporte e armazenamento implicadas. Após o abate e instalação de *rigor mortis*, iniciam-se processos que proporcionam um substrato mais rico para a multiplicação microbiana, apesar das proporções de gordura e proteína se manterem constantes. No momento da morte, o pH do músculo é 7,0-7,2, mas após a morte a glicólise resulta na conversão do glicogénio em ácido láctico, causando um decréscimo acentuado do pH para um intervalo final de 5,5-5,7. As concentrações residuais de glicogénio influenciam por isso o tempo de conservação e o início da deterioração microbiana. (NYCHAS *et al.*, 2008)

A glicose é o substrato preferido pelos microrganismos deteriorativos aeróbios, mas na ausência da mesma, os microrganismos iniciam a degradação de aminoácidos, o que resulta na produção de resíduos com odor desagradável, os chamados compostos orgânicos voláteis (DOULGERAKI *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, vários investigadores demonstraram que alterações no odor, cor, sabor e aparência geral da carne e produtos cárneos podem correlacionar-se com a presença de microrganismos. Contudo, o tempo necessário para as bactérias se multiplicarem e haver

alterações observáveis varia com o tipo de carne, os microrganismos presentes e a temperatura (DOULGERAKI *et al.*, 2012).

Por sua vez, carne de diferentes origens apresenta diferentes percentagens relativas de gordura e músculo, que são mais ou menos suscetíveis a determinados microrganismos, e diferentes fontes de contaminação ao longo da cadeia de abate ou processamento (ver Anexo A). A superfície da carne é suscetível a contaminação por bactérias deteriorativas ou patogénicas, fungos e leveduras. A aplicação de boas práticas de higiene, permite uma diminuição da contaminação das peças de carne, mas está indicado especial cuidado durante a esfolagem e evisceração, uma vez que são pontos críticos especialmente propensos à contaminação. A utilização de aditivos conservantes também permite inibir ou retardar a ação dos microrganismos.

Embora o tecido adiposo apresente concentrações residuais de glicose ou outros compostos que podem ser utilizados para a multiplicação microbiana, a gordura não é de particular importância na deterioração causada pelos microrganismos. (CASABURI *et al.*, 2015).

O estudo da ação microbiana em alimentos ganhou a atenção científica quando se começou, nos anos 50, a transportar alimentos extremamente perecíveis a grandes distâncias e hoje sabe-se que a deterioração que ocorre em carnes é maioritariamente devida à ação de microrganismos presentes na mesma. Em refrigeração, a microbiota deteriorativa da carne é composta essencialmente de espécies psicrófilas, em grande parte, provenientes da pele dos animais abatidos. A microbiota aeróbia é geralmente dominada por pseudomonas, enquanto que a microbiota anaeróbia é dominada por lactobacilos. Em ambos os casos, como dito anteriormente, o crescimento ocorre devido ao consumo de componentes solúveis de baixo peso molecular presentes na carne que são consumidos na seguinte ordem: glicose, glicose-6-fosfato (apenas *Enterobacteriaceae*) e aminoácidos.

A investigação científica na área mostrou que, embora exista uma grande variedade de espécies de microrganismos em carne fresca, apenas uma fração se desenvolve e, eventualmente, domina a chamada microbiota deteriorativa. A seleção depende do efeito combinado de fatores intrínsecos, extrínsecos e do processamento que podem afetar a sobrevivência microbiana, o crescimento e a competição na carne. Os fatores mais preponderantes são o pH, a atividade da água, o processamento, a composição da carne e principalmente a temperatura de armazenamento e a atmosfera da embalagem. Na carne armazenada aerobicamente, *Pseudomonas* spp. apresenta uma vantagem marcante na taxa de

crescimento em comparação com outros géneros e esta vantagem tende a aumentar com o decréscimo da temperatura, esta vantagem pode ser explicada devido à incapacidade das espécies concorrentes de competir com *Pseudomonas* spp. pelo oxigénio disponível. Anaerobicamente, a microbiota deteriorativa é geralmente dominada por *Lactobacillus* que demonstram maior afinidade pela glicose comparativamente a outras espécies concorrentes (*Enterobacteriaceae* e *Brochotrix thermosfacta*), embora se desenvolvam muito mais rapidamente o que confere uma vantagem que aumenta com a diminuição da temperatura. Por outro lado, os lactobacilos produzem um agente antimicrobiano que inibe o crescimento de outras espécies concorrentes. (DOULGERAKI *et al.*, 2012; GILL e NEWTON, 1978)

A análise microbiológica, seja por métodos de contagem ou moleculares (PCR, RT-PCR, DGGE), é mais significativa para medir a microbiota responsável pela deterioração do que a qualidade da carne fresca em si, por outras palavras a carne pode ser aceite do ponto de vista sensorial por um painel de provadores treinado mas a sua contaminação microbiológica ultrapassar os limites legais impostos. Por outro lado, a análise microbiológica por si só não dá indicações suficientes sobre a qualidade da carne. Este tipo de análise é geralmente demorado e destrutivo, mas tem a vantagem de fornecer parâmetros mensuráveis que permitem caracterizar as condições de higiene e qualidade ao longo de toda a cadeia de processamento de um alimento ou derivado (NYCHAS *et al.*, 2008; DOULGERAKI *et al.*, 2012).

Por outro lado, os métodos moleculares apresentam como principais vantagens não estarem dependentes do conhecimento prévio das condições ideais para crescimento dos microrganismos a contabilizar, não necessitarem da adequação de meios à espécie que se pretende observar e terem uma elevada sensibilidade para deteção de diferentes espécies e não só géneros (DOULGERAKI *et al.*, 2012). No entanto, devido à sua especificidade e custo, não foram utilizados, pelo que a sua descrição detalhada se encontra fora do âmbito deste trabalho.

O regulamento (CE) nº 1441/2007 (CE) do Parlamento Europeu relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios prevê o controlo de microrganismos mesófilos e também microrganismos da família *Enterobacteriaceae* em carcaças de bovinos, de forma a avaliar e verificar os critérios de higiene impostas pelo programa HACCP. Por outro lado prevê também o controlo de *Salmonella* spp. e *E. coli* em carne picada e em preparados de carne, de forma a avaliar as condições de higiene dos produtos cárneos.

## 1.4 Fatores envolvidos na deterioração

### 1.4.1 Principal microbiota da carne

As bactérias deteriorativas comumente encontradas em carne fresca de bovino incluem *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* e bactérias do ácido láctico (BAL) dos gêneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*.

A presença de microrganismos em carne deve-se essencialmente a más práticas de higiene em matadouro e na sala de desmancha das carnes. O processo de esfolagem e evisceração são também procedimentos que elevam a contaminação microbiana. É importante referir que a distribuição da carne fresca intensifica a contaminação destes produtos (NYCHAS, 2008).

#### 1.4.1.1 Microrganismos mesófilos totais

Também apelidados de microrganismos aeróbios totais, são microrganismos capazes de se desenvolver a temperaturas entre 20°C e 45°C, sendo a temperatura ótima de multiplicação entre 30°C e 40°C. Embora a microbiota inicial da carne contenha este tipo de microrganismos, como não são tolerantes ao frio, não se desenvolvem em ambientes de refrigeração (JAY, 2000)

A sua contagem é considerada um indicador microbiológico muito importante, funcionando como índice de qualidade sanitária e segurança alimentar utilizado por rotina como definido no regulamento (CE) nº 1441/2007 (CE) do Parlamento Europeu. Nesta categoria estão incluídas bactérias como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. e *Aeromonas hydrophila* (BUCHANAN e PALUMBO, 1985; KOTULA *et al.*, 1987; LAMBERT *et al.*, 1991; LAMMERDING *et al.*, 1988).

As contagens de microrganismos mesófilos totais tendem a aumentar com o aumento do teor de gordura (SCANGA *et al.*, 2000)

Apesar da multiplicação destes microrganismos ser controlada com a refrigeração (0-4°C), podem constituir um problema de saúde pública se não houver um correto controlo da temperatura, sobretudo durante o transporte ou armazenamento (LIMBO *et al.*, 2010; PALUMBO, 1985).

A maior parte dos microrganismos desta categoria tem efeitos patogênicos, motivo pelo qual a vigilância e a aplicação de medidas contra a sua multiplicação é tão importante (CDC, 2016).

*Clostridium perfringens* é dos patógenos de origem alimentar mais prevalentes atualmente, provocando distúrbios gastrointestinais, mas não é transmissível entre seres humanos. Idosos e crianças encontram-se em maior risco de apresentar sintomas graves, que podem durar até duas semanas (CDC, 2018).

#### 1.4.1.2 Microrganismos psicotróficos totais

Os psicotróficos são capazes de se desenvolvem a temperaturas de refrigeração (0-7°C), abrangem géneros Gram-positivos (*BAL* e *Brochothrix thermosphacta*), como géneros gram-negativos (*Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae*). Ocorrem no solo, na água e na vegetação e estão presentes no couro dos animais (JAY, 2000).

*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Yersinia colitica* são alguns microrganismos patogênicos psicotróficos. A listeriose, apesar de rara, é potencialmente fatal em pessoas imunodeprimidas e caracteriza-se por distúrbios gastrointestinais, como muitas outras infecções alimentares, podendo levar a aborto e partos prematuros em grávidas (CDC, 2016).

Os microrganismos Gram-negativos são mais aptos a multiplicarem-se nestas condições, considerados por isso os principais responsáveis pela deterioração da carne em refrigeração. O couro aparenta ser a principal fonte de contaminação por parte destes microrganismos que se depositam em carcaças de bovinos durante o processo de esfolo no matadouro. A manipulação e movimento das carcaças através de arcas de refrigeração e salas de desmancha aumenta a contaminação por psicotróficos provenientes das superfícies de trabalho. (GILL E NEWTON, 1978)

Muitas espécies de bactérias psicotróficas foram descritas, e algumas são componentes principais da microbiota deteriorativa da carne. *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e certos géneros da família *Enterobacteriaceae* são comumente encontrados em carne deteriorada (LAMBERT *et al.*, 1991; JAY, 2000; KODOGIANNIS *et al.*, 2014).

### 1.4.1.3 Enterobacteriaceae

Corresponde a uma família de bactérias Gram-negativas que inclui uma grande variedade de bactérias patogénicas. São bacilos, oxidase-negativos e catalase positivo, anaeróbios facultativos com metabolismo do tipo fermentativo e que não forma esporos. A sua distribuição é ubíqua, encontrando-se naturalmente presente em resíduos fecais, no solo e na água. A sua presença em alimentos frescos e congelados, como carnes de bovino, suíno e outras é frequente (CASTELLANO *et al.*, 2004).

As espécies psicotróficas desta família são consideradas as principais responsáveis pela deterioração da carne fresca em refrigeração precisamente por se desenvolverem a tais temperaturas (JAY, 2000).

Esta família inclui diversos géneros patogénicos de relevo ao nível da saúde pública, principalmente: *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7, também abrange géneros deteriorativos, como *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Pantoea* spp., *Proteus* spp. e *Hafnia* spp. (DOULGERAKI *et al.*, 2012).

*Salmonella* spp. é particularmente frequente em aves e suínos, sendo a segunda causa de doença intestinal mais frequente em seres humanos nos E.U.A. e tendo uma taxa de mortalidade de cerca de 2% nas pessoas hospitalizadas. Em adultos imunocompetentes, não é particularmente grave se tratada atempadamente, provocando gastroenterite, no entanto é frequentemente fatal em crianças e idosos. A prevenção passa por evitar a ingestão de carne crua ou insuficientemente cozinhada, sendo este cuidado essencial para a minoração desta toxinfecção alimentar (COX *et al.*, 2011). O regulamento (CE) nº 1441/2007 (CE) do Parlamento Europeu espelha a importância do controlo deste microrganismo em carne picada e em preparados de carne, estando o seu limite bem definido no regulamento supracitado.

*Yersinia enterocolitica* apresenta um amplo leque de estirpes com diferentes graus de patogenicidade, apresentando uma relação próxima com outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*. A yersiniose foi a zoonose mais reportada na U.E. em 2013, considerando-se o porco como o principal reservatório da infeção humana, no entanto, também há casos com origem em carne bovina e de aves. Provoca gastroenterite, cuja gravidade depende do estado de saúde do hospedeiro, podendo levar a septicemia. Apresenta capacidade de sobreviver a temperaturas de congelação e de se multiplicar em refrigeração e atmosfera modificada ou vácuo (PTESIOS *et al.*, 2016).

#### 1.4.1.4. *Pseudomonas* spp.

O género *Pseudomonas* spp. constitui um amplo grupo de bacilos Gram negativos, móveis, não formadores de esporos e maioritariamente aeróbios. São oxidase e catalase positivos e atuam a um pH ótimo inferior a 4,5. Constituí o género de bactérias mais predominante em carne refrigerada em ambiente aeróbio ou em MAP com altas concentrações de O<sub>2</sub>. Estas bactérias estão tipicamente presentes no solo e água e distribuem-se amplamente pelos alimentos, especialmente vegetais, carne e mariscos. (JAY, 2000).

A deterioração da carne fresca refrigerada armazenada aerobicamente é iniciada à custa das quantidades limitantes de glicose endógena, cuja conversão rápida em 2-oxo-gluconato ou gluconato via Entner-Doudoroff oferece uma grande vantagem competitiva às pseudomonas (GILL, 1986). Estes produtos catabólicos não são imediatamente assimilados pela maioria das outras bactérias e, portanto, são amplamente consumidos pelas pseudomonas como fontes de carbono e energia quando a glicose é esgotada.

De facto, a glicose é o primeiro constituinte preferencial presente nos tecidos musculares post-mortem pela maioria das bactérias, seguido por aminoácidos, ácido láctico e glicose-6-fosfato, dependendo da espécie (LAMBERT *et al.*, 1991; NYCHAS *et al.*, 1998). Assim, após a depleção de glicose na carne com pH normal, de 5,5 a 5,8, *Pseudomonas* spp. degradam os aminoácidos, resultando na formação de sulfetos voláteis, ésteres e aminas que eventualmente causam odores desagradáveis e deterioração da carne. A sua capacidade de se desenvolver a temperaturas de refrigeração e a alta afinidade ao oxigénio têm sido sugeridas como as principais razões para o crescimento predominante das espécies de *Pseudomonas* em carnes frescas embaladas em aerobiose ou em atmosfera modificada com alto teor de O<sub>2</sub>. (GILL E NEWTON, 1978).

As espécies mais relevantes no papel deteriorativo estão maioritariamente incluídas no Grupo I que inclui *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundinensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas viridiflava* e *Pseudomonas syringae*. Destas espécies, *P. fragi* é considerada a mais presente em carnes deterioradas (incidência entre 56.7% e 79.0%), seguida pela *P. lundinensis* (JAY, 2000).

#### 1.4.1.5 Bactérias do ácido láctico

As BAL correspondem a um grupo de bactérias em bastonete ou cocos, Gram-positivo, que não forma esporos, catalase e oxidase negativo, anaeróbio facultativo. Predominam na carne fresca embalada sob vácuo ou MAP e incluem *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Carnobacterium* (JAY, 2000).

Durante o armazenamento de carnes frescas embaladas a vácuo ou MAP, as BAL produzem ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, a partir de glicose endógena, que pode reduzir o pH. Como resultado, ocorre um tipo de deterioração que se manifesta por odores desagradáveis acidícos. Este tipo de deterioração pode ser acompanhado por formação de gás na embalagem e descoloração do pigmento da carne (esverdeamento) devido à formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, os ácidos orgânicos e bacteriocinas produzidos por estas bactérias atuam como substâncias antimicrobianas, também é importante frisar que têm fraca atividade proteolítica quando comparadas com outros microrganismos da microbiota deteriorativa (POTHAKOS *et al.*, 2015).

#### 1.4.1.6 *Brochothrix thermosphacta*

*Brochothrix* spp inclui duas espécies: *B. campestris* (não aparenta ser de relevo em questões de segurança alimentar, tendo apenas sido isolada a partir do solo) e *B. thermosphacta*, ambas não patogênicas. Correspondem a bastonetes Gram-positivos anaeróbios facultativos. As dimensões são aproximadamente 0,6 - 0,7µm de largura por 1 - 2µm de comprimento. Têm um intervalo de crescimento de 0 a 30 °C, sendo o ideal em torno de 20-25 °C. As colónias são não pigmentadas e produzem lipases e proteases que contribuem para a deterioração dos alimentos, mas a produção destes compostos ocorre principalmente a temperaturas altas. As lipases não são produzidas em quantidades detetáveis a temperaturas inferiores a 20 °C e a produção de proteases é bastante inferior a 6 °C quando comparada a 10 °C. Em relação ao pH a *Brochothrix* é capaz de se multiplicar entre 5,0 e 9,0 com um pH ótimo de 7,0. Por outro lado este organismo pode tolerar 6,5% de sal e crescer em produtos com uma a<sub>w</sub> tão baixa quanto 0,94 a temperaturas de 20 a 25 °C (BRAUN E SUTHERLAND, 2004).

*Brochothrix* é encontrada no solo e na água e a sua presença é comum no trato intestinal de animais, também é isolada com frequência em instalações de processamento de carnes.

*B. thermosphacta* foi isolada numa ampla variedade de alimentos, incluindo carne de bovino, cordeiro, porco, peixe, vegetais congelados e produtos lácteos. Este organismo é frequentemente associado à deterioração de carnes frescas e curadas, capaz de produzir diacetil e uma ampla gama de ácidos gordos devido ao metabolismo aeróbio da glicose que dá origem a odores azedo, a mofo e a ácido. Embora *B. thermosphacta* possa não ser o organismo dominante na microbiota deteriorativa, os odores descritos podem ser observados uma vez que este organismo atinja  $10^5$  ufc  $g^{-1}$  (HOLLEY, 2000).

Em relação a embalagens em atmosfera modificada, *B. thermosphacta* pode tolerar até 50% de concentração de CO<sub>2</sub> desde que haja algum oxigénio presente, sendo por vezes o microrganismo dominante. Um estudo demonstrou que amostras de coelho recolhidas em supermercados apresentavam altos níveis de *Brochothrix*, particularmente em embalagens com alto teor de CO<sub>2</sub>. Pensa-se que a elevada concentração deste gás potenciou o crescimento da *Bronchotrix* e inibiu o crescimento de *Pseudomonas* spp.. Este microorganismo também tolera até 100 ppm de nitrito, um aditivo comumente utilizado na indústria transformadora de carne (HOLLEY, 2000).

#### 1.4.1.7 Fungos

Os fungos constituem um dos maiores grupos de organismos com cerca de 100 000 espécies conhecidas, no entanto, na indústria alimentar apenas 50 espécies são frequentemente encontradas (ERCOLINI *et al.*, 2009).

As leveduras e os bolores desenvolvem-se numa grande variedade de ambientes (plantas, solo, água, produtos de origem animal e mesmo órgãos e tecidos de animais vivos) e a sua ampla ubiquidade deve-se à capacidade de utilizar uma grande diversidade de substratos, tais como hidratos de carbono, ácidos orgânicos, proteínas e lípidos, e à grande tolerância a valores reduzidos de pH e  $a_w$ , temperaturas baixas e presença de conservantes (HAWKSWORTH, 2015).

Enquanto que os bolores necessitam de oxigénio para crescer, as leveduras desenvolvem-se tanto na sua presença como na sua ausência. A deterioração causada pelos bolores e leveduras caracteriza-se pela formação de colónias grandes, normalmente

pigmentadas, viscosidade superficial, fermentação de açúcares com produção de ácidos e gás e desenvolvimento de odores desagradáveis (HUIS IN'T VELD, 1996).

#### **1.4.1.7.1 Bolores**

Os bolores correspondem a fungos filamentosos que estão envolvidos na deterioração de alimentos, na fermentação tanto de alimentos vegetais como animais e algumas espécies na produção de micotoxinas. Multiplicam-se no intervalo de pH situado entre 1,5 e 11,0, no entanto, não são capazes de o fazer quando a  $a_w$  é inferior a 0,80. Os bolores mais comuns na deterioração da carne de bovino fresca são *Rhizopus spp.*, *Mucormycetes spp.* e *Aspergillus spp.*, estando estes na origem da formação de muco na sua superfície (JAY, 2000).

O crescimento dos bolores nos alimentos pode ser controlado evitando-se que os esporos entrem nos alimentos, ajustando a temperatura e a humidade de armazenamento, alterando os níveis de oxigénio e utilizando conservantes. É importante frisar que os métodos descritos não impedem que os fungos se desenvolvam e alterem a qualidade e a segurança dos alimentos. Portanto, é necessário detetar fungos no alimento e no ambiente onde se realiza o processamento, embalagem e armazenamento (HAWKSWORTH, 2015).

#### **1.4.1.7.2 Leveduras**

As leveduras apresentam uma forma arredondada ou alongada. Demonstram um crescimento mais rápido quando comparado ao bolor e crescem a valores de pH entre 2,5 e 8,5. O seu crescimento é inibido se a  $a_w$  for inferior a 0,88. (JAY, 2000).

A deterioração causada por leveduras é favorecida em alimentos com pH baixo, geralmente 5,5 ou menor, e pela presença de açúcares, ácidos orgânicos e outras fontes de carbono facilmente metabolizadas. Por isso produtos ricos em açúcar são muito suscetíveis à deterioração por leveduras. A deterioração causada pelas leveduras é frequentemente manifestada pelo crescimento na superfície em produtos como queijos e carnes e pela fermentação de açúcares em produtos líquidos e semilíquidos. Existem inúmeras leveduras presentes em alimentos, mas apenas cerca de dez espécies são consideradas responsáveis pela deterioração. Em carnes deterioradas é muito comum a maior prevalência de leveduras do género *Debaryomyces*, *Yarrowia* e *Rhodotorula* (BETTS, 2006, LAMBERT *et al.*, 1991).

## 1.4.2. Características físico-químicas

### 1.4.2.1 Cor

A cor é um fator-chave para o consumidor de carne, uma vez que é utilizada como indicador de frescura e qualidade. A descoloração do músculo é, por isso mesmo, uma fonte de perdas económicas acentuadas. A melhor forma de reduzir as perdas devido a este fenómeno depende da nossa compreensão dos princípios fundamentais associados às alterações químicas que a mioglobina sofre (MANCINI e HUNT, 2005).

A mioglobina é a principal proteína responsável pela coloração da carne, apesar de a hemoglobina e o citocromo C também terem nesta um papel de menor importância. O que determina a cor da carne são as ligações presentes na molécula e a valência do ferro. A mioglobina possui diversos resíduos ligados, mas a histidina destaca-se, assim como o grupo prostético heme localizado na porção hidrofóbica da proteína. O anel do grupo heme apresenta um átomo central de ferro capaz de estabelecer até seis ligações. Quatro destas são com anéis de hidrogénio, azoto e carbono e a quinta com a histidina. O sexto local de ligação está disponível para ligandos reversíveis. Na carne fresca, os pigmentos do grupo heme existem em quatro formas: desoximioglobina (vermelho púrpura), oximioglobina, carboximioglobina (vermelho cereja) e metamioglobina (castanha). Nas três primeiras o átomo de ferro contido no grupo heme apresenta-se na forma reduzida ou ferrosa ( $F^{2+}$ ), no último caso encontra-se no estado oxidado ou férrico ( $F^{3+}$ ). A oximioglobina e a carboximioglobina, do ponto de vista do consumidor é vista como mais apelativa enquanto que a cor castanha da metamioglobina é extremamente indesejada (MANCINI e HUNT, 2005; LI, 2012).

A desoximioglobina ocorre quando nenhum ligando se encontra na posição seis e está presente o ião ferro (II). Isto resulta numa cor vermelha-púrpura ou púrpura-rosada tipicamente associada com o armazenamento em vácuo ou relacionada com a cor do músculo imediatamente após o corte. É necessária uma tensão de oxigénio muito baixa para a manutenção da mioglobina neste estado. No caso da oximioglobina, a sexta ligação é ocupada por oxigénio, enquanto que na carboximioglobina está ocupada por uma molécula de CO, a coloração brilhante em cada uma destas formas é semelhante, no entanto a mioglobina tem maior afinidade com o CO, assim, a forma carboximioglobina resulta numa maior estabilidade da cor vermelho-cereja brilhante ao longo do tempo, no entanto do ponto de vista

do consumidor o monóxido de carbono está negativamente associado. A cor acastanhada, devido à presença da forma metamioglobina deve-se à oxidação de qualquer das três formas anteriormente descritas. Nesta forma, na sexta ligação encontra-se uma molécula de água que impossibilita a ligação do oxigénio. Vários são os fatores que interferem na cor da carne sendo estes: a espessura da peça de carne, a temperatura, a pressão parcial de oxigénio, o pH e a competição pelo oxigénio por parte de outros processos metabólicos (MANCINI e HUNT, 2005).

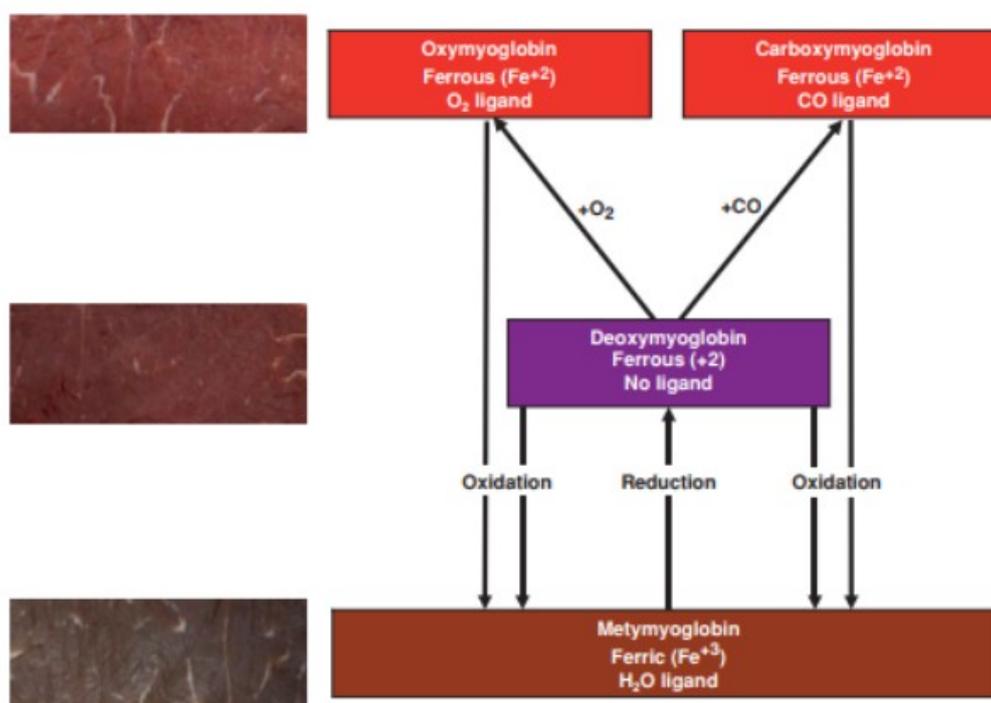


Figura 2: Os efeitos do estado redox da mioglobina, ligantes e valência do ferro na cor da superfície do músculo post-mortem. (MANCINI, 2005)

A cor da carne pode ser medida e classificada, podendo para isso utilizar-se visão computadorizada, métodos instrumentais e avaliação visual da cor (MANCINI e HUNT, 2005; LI, 2012).

Os métodos instrumentais são neste momento os mais utilizados para a realização de medições quantitativas com critérios objetivos, recorrendo-se sobretudo a colorímetros e espectrofotómetros. Estes instrumentos, permitem a quem faz a medição escolher entre diferentes escalas de cor (Hunter, CIE e tritimus), tipos de luz, observadores e tamanho da abertura, razão pela qual os métodos e parâmetros escolhidos devem ser cuidadosamente

considerados e os resultados obtidos apenas comparados entre carcaças ou ensaios se se utilizarem os mesmos valores. A seleção da variável cor mais adequada depende do objetivo do estudo e deve ser adequada a este (MANCINI e HUNT, 2005).

Uma das escalas ou sistemas de medição da cor mais utilizados é o CIE  $L^*a^*b^*$ , na qual são medidas três coordenadas:  $L^*$  indica a luminosidade (varia entre 0 e 100),  $a^*$  é um parâmetro que compreende à cor vermelha até verde ( $a$  corresponde ao vermelho e  $-a$  corresponde ao verde) e  $b^*$  mede a cor entre o azul e o amarelo ( $b$  corresponde a azul e o amarelo corresponde a  $-b$ ). Em teoria ambas as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  são infinitas, mas na prática variam entre -128 e 127.

As medições devem ser garantidamente feitas no tecido muscular e não na gordura, osso ou aditivos caso estes sejam visíveis. A sensibilidade do teste pode ser melhorada aumentando o número de locais diferentes amostrados por análise, sendo por norma utilizado um mínimo de três e considerada a média destes como o valor final (LIMBO, 2010).

A espectrofotometria pode ser utilizada para avaliar a cor da carne, sendo neste momento recomendados os comprimentos de onda 545-503 nm para a metamioglobina, 565-557 nm para a desoximioglobina e 572-582 nm para a oximioglobina. Obtém-se com estes dados curvas de espectrofotometria que permitem estimar a quantidade de cada forma de mioglobina e interrelacioná-la com a cor (MANCINI e HUNT, 2005).

A visão computadorizada consiste na análise de imagens de uma câmara digital e apresenta como principais vantagens apenas ser necessária uma medição para se obter um valor representativo (as imagens são processadas para remoção da gordura e do osso), as imagens digitais poderem ter em conta a variação do aspeto da superfície devido à oxidação-redução da mioglobina e as cores obtidas poderem ser convertidas em dados numéricos em diferentes sistemas. Através deste método pode depois prever-se estatisticamente o *score* de coloração na avaliação visual (LIMBO, 2010; MANCINI e HUNT, 2005).

#### 1.4.2.2 pH

O pH da carne é um dos parâmetros determinantes para a sua conservação e encontra-se relacionado com a cor e a microbiota presente. O músculo *ante-mortem* em repouso apresenta um pH alcalino de cerca de 6 a 7. Após a morte do animal ou após a realização de exercício físico intenso, o pH tende a diminuir devido à produção de ácido láctico, resultante do metabolismo do glicogénio armazenado nas células musculares – reações que continuam a

decorrer no animal após o abate até à exaustão das reservas de glicogénio ou das enzimas e seus cofatores (WEGLARZ, 2010).

Apesar do pH da carne poder variar entre 5 e 7, os produtos considerados de maior qualidade tendem a ter valores de pH entre 5,4 e 5,6. Valores de pH superiores a 5,8, já se encontram associados a perda de algumas características sensoriais, bem como a maiores dificuldades na conservação em refrigeração e na embalagem (WEGLARZ, 2010; SHANGE *et al.*, 2018).

O pH final é determinado vinte e quatro horas após o abate e influencia a cor e a capacidade de retenção de água. Tanto a velocidade da descida do pH, como o valor final vão influenciar as características da carne. Um pH final muito baixo, resulta em carne mais clara e com menor capacidade de retenção de água; por oposição, um pH final muito elevado traduz-se numa cor mais escura e em menor perda de água. Em termos económicos, carne com pH final mais baixo irá ter perdas superiores associadas, uma vez que vai haver uma grande perda de peso em água e que há um impacto assinalável no aspeto geral das peças quando embaladas. O pH baixo está associado também a maior perda de água durante a preparação, o que por sua vez afeta o sabor e a dureza da carne (WEGLARZ, 2010; SHANGE *et al.*, 2018).

A carne PSE (*pale, soft and exsudative*) resulta de uma descida acentuada e rápida do pH *post-mortem* e caracteriza-se por ser pálida, mole e exsudativa, com pH baixo. Já a carne DFD (*dark, firm and dry*) caracteriza-se por ser seca, dura e escura e apresenta um pH relativamente elevado, o que diminui o seu período de conservação e promove maiores alterações de cor durante o armazenamento anaeróbio. Durante o verão, há uma maior probabilidade de a carne se apresentar com valores de pH compatíveis com carne DFD, muito provavelmente devido a um maior *stress* térmico (LEYGONIE, 2012).

O *stress* antes do abate é considerado o maior fator de alteração do pH pós-morte para valores inadequados, seja este de origem ambiental ou causado pelo manejo. O *stress* induz geralmente um pH final mais elevado, uma vez que o músculo no momento do abate já se encontra com reservas muito baixas de glicogénio. A espécie, raça, sexo, idade, estação do ano, alimentação do animal e método de abate também influenciam o pH final da carne. Peças obtidas em diferentes localizações da carcaça do mesmo animal apresentam ligeiras variações de pH (SHANGE *et al.*, 2018).

O pH pode ser medido através de sensores de medição ou tiras colorimétricas, no entanto, em ensaios alimentares costumam ser utilizados os sensores, uma vez que permitem

medições com precisão decimal, muitas vezes essencial para uma melhor compressão dos processos a que a carne está sujeita (WEGLARZ, 2010).

A carne escura, firme e seca (DFD), apresenta um pH elevado ( $> 6,0$ ) e apresenta baixos níveis de glicose, deteriora-se mais rapidamente que a carne com um pH considerado normal porque a desaminação dos aminoácidos presentes nos tecidos pela flora de deterioração aeróbica inicia-se mais cedo do que em carne com pH normal. Mesmo se armazenada sob condições de vácuo ou em MAP, a carne DFD deteriora-se rapidamente, devido ao pH alto que seleciona espécies bacterianas com um potencial de deterioração superior ao das pseudomonas ou LAB, como por exemplo *Sh. Putrefaciens* e *S. liquefacien*. O pH elevado da carne DFD deve-se ao teor reduzido de ácido láctico, uma vez que esta carne tem origem em animais sujeitos a elevados níveis de stress ambiental *ante mortem*, como a exaustão ou a temperatura elevada, condições que resultam na ineficiente transformação do glicogénio em ácido láctico durante o *rigor mortis*. A suplementação de carne DFD com glicose pode retardar a deterioração, reduzindo a formação de odor pútrido em carnes frescas armazenadas sob diferentes condições (LEYGONIE, 2012).

### 1.4.2.3 Atividade da água

A atividade da água ( $a_w$ ) é a relação entre a pressão de vapor de um alimento em relação à pressão de vapor da água pura à mesma temperatura e varia, por isso, entre 0 e 1. A atividade da água traduz-se na quantidade de água disponível para hidratação da matéria, apesar de não ter unidades, e varia com a temperatura, solutos presentes, pH e potencial de oxidação-redução. A medição é feita numa câmara selada, onde se mede a pressão de vapor após ter sido atingido o equilíbrio (SLADE *et al.*, 1991).

A atividade da água é reduzida pela presença de sais, já que quando a água se encontra a interagir com estes, não está disponível para outras interações (podendo nesse caso ser medida como conteúdo em água). É necessária uma elevada concentração de solutos para diminuir a atividade da água para níveis antimicrobianos significativos (CHIRIFE *et al.*, 1996).

Na carne ocorre uma elevada diminuição da  $a_w$  no período *post mortem* devido à diminuição do pH que ocorre neste período e também por perda de adenosina trifosfato. A carne de bovino fresca apresenta valores de  $a_w$  entre 0,980 e 0,992 representando um intervalo ótimo para o crescimento de microrganismos (SCHMIDT *et al.*, 2007).

O controlo da atividade da água é de grande importância na indústria alimentar para aumentar a *shelf life* dos produtos e diminuir o desenvolvimento microbiano. Este é diminuído abaixo de uma atividade da água de 0.91; já a maior parte das leveduras e fungos não se conseguem desenvolver abaixo de 0,87 e 0,80, respetivamente. De qualquer forma a redução da  $a_w$  leva a uma fase *lag* maior, o que se mostra importante para a preservação dos produtos alimentares. Por outro lado, valores de  $a_w$  demasiado baixos traduzem-se em alterações de textura, conferindo um efeito “crocante” ao alimento. No entanto, este é apenas um dos parâmetros que permite a obtenção de um ambiente hostil à multiplicação de microrganismos, sendo o controlo da temperatura e do pH juntamente com a  $a_w$  uma forma eficaz de prolongar a vida útil de um alimento (SLADE *et al.*, 1991; CHIRIFE *et al.*, 1996).

## 1.5 Análise sensorial

A qualidade dos alimentos pode ser avaliada com recurso a métodos microbiológicos e físico-químicos. No caso particular da carne, são realizadas contagens de certos tipos de microrganismos e feitas medições de parâmetros como a cor, a  $a_w$  e o pH. A avaliação de parâmetros organoléuticos também acarreta importância significativa na caracterização da carne e seus derivados, sobretudo numa ótica de adaptação do produto às preferências e expectativas do consumidor e de avaliação da frescura com recursos a critérios menos dispendiosos. A análise sensorial deve ser realizada por um painel de provadores treinados, que serão capazes de detetar pequenas alterações na qualidade da carne. Estes irão avaliar a cor e o cheiro, bem como realizar uma apreciação global da frescura. As provas da avaliação sensorial devem ser realizadas sem conhecimento da composição específica da amostra ou das condições a testar, de preferência sem a presença de outras pessoas, num ambiente controlado com condições constantes entre ensaios e provadores (MANCINI e HUNT, 2005).

O *gold standard* para avaliar a cor da carne fresca, sobretudo por se correlacionar fortemente com a perceção do consumidor e com a intenção de compra, é a avaliação visual em detrimento de outras formas de avaliação (CARPENTER *et al.*, 2001).

O tipo de embalagem pode influenciar a perceção da cor e deve ser tido em consideração na realização de quaisquer ensaios; idealmente amostras embaladas devem ser retiradas da embalagem e avaliadas imediatamente a seguir à abertura, por forma a preservarem as propriedades obtidas pela aplicação de qualquer tratamento ou substância no interior da embalagem ou pelas características da própria embalagem. É recomendável o uso de

controles, uma vez que a opinião dos membros do painel de avaliadores pode variar subjetivamente caso não haja qualquer referência ou meio de comparação. A luminosidade é outro fator importante, devendo ser estandardizada para determinado estudo; para maximizar a aparência da cor e minimizar a foto-oxidação, está recomendada luz fluorescente com 1614 lux, com temperatura de 3000-3500 K. Luzes brancas puras ou que confirmem colorações rosadas, amarelas ou verdes são evitáveis (MANCINI e HUNT, 2005).

O uso de painéis de pessoas não treinadas, com escalas menos específicas e menor grau de discriminação entre características pode ser benéfico para alguns estudos, uma vez que se aproxima mais da realidade do consumidor comum. Contudo, apesar de existir uma tendência para desvalorizar a análise visual da cor quando confrontada com métodos quantitativos, os painéis de profissionais treinados apresentam maior grau de sensibilidade para detecção de descoloração pela presença de metamioglobina, maior repetibilidade dos resultados e utilização mais fácil das escalas de cor (O'SULLIVAN *et al.*, 2003a; O'SULLIVAN *et al.*, 2003b).

As escalas de cor mais usuais, apresentam as cores vermelha, rosa, azul e castanha, que podem depois estar presentes com diferentes graus de intensidade. Já os odores desagradáveis ou *off-odors* costumam classificar-se como adocicado, amanteigado, rançoso, ácido, amoniacal e pútrido, estando associados com a deterioração química e a deterioração desencadeada por microrganismos (MANCINI e HUNT, 2005).

## **1.6 Técnicas para aumentar a vida útil de produtos alimentares**

O consumidor atual tem cada vez um leque mais amplo de oferta de diferentes produtos alimentares, sendo que os avanços tecnológicos atuais possibilitaram a melhoria não apenas do aspeto, como da segurança alimentar de praticamente todos os alimentos. As pessoas que compram carne avaliam a qualidade baseando-se sobretudo no odor e na cor da carne, bem como na presença de odores anormais indicadores de deterioração. Com o surgimento de cadeias de distribuição cada vez mais extensas e a facilidade da importação e exportação de bens, incluindo os alimentares, tornou-se cada vez mais premente a necessidade de inibir a deterioração e preservar pelo máximo de tempo possível a qualidade da carne. Os métodos utilizados para isso pretendem então reduzir a carga microbiana presente na carne ou impedir a sua multiplicação durante o transporte e armazenamento, sem que haja a adição de qualquer composto com potencial tóxico ao alimento e mantendo a qualidade e, dentro do

possível, as características do produto original (ALBARRACÍN *et al.*, 2011; LAMBERT *et al.*, 1991).

As técnicas mais empregues na preservação de alimentos envolvem inibir a multiplicação de microrganismos e também retardar a oxidação lipídica. Os métodos mais utilizados são os seguintes (ALBARRACÍN *et al.*, 2011):

- a. Redução da  $a_w$  (cura, secagem, evaporação);
- b. Controlo da temperatura ou aplicação de tratamentos térmicos;
- c. Aumento da acidez ou redução de pH (fermentação ou a adição de ácidos);
- d. Manipulação do potencial de oxidação/redução e adição de conservantes químicos (nitrito, nitrito, sulfitos);
- e. Uso de microrganismos competitivos (*Lactobacillus*);
- f. Embalagem em atmosfera modificada.

A temperatura é o fator que isoladamente apresenta maior influência sobre o crescimento de microrganismos na carne, cujo armazenamento no frio a temperaturas inferiores a 7°C se traduz numa *shelf life* muito superior à temperatura ambiente. É de notar que o impacto da refrigeração, no entanto, varia com o tipo de produto cárneo, com a carga microbiana inicial e com o tipo de microrganismos presentes. A refrigeração seleciona microrganismos psicrófilos, enquanto uma seleção mais extensa é induzida pelo tipo de embalagem, já que a presença de oxigénio afeta de forma diferenciada o potencial de multiplicação das bactérias anaeróbias e aeróbias. O potencial de deterioração depende dos grupos de microrganismos que dominam a matriz da carne e da sua capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis, tais como ésteres, cetonas, aldeídos, compostos sulfurados, aminas e ácidos gordos voláteis (NYCHAS *et al.*, 2008; DOULGERAKI *et al.*, 2012).

O termo “associação deteriorativa” é utilizado para descrever o facto de normalmente este processo ser provocado por múltiplas espécies de microrganismos, que contribuem para a deterioração e trocam metabolitos e nutrientes entre si. Encontram-se estudados vários tipos de relações microbiológicas em ecossistemas alimentares, incluindo interações em que o crescimento ou metabolismo de determinado organismo é favorecido ou inibido pela presença de outro (GRAM *et al.*, 2002).

Os microrganismos capazes de se multiplicar mais eficientemente serão os que se tornam a população dominante e com maior impacto nos processos de deterioração. *Pseudomonas* é o género mais frequentemente encontrado na carne fresca armazenada em condições de aerobiose. Este organismo é progressivamente substituído por microrganismos

mesófilos quando a temperatura se aproxima dos 30°C, nomeadamente por microbiota da família *Enterobacteriaceae*. Em condições de anaerobiose, como o armazenamento em vácuo, predominam as bactérias psicotróficas, tais como *Lactobacillus* spp., enquanto a temperatura for inferior a 20°C e os lactobacilos mesófilos ou *Clostridium* spp. quando a temperatura se aproxima dos 30°C (DOULGERAKI *et al.*, 2012).

Estes dados vêm reforçar a importância da manutenção da temperatura de refrigeração ou congelação ao longo do tempo, já que mesmo sob atmosfera modificada ou vácuo pode haver multiplicação de microrganismos patogénicos caso a mesma seja descurada. Uma vez que as taxas de multiplicação dos diferentes grupos de microrganismos dependem das condições de armazenamento, é desejável modificá-las de forma a impedir a multiplicação de microrganismos totais e, simultaneamente, a dos grupos de microrganismos com maior potencial deteriorativo (LAMBERT *et al.*, 1991).

De entre os métodos de preservação da carne, a refrigeração assume um papel de destaque, no entanto, mesmo assim há multiplicação microbiana durante o período de armazenamento, devido à ação de espécies psicotróficas de bactérias, pelo que as condições de preservação da carne devem ser modificadas como um todo para se obter resultados ótimos. O uso de diferentes técnicas de conservação de forma sinérgica irá constituir uma série de barreiras, de forma a retardar a deterioração (“*hurdle approach*”). Esta abordagem permite reduzir os efeitos nefastos de cada método em particular, o desperdício energético e os preços associados à sua aplicação (LAMBERT *et al.*, 1991; ZHOU *et al.*, 2010).

### 1.6.1 Controlo da temperatura

A manutenção da temperatura da carne fora dos intervalos ótimos para a multiplicação de microrganismos tem um efeito preventivo na deterioração. A refrigeração é o método mais utilizado na carne fresca, podendo ainda utilizar-se a congelação, aplicando temperaturas mais baixas. Ambas as técnicas apresentam eficácia elevada (BEAUFORT *et al.*, 2009).

A refrigeração é dos métodos mais antigos, tendo começado a ser utilizado comercialmente no século XIX. Reduzindo a exposição da carne à temperatura ambiente melhora não só a *shelf life* como também a aparência e a qualidade da carne de um ponto de vista sensorial e microbiológico. A exposição ao ar frio também diminui a atividade da água na carcaça ou peça de carne. A descida controlada e rápida da temperatura produz melhores resultados, no entanto, é necessário considerar o tamanho e espessura das peças em causa,

pois a porção mais central deve atingir a temperatura pretendida e não apenas a parte exposta ao ar (ZHOU *et al.*, 2010).

O regulamento 853/2004 define que carne utilizada como matéria-prima para a produção de preparados de carne não pode atingir temperatura superior a 7 °C durante o transporte e armazenagem e deve ser trazida progressivamente para a sala de preparação, consoante a necessidade. Também define que esta carne não pode exceder os 15 dias após o momento de abate dos animais, no caso da carne de bovino desossada e embalada a vácuo. Por outro lado, esclarece que a temperatura máxima de refrigeração de preparados de carne durante o transporte e armazenagem é 4 °C e no caso da congelação corresponde a no mínimo -18 °C.

A convecção natural do ar, em que o refrigerante é empurrado através de tubos, é lenta e menos controlada, enquanto que a convecção forçada do ar, acompanhada por ventoinhas para promover o movimento do ar é muito mais eficiente. A diminuição rápida da temperatura aumenta o rendimento do produto final, uma vez que a perda de água por evaporação é menor. A refrigeração ultrarrápida da carne antes da instalação do *rigor mortis*, por seu lado, pode provocar endurecimento e encurtamento pelo frio das fibras musculares. A refrigeração por aspersão, por sua vez, é capaz de melhorar a oxigenação da mioglobina superficial sem aumentar a formação de metamioglobina, mantendo uma cor vermelha brilhante e diminuindo a perda de água simultaneamente (FELDHUSEN *et al.*, 1995).

A congelação começou por ser utilizada para a preservação da carne durante o transporte marítimo a longas distâncias, o seu uso apresenta vantagens excepcionais, nomeadamente a diminuição da multiplicação microbiana e das alterações químicas (oxidação lipídica), o que permite a preservação das características originais. A congelação rápida diminui a formação de cristais de gelo intracelulares e consequentemente a perda de água. A taxa de congelação depende do tamanho da peça, da temperatura que se pretende atingir, das suas características de condução do frio, da temperatura do ambiente de congelação, do método utilizado e, no caso de cortes de carne mais pequenos, do material utilizado na embalagem (ZHOU *et al.*, 2010).

A temperatura de -55 °C foi sugerida como sendo ideal para o armazenamento de carne para prevenir completamente as alterações de qualidade. A esta temperatura, as reações enzimáticas, oxidação lipídica e formação de cristais de gelo e atividade microbiana são mínimas, havendo por isso menores ou praticamente nenhuma alterações deteriorativas durante o armazenamento (HANSEN *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2010).

### 1.6.2 Embalagem em atmosfera modificada

Uma vez que a *shelf life* é limitada pela multiplicação microbiana, sobretudo por microrganismos aeróbios deteriorativos, como *Pseudomonas* spp., torna-se lógico adicionar uma barreira adicional em conjunto com a refrigeração para prolongar a *shelf life*. A embalagem em atmosfera modificada (MAP) é um método de conservação que consiste em modificar a atmosfera gasosa que envolve o produto alimentar, utilizando para isso uma embalagem que funciona como barreira pouco permeável a gases de forma a manter a sua constituição inalterada e define-se como a embalagem de produtos alimentares em materiais com uma barreira na presença de gás cuja concentração dos ingredientes foi modificada para alterar ou inibir a multiplicação de microrganismos, retardando a oxidação enzimática, com a intenção de aumentar a *shelf life* (STOOPS, 2015).

A modificação da atmosfera geralmente consiste no aumento da quantidade de dióxido de carbono e pela adição de nitrogénio. Os métodos normalmente utilizados para a alteração da atmosfera de alimentos embalados são o embalamento a vácuo e a alteração da composição da atmosfera dentro das embalagens (LAMBERT *et al.*, 1991).

A embalagem a vácuo é provavelmente o método mais difundido de extensão da *shelf life* e manutenção da qualidade da carne, sendo muito utilizado na indústria da carne. O produto é colocado numa embalagem de filme pouco permeável ao oxigénio, o ar é evacuado e a embalagem selada. A permeabilidade do filme é um fator chave para a eficácia deste método. A contagem de *Pseudomonas* spp. é consideravelmente maior em embalagens com filmes de maior permeabilidade (LI, 2012).

Se realizado corretamente, o O<sub>2</sub> presente será inferior a 1%, havendo uma pequena percentagem de CO<sub>2</sub> produzida pelas bactérias e células musculares; as mudanças nas concentrações relativas destes gases influenciam as populações bacterianas presentes de forma seletiva. Uma elevada percentagem de vácuo minimiza a descoloração da superfície da carne, melhora a aparência da gordura e pode melhorar a aparência geral da carne até trinta e cinco dias. Sob condições de anaerobiose e a temperaturas de refrigeração, *Lactobacillus* spp. apresenta uma taxa de multiplicação mais rápida, o que explica o seu domínio em carne embalada em vácuo, sobretudo quando associado ao seu efeito de inibição da multiplicação de outros microrganismos. Assim, a extensão da *shelf life* da carne embalada em vácuo e

refrigerada é resultado dos efeitos sinérgicos do CO<sub>2</sub>, da baixa tensão de O<sub>2</sub> e da produção de agentes antimicrobianos por parte dos lactobacilos (LIMBO, 2010; STOOPS, 2015).

A maior desvantagem do uso de embalagens a vácuo em cortes de carne é a coloração vermelho púrpura que a carne apresenta devido à forma de desoximioglobina, não sendo esta a cor mais apetecível e preferencial por parte do consumidor. Outra limitação é a alteração da forma do corte de carne e a potencial rutura da embalagem se se estiver na presença de ossos, no entanto, estas são preocupações que podem ser precavidas. Por outro lado, a embalagem em vácuo tem vantagens incontornáveis, nomeadamente diminuição da perda de peso da peça por desidratação, preservação da cor do músculo no seu estado original e prolongamento da *shelf life*. Como alternativa a este tipo de embalagem, a carne pode ser embalada em atmosfera modificada para uma melhor preservação da cor. Este método também pode permitir uma redução da degradação microbiana. As atmosferas utilizadas consistem em misturas de concentrações variáveis de oxigénio, dióxido de carbono e nitrogénio, apesar de ser possível utilizar atmosferas com apenas um destes gases. O oxigénio tem como função promover a coloração vermelho cereja da carne, mantendo a mioglobina na forma oxigenada (oximioglobina), estimula também o crescimento de bactérias aeróbias em detrimento de bactérias anaeróbias, sobretudo de *Pseudomonas* spp. e *B. thermosfacta* (LAMBERT *et al.*, 1991; LI, 2012).

A principal função do nitrogénio é prevenir o colapso da embalagem quando o CO<sub>2</sub> se dissolve no tecido muscular. O nitrogénio não apresenta efeitos antimicrobianos, nem influencia a coloração da carne. O CO<sub>2</sub>, por seu lado apresenta atividade antimicrobiana quando adicionado a concentrações de 20% é capaz de alterar a microbiota presente. A presença de CO<sub>2</sub> nas embalagens de carne leva à inibição do crescimento microbiano e provoca uma mudança na microbiota dominante para grupos bacterianos com menos potencial de deterioração. (LIMBO, 2010).

A inibição do crescimento de microrganismos feita pelo CO<sub>2</sub> é potenciada pelo armazenamento a baixas temperaturas, uma vez que a dissolução do gás na fração aquosa da carne é superior a temperaturas baixas do que a altas. A eficácia destas duas medidas combinadas é de particular relevância na multiplicação de *Pseudomonas* spp., havendo por isso uma extensão do período de preservação das características da carne (NYCHAS, 2008).

A combinação de gases ideal, bem como as concentrações relativas destes, é tema ainda em discussão, apesar de haver consenso de que a presença de oxigénio é essencial para a preservação da cor dentro de parâmetros preferenciais do consumidor e que a presença da

mioglobina na forma oximioglobina é a mais atrativa. É necessário ponderar que o oxigénio também promove o desenvolvimento de bactérias deteriorativas e aumenta a taxa de oxidação lipídica. O uso de monóxido de carbono a 1% permite manter a cor da carne e impedir a multiplicação microbiana, no entanto a sua utilização não se encontra particularmente difundida devido à não autorização da sua utilização na EU, devido à eventual toxicidade do gás e à má perceção por parte do consumidor da sua presença em embalagens de alimentos (LI, 2012; SINELLI, 2010).

Os efeitos positivos induzidos pela MAP podem ser largamente reduzidos se o armazenamento ocorrer a temperaturas inadequadas. De facto, quando a carne fresca em MAP é armazenada a temperaturas superiores às sugeridas, não só o crescimento microbiano e as reações químicas aceleram, mas a atmosfera da embalagem muda, contribuindo para a deterioração antes da data definida para o fim de validade. Infelizmente, embora a maioria dos países tenha estabelecido regulamentos indicando limites máximos de temperatura para o armazenamento refrigerado, estes são frequentemente violados (LIMBO, 2010).

Tabela 1: Associação de microrganismos dominantes em carne fresca armazenada a 0-4°C sob diferentes atmosferas de gás adaptado de NYCHAS *et al* (2008)

Composição de gás	Microrganismo
Ar	<i>Pseudomonas</i> spp.
>50% CO <sub>2</sub> com O <sub>2</sub>	<i>B. thermosphacta</i>
<50% CO <sub>2</sub> com O <sub>2</sub>	<i>B. thermosphacta</i> e BAL
100% CO <sub>2</sub>	BAL
Vácuo	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>B. thermosphacta</i> , <i>Sh. putrefaciens</i>

### 1.6.3 Aditivos

O Regulamento (CE) nº 1129/2011 define e restringe o tipo de aditivos que podem ser utilizados em cada produto alimentar. Em preparados pré-embalados de carne fresca picada, apenas se pode utilizar acetato de potássio (E261), acetato de sódio (E262), ácido ascórbico (E300), ascorbato de sódio (E301), ascorbato de cálcio (E302), lactato de sódio (E325) e potássio (E326), ácido cítrico (E330) e citratos de sódio (E331), potássio (E332) e cálcio (E333). Os sulfitos (E338) podem ser utilizados em preparados de carne fresca picada se forem adicionados no mínimo 4% de cereais ou outros vegetais à carne.

Vários microrganismos produzem álcoois e ácidos através da fermentação anaeróbia, que inibem outros microrganismos que estão presentes concomitantemente e que podem promover a deterioração dos alimentos, podendo então servir o propósito de contribuir para a preservação. O ácido láctico é frequentemente utilizado com eficácia para diminuir a multiplicação microbiana em carnes frescas. Contudo, os ácidos orgânicos podem provocar descoloração e a formação de odores desagradáveis. O uso de sais, como lactato de sódio e cloreto de sódio, também é comum na indústria da carne, uma vez que conferem sabor, prolongam o tempo de prateleira e aumentam a segurança microbiológica dos produtos. Os efeitos antimicrobianos dos lactatos provêm da sua capacidade de diminuir a atividade da água e da inibição direta pelo ião lactato (ZHOU *et al.*, 2010).

Diversos compostos naturais têm vindo a ser investigados como alternativa aos aditivos químicos usuais, entre os quais se encontram óleos essenciais e a lisozima. Várias especiarias e óleos essenciais têm propriedades de conservação e aumentam comprovadamente o período de conservação dos produtos. Aqui pode incluir-se eugenol dos trevos e isotiocianato de alila das sementes de mostarda (STILES e HASTINGS, 1991; ZHOU *et al.*, 2010).

#### 1.6.3.1 Reguladores de acidez

A acidificação é utilizada na conservação de alimentos já há muito tempo, tendo tido a sua origem na ação dos microrganismos sobre substratos específicos. Com a evolução da tecnologia alimentar tornou-se vulgar a utilização direta de certos ácidos orgânicos, tais como o ácido cítrico, láctico e acético e seus sais alcalinos. Os ácidos atuam de duas formas distintas: por um lado aumentam a concentração de hidrogeniões que causa diminuição direta do pH e

por outro exercem uma ação antimicrobiana específica, dependente da fração não dissociada dos ácidos. (SINELL 1981).

#### **1.6.3.1.1 Ácido acético e seus sais**

A ação do ácido acético e seus sais (acetato de potássio e acetatos de sódio) é devida sobretudo à diminuição do pH quando adicionado, não tendo atividade microbiana direta, atuando apenas devido à diminuição de pH, resultante da dissociação dos diacetatos (ZHOU *et al.*, 2010).

#### **1.6.3.1.2 Ácido lático e seus sais**

O uso de sais, como o lactato de sódio, também é comum na indústria da carne, uma vez que conferem sabor, prolongam o tempo de prateleira e aumentam a segurança microbiológica dos produtos. Os efeitos antimicrobianos dos lactatos provêm da sua capacidade de diminuir a atividade da água e da inibição direta pelo ião lactato (ZHOU *et al.*, 2010).

A adição de lactato de sódio ou lactato de potássio causa a diminuição da atividade da água ( $a_w$ ), o que vai provocar uma inibição do crescimento microbiano de forma indireta. Um estudo realizado em fiambre fatiado demonstrou que a substituição de parte do cloreto de sódio utilizado por lactato de sódio permitia aumentar a vida útil do produto (KOOS 1991).

#### **1.6.3.2 Antioxidantes**

Os antioxidantes são definidos como substâncias usadas para preservar os alimentos, retardando a sua deterioração, rancificação e descoloração originadas pela oxidação. Devem ser adicionados o mais rapidamente possível para serem eficientes, em virtude de não possuírem capacidade de inverter a oxidação já ocorrida (BUCK, 1991). Antioxidantes naturais extraídos de especiarias e frutos são usados há séculos para proteção de alimentos como é o caso do Rosmaninho, usado frequentemente apresenta diversas substâncias com propriedades antioxidantes. A acerola é um fruto que também apresenta várias substâncias com propriedades comprovadamente antioxidantes e é bem conhecida como uma excelente fonte de vitamina C (EVANS, 1991, REALINI, 2015).

A ação dos antioxidantes nos alimentos é devida à interferência que causam na formação de radicais livres. Estes compostos atrasam ou inibem a fase de iniciação ou de formação de radicais livres, cedendo o antioxidante um próton ao radical de gordura livre, adquirindo este maior estabilidade. Os antioxidantes devem formar radicais livres estáveis e de baixa energia, de forma a não favorecer a propagação da oxidação das gorduras (BUCK, 1991).

#### **1.6.3.2.1 Ácido ascórbico e seus sais**

Igualmente conhecido como vitamina C, tem um poder redutor elevado e apresenta um sabor ácido sendo utilizado pelas suas propriedades antioxidantes. O seu sal sódico L-ascorbato de sódio é mais estável, no entanto apresenta menor atividade redutora e ambos são insolúveis em lípidos não desempenhando papel de antioxidante nos tecidos adiposos, no entanto na carne reforça o poder redutor do meio muscular e protege a mioglobina da oxidação, retardando o aparecimento de colorações acastanhadas na carne, quer isoladamente, quer em combinação com outras substâncias de origem sintética ou natural (SANCHÉZ-ESCALANTE *et al.*, 2003; AHN e NAM, 2004).

O uso de ácido ascórbico em preparados de carne como a começou a ser explorado na década de 80, uma experiência realizada nessa altura demonstrou que a adição de ácido ascórbico em *burger meat* aumentou a *shelf life* do produto, utilizando-se tanto análise espectrofotométrica como escalas visuais para esta avaliação (REALINI, 2015).

Alguns estudos com *burger meat* indicaram que a adição simultânea de ácido ascórbico e alecrim incrementaram a *shelf life* consideravelmente, diminuindo a descoloração e a produção de *off-odors* (SANCHÉZ-ESCALANTE *et al.*, 2003).

#### **1.6.3.2.2 Ácido cítrico e seus sais**

O ácido cítrico foi isolado pela primeira vez a partir de sumo de limão, este composto forma quelatos com iões metálicos livres, dando origem a complexos mais ou menos estáveis, impedindo assim que estes iões possam provocar reações de oxidação indesejáveis, por esta razão se utiliza o ácido cítrico como sinérgico com outros antioxidantes na preparação de transformados de carne. O ácido cítrico ou os seus sais são habitualmente adicionados juntamente com outros antioxidantes para potenciar o efeito destes do seguinte modo:

- Promover um meio ácido para dar estabilidade aos antioxidantes e gorduras
  - Regenerar os antioxidantes primários
  - Formar quelatos complexando assim metais contaminantes como o ferro e o cobre
- (BUCK, 1991)

#### 1.6.4 Sal

A importância do sal como substância conservante de alimentos é conhecida desde o antigo Egito e persistiu até aos nossos dias, apesar de hoje em dia se utilizar em conjunto com outras substâncias. Adicionalmente, é um ingrediente com grande importância na indústria alimentar devido às propriedades organolépticas que proporciona. (SINELL 1981). Confere ao alimento um sabor característico, inconfundível, podendo transformar-se em amargo quando estão presentes outros catiões além do sódio. Exerce várias funções nos produtos cárneos destacando-se o papel conservador, saborizante e ação sobre proteínas. Tem a capacidade de diminuir a atividade de água de um sistema (valor  $a_w$ ), diminuindo assim a viabilidade dos microrganismos e prolongando a capacidade de conservação do alimento (ALBARRACÍN *et al*, 2011; LIEM *et al.*, 2011).

O cloreto de sódio é um micronutriente essencial para o qual grande parte dos animais incluindo o ser humano, apresentam elevada apetência. Esta apetência é influenciada por fatores individuais, mas, sobretudo, “aprendida” através da exposição a alimentos com sal. Entre as suas funções fisiológicas, encontra-se regulação do equilíbrio osmótico e ácido-base, transmissão neuronal, função renal e contração do miocárdio (LIEM *et al.*, 2011).

Os produtos cárneos processados correspondem a uma das principais fontes de sódio da dieta, na forma de cloreto de sódio. A utilização de sal e o consequente consumo de sódio está associada maioritariamente a cloreto de sódio, mas o sódio é utilizado em diversos outros aditivos utilizados nos produtos cárneos (DESMOND, 2006).

Apesar dos seus efeitos benéficos e de ser essencial para o bom funcionamento do organismo, o consumo atual de sal pelas sociedades ocidentais excede as doses diárias recomendadas. Este consumo excessivo encontra-se associado ao aumento das doenças cardiovasculares, cancro do estômago, diminuição da densidade óssea e obesidade (LIEM *et al.*, 2011).

Dados recolhidos em todo o mundo sugerem que o consumo médio de sódio está bem acima do necessário para a função fisiológica e em muitos países é superior a 2 g/dia

(equivalente a 5 g de sal por dia), valor recomendado pela Organização Mundial de Saúde. O consumo médio de sal na maioria dos países do mundo é de aproximadamente 9 a 12 g/d (3,6 a 4,8 g/d de sódio), sendo que em crianças com mais de 5 anos é geralmente superior a 6 g/d, aumentando com a idade (RUUSUNEN e PUOLLANE, 2005; HE e MACGREGOR, 2010).

A ingestão de sódio está relacionada linearmente com hipertensão arterial, sendo as doenças cardiovasculares as que se encontram mais correlacionadas com o consumo excessivo de sal. Globalmente, a hipertensão arterial afeta quase metade dos adultos, estimando-se que seja responsável por cerca de 49% de todas as doenças coronárias e 62% de todos os acidentes vasculares-cerebrais (ABURTO *et al.* 2013).

Assim, apesar de premência da redução do consumo de sal, as medidas adotadas são muitas vezes insuficientes, já que a ausência ou redução do sal nos produtos alimentares provoca alterações do sabor consideradas inaceitáveis pelo consumidor. O custo é outra barreira significativa à substituição do sal, uma vez que é um dos ingredientes mais económicos para adicionar aos alimentos (DESMOND, 2006; LIEM *et al.*, 2011).

Estudos desenvolvidos no sentido de permitir a redução do sal, devem abordar os efeitos desta sobre as funções tecnológicas que o sal possibilita, tais como a capacidade de retenção de água, a textura, o impacto sensorial, a estabilidade do produto e o prazo de validade. A substituição ou redução de sal ocorre por meio do uso de substitutos de cloreto de sódio tais como cloreto de potássio ou fosfatos; intensificadores de sabor e otimização da forma física do sal. (DESMOND, 2006).

### **1.7 *Salicornia ramosissima***

A salicórnia é uma planta halófito – consegue completar o seu ciclo de vida em ambientes com uma elevada concentração de sal –, pelo que se caracteriza pela presença de elevadas concentrações de sais nos tecidos, uma vez que os absorve diretamente do solo ou mar, sendo capaz de se desenvolver em condições extremas de salinidade. O armazenamento dos sais é efetuado numa glândula especializada, garantindo a sobrevivência da planta. Devido ao facto de armazenar uma grande concentração de sais nos tecidos, é capaz de conferir um sabor salgado. Apresenta elevado valor nutricional devido à presença considerável de compostos com propriedades antioxidantes comprovadas, tais como a vitamina C e os carotenos (DAVY *et al.*, 2001; YENSEN, 2008; VENTURA *et al.*, 2011).

A Salicórnica inclui uma imensa panóplia de espécies e variedades devido à endogamia e plasticidade fenotípica do género (DAVY *et al*, 2001). O género Salicórnica L. está amplamente distribuído na Europa, Ásia, América do Norte e África do Sul e é composta por aproximadamente 30 espécies. A Salicórnica tem caules suculentos e folhas extremamente reduzidas. Tem um conjunto diversificado de aplicações, desde utilização como aditivo na fabricação de vidro e sabão e no desgorduramento de tecidos, ao seu uso em dietas animais e humanas e, mais recentemente, na produção de biocombustíveis (Kim *et al.*, 2014). Além disso, diversos estudos identificaram muitos benefícios para a saúde, incluem possível atividade antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, imunomoduladora, antihiperlipidémica e antihiperlipidémica. Estas propriedades benéficas foram associadas com a presença de compostos químicos como os esteróis, derivados do ácido clorogénico, glicosídeos de quercetina e saponinas triterpenóides. (Woods *et al*, 2017)

Em relação às qualidades nutricionais a Salicornia L. contém aminoácidos essenciais, ácidos gordos, vitaminas (vitaminas A e C, entre outros), é rica em fibras e em uma grande diversidade de micronutrientes, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro e iodo.

A *Salicornia ramosissima* é uma espécie nativa da flora portuguesa, também presente em Espanha, França, Inglaterra e Alemanha. Em Portugal, foi considerada durante muito tempo uma planta invasora das salinas, e só recentemente despertou interesse como produto gourmet devido ao seu forte sabor salgado e textura crocante. Os caules carnudos deste vegetal são bastante requisitados pela cozinha gourmet, não só pelo seu sabor salgado, mas também pelo seu valor nutricional (nomeadamente a nível de minerais e vitaminas antioxidantes, como vitamina C e  $\beta$ -caroteno).



Figura 3: *Salicornia ramosissima* na ria de Aveiro (<http://www.ilha.ilhadospuxadoiros.pt/galeria.aspx>)

A utilização da *Salicornia ramosissima* como um ingrediente alimentar funcional já foi testada. Foi introduzida, com sucesso, em pão com redução de sal (Woods *et al*, 2017)

O uso de *Salicornia herbacea* em salsichas com redução de sal e gordura conduziu a uma diminuição das perdas na cozedura e a um aumento da estabilidade da emulsão. Outros investigadores concluíram que a utilização de *Salicornia herbacea* a uma concentração de 2% em panados de porco melhorava aceitabilidade geral, a textura, a aparência, a cor e o sabor quando comparada com o controlo que tinha sal adicionado. Para além disso, concluíram que a utilização de salicórnica aumenta a preferência, a qualidade e a atividade antioxidante, o que eleva o valor do produto final (KIM *et al.*, 2014; JOO e CHOI, 2014).

### 1.8 *Malpighia ermaginata*

Devido a preocupações com a segurança toxicológica dos antioxidantes sintéticos, as carnes e os produtos cárneos que contêm antioxidantes naturais são mais desejáveis do ponto de vista do consumidor. As plantas naturais são consideradas um importante objeto de investigação, a fim de fornecer novas fontes de antioxidantes naturais, e a sua investigação e consequente utilização está a tornar-se altamente relevante (REILINI *et al.*, 2015).

*Malpighia ermaginata* usualmente conhecida como acerola é um fruto oriundo da Índia ocidental, também cresce na América do Sul principalmente no Brasil devido à sua boa adaptação ao clima e ao solo. Rica em fitoquímicos com conhecidas propriedades antioxidantes, nomeadamente a vitamina C. Este fruto tem sido utilizado na indústria cosmética e alimentar precisamente pela sua atividade antioxidante. As frutas enquanto verdes

podem conter até 3% de vitamina C, o que as torna uma fonte natural deste composto, apesar de potenciais perdas que possam ocorrer durante o processamento e armazenamento. Recentemente tem sido prestada mais atenção à sua constituição em termos de carotenos e bioflavonoides devido às suas propriedades antioxidantes. Sabe-se hoje que a acerola apresenta 17 pigmentos carotenos e em relação aos bioflavonoides, os principais componentes da acerola são as antocianinas e os flavonóis (NAGAMINE *et al.*, 2004; MEZADRI *et al.* 2008).

MEZADRI *et al.* (2008) concluíram que a polpa e o sumo de acerola apresentam um grande poder antioxidante *in vitro*, e também que a contribuição de vitamina C para a atividade antioxidante da acerola varia entre 40% e 83%, sendo o restante devido aos polifenóis, principalmente ácidos fenólicos. Desta forma o fruto e derivados de acerola são potentes antioxidantes e podem ter valor potencial como ingredientes alimentares funcionais.



Figura 4: Árvore e fruto *Malpighia emarginata* (<https://ntbg.org/database/plants/detail/malpighia-emarginata>).

Em 2015, foi publicado um dos primeiros estudos em que se aplica extrato de acerola numa concentração de 0,15% em carne fresca, mais precisamente em preparados de carne. Os resultados indicam que o uso de acerola como antioxidante é um método eficaz na diminuição da alteração da cor e oxidação lipídica destes produtos (REILINI *et al.*, 2015).



## **CAPÍTULO II - Objetivos**



## 2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- Avaliar a ação da adição de *Salicornia ramossissima* nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.;
- Avaliar a ação da adição de *Malpighia Ermaginata* nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.;
- Verificar se são substâncias passíveis de aumentar a vida útil de hambúrgueres armazenados em atmosfera modificada.



## **CAPÍTULO III - Material e Métodos**



### 3.1 Preparação, embalagem, armazenamento e processamento das amostras

Foram utilizados os músculos *semitendinosus* e *semimembranosus* excisados (4 dias post mortem), de bovino Mertolengo D.O.P. (machos; n=3) e acondicionados em embalagens a vácuo. Os 3 lotes de carne foram transportados para o laboratório TeQSA em condições de refrigeração ( $T^a < 4^{\circ}\text{C}$ ) e de higiene, de forma a preservar as qualidades da carne e evitar a sua contaminação ou deterioração.

Posteriormente, já no interior das instalações do laboratório, os 3 lotes foram fisicamente separados e armazenados a uma  $T^a$  de  $3^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  enquanto decorria a preparação das amostras.

No mesmo dia a carne foi preparada na sala de transformação do laboratório TeQSA, previamente higienizada e o ambiente refrigerado ( $T^a 12^{\circ} \pm 0,5$ ). Começou-se por extrair a gordura presente e reduzir as peças de carne a pedaços de aproximadamente  $4 \text{ cm}^3$ , com o auxílio de uma faca de inox e uma luva de inox anticorte, esterilizadas em água a  $82^{\circ}\text{C}$ . Inicialmente recolheu-se amostras de cada lote de carne para análise microbiológica e de seguida foi prontamente picada numa picadora (PM70, Mainca; Espanha) com um disco perfurado de 4mm de forma a obter um corte fino típico de hambúrguer. Cada lote foi separado em 6 partes iguais e cada uma das partes homogeneizada com os vários ingredientes que correspondem a cada uma das condições testadas. Foram testados dois ingredientes diferentes de forma independente e em conjunto, o extrato de acerola (Formulab, LDA, Portugal) e a salicórnica em pó (Horta da Ria, LDA, Portugal) de acordo com as Tabelas 2 e Tabela 3.

Tabela 2: Planeamento experimental do efeito da acerola em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.

	Sal (1%)	Extrato de acerola (0,3%)
<b>Controlo</b>	-	-
<b>Sal</b>	✓	-
<b>Acerola</b>	✓	✓

Tabela 3: Planeamento experimental do efeito da salicórnia em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.

	Sal (1%)	Salicórnia em pó (%)
<b>Controlo</b>	-	-
<b>Sal</b>	✓	-
<b>Salic. 1%</b>	-	<b>1</b>
<b>Salic. 1,5%</b>	-	<b>1,5</b>
<b>Salic. 2%</b>	-	<b>2</b>

Por forma a obter uma correta homogeneização de todos os constituintes do hambúrguer, os ingredientes (condimentos) foram previamente misturados com 15 ml de água destilada, formando uma mistura homogénea e introduzidos na carne picada, 5mL de cada vez em 3 pontos aleatórios da carne, enquanto esta era misturada em velocidade lenta numa misturadora durante 30 segundos.

De seguida foram moldados hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P. de 20,0g±0,5g, com 1 cm de espessura e 4 cm de diâmetro, com o auxílio de uma placa de Petri. Foram embalados individualmente em sacos PA/PE co-extrudido (Formulab, LDA, Portugal), submetidos a atmosfera modificada (70% O<sub>2</sub>: 30% CO<sub>2</sub>; Air liquide, Portugal) e selados numa máquina de embalagem própria para o efeito (V-420 SGA, SAMMIC, Espanha).

No total foram produzidos 315 hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P, 15 hambúrgueres por cada uma das 6 condições, em triplicado (três lotes). Em cada um dos 5 tempos analisados eram utilizados 3 hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P de cada condição (microbiologia, análise sensorial e análises físico-químicas).

As amostras foram armazenadas a 1,5°C±0,5 numa câmara frigorífica e analisadas nos dias 1, 3, 5, 7, 10. A dinâmica experimental consistiu em cada dia de análise a realização da análise microbiológica primeiro, seguida da análise da cor instrumental (CIELAB) e por fim a análise sensorial. Devido ao tempo despendido durante a realização dos procedimentos anteriormente referidos foi necessário proceder à ultracongelção da amostra (-18°C±0,5) para posteriores análises físico-químicas (pH e atividade da água). A amostra foi posteriormente cuidadosamente descongelada até à temperatura de refrigeração (T° 2°C±0,5) e depois até à temperatura ambiente de forma a evitar alterações significativas principalmente ao nível da a<sub>w</sub>

permitindo a absorção de qualquer condensação que tenha surgido durante o processo de congelação e descongelação conforme descrito por VOYSEY (1999).

### 3.2 Análise microbiológica

A análise microbiológica foi feita inicialmente, às peças de carne, antes da produção dos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P onde se recolheram 10,0g de amostra, em condições assépticas, de cada um dos lotes para quantificação de microrganismos mesófilos totais e psicrotróficos totais, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Brochotrix thermosphacta*, BAL, fungos, *E. coli*, assim como 25,0g de amostra para pesquisa de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*.

Posteriormente a análise microbiológica foi executada nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 aos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P produzidos. Os hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P foram sucessivamente retirados da refrigeração de acordo com a necessidade. Todas as condições em estudo foram analisadas numa câmara de fluxo laminar em meio estéril, pesando-se 10,0g de cada hambúrguer de bovino Mertolengo D.O.P, que foi posteriormente diluído em 90 ml de solução de triptona sal (triptona a 0,3% e NaCl a 0,85%, esterilizada a 121°C durante 15 minutos) dentro de um saco “Stomacher” e homogeneizada num “Stomacher” durante 90 segundos. As diluições decimais sucessivas foram realizadas em tubos de ensaio onde se juntou 1ml da solução proveniente do saco de “Stomacher” com 9 ml de triptona sal esterilizada. De seguida, realizaram-se as sementeiras por superfície ou por incorporação nos repetivos meios de cultura. Colocaram-se as placas a incubar em estufas (ipp260, Memmert, Alemanha), de acordo com o tempo e temperatura estipulados para cada um dos microrganismos a analisar.

### **3.2.1 Normas de enumeração microbiológica**

#### **3.2.1.1 Isolamento e contagem de microrganismos mesófilos (aeróbios totais a 30°C)**

A sementeira para deteção destes microrganismos foi feita de acordo com a norma ISO 4833 (1991), por incorporação de 1 ml da suspensão original e das respetivas diluições, em meio de cultura seletivo PCA (Plate Count Agar) (Liofilchem 610040). As placas semeadas foram incubadas a 30°C durante 72 horas e posteriormente efetuou-se a contagem das colónias. Os resultados foram expressos em log ufc/g.

#### **3.2.1.2 Isolamento e contagem de microrganismos psicrotróficos (aeróbios totais a 7°C)**

Tal como para os mesófilos totais, a sementeira foi feita de acordo com a Norma Portuguesa 2307 (1987), por incorporação em meio de cultura seletivo PCA (Plate Count Agar) (Liofilchem 610040). de 1 ml da suspensão original e das respetivas diluições. As placas semeadas foram incubadas a 7°C, durante 10 dias e posteriormente efetuou-se a contagem das colónias. Os resultados foram expressos em log ufc/g.

#### **3.2.1.3 Isolamento e contagem de Enterobacteriaceae**

A sementeira foi feita seguindo a norma ISO 5552 (1997), por incorporação de 1 ml da suspensão original e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo VRBG (Violet Red Bile Glucose) Agar (Scharlau 01-295-500) com dupla camada.

Colocaram-se as placas a 37°C, após 24 horas foi efetuada a contagem de colónias típicas de coloração púrpura (cor rosa a vermelho, com ou sem halos de precipitação, ou colónias mucoides sem cor definida). De acordo com a norma, repicaram-se 5 colónias para agar nutritivo e colocaram-se a 30°C durante 24 horas de modo a fazer o teste da oxidase (confirmação bioquímica) e capacidade de fermentação da glucose em meio Glucose Agar (Harrigan e McCence, 1979). Considerou-se positivo quando o resultado da oxidase foi negativo e o da glucose positivo. Após contagem das colónias e confirmação, os resultados foram expressos em log ufc/g.

#### **3.2.1.4 Isolamento e contagem de *Pseudomonas* spp.**

A sementeira foi feita de acordo com a Norma Francesa V04-504(AFNOR) (1998), por incorporação, de 1 ml da suspensão original e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo CFC (Cetrimide, Fucidin, Cephaloridine) Agar com *Pseudomonas* agar base (OXOID CM0559) e suplemento selectivo CFC (OXOID SR0103).

As placas semeadas foram incubadas a 25°C durante 72 horas. Após a contagem das colónias, das quais 5 foram repicadas para agar nutritivo e incubadas a 30°C durante 24 horas, sendo posteriormente sujeitas a confirmação bioquímica pela prova da oxidase (positiva) e pelo crescimento em superfície em meio de Kligler (Kligler Iron Agar) (OXOID CM0033). Após contagem das colónias e confirmação os resultados foram expressos em log ufc/g.

#### **3.2.1.5 Isolamento e contagem de *Brochotrix thermosphacta***

A sementeira foi feita seguindo a norma ISO 13722 (1996), por incorporação de 1 ml da suspensão original e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo STAA (OXOID CM0881). Colocaram-se as placas a 25°C, após 48 horas foi efetuada a contagem de colónias típicas. De acordo com a norma, repicaram-se 5 colónias para agar nutritivo e colocaram-se a 30°C durante 24 horas de modo a fazer o teste da oxidase (confirmação bioquímica). Considerou-se positivo quando o resultado da oxidase foi negativo. Após contagem das colónias e confirmação os resultados foram expressos em log ufc/g.

#### **3.2.1.6 Isolamento e Contagem de Bactérias do ácido láctico**

A sementeira foi feita de acordo com a Norma Francesa V 04-503 (AFNOR) (1998), por incorporação de 1 ml da suspensão original e das respetivas diluições, em dupla camada do meio de cultura seletivo MRS (Man Rogosa Sharpe) Agar (OXOID CM0361) e posterior contagem das colónias. Os resultados foram expressos em log ufc/g.

### **3.2.1.7 Isolamento e contagem de Fungos (bolores e leveduras)**

A sementeira foi feita seguindo a norma ISO 13681 (1995), espalhando à superfície 0,1 ml da suspensão original e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo Chloramphenicol Glucose Agar (VWR 84604.0500). As placas semeadas foram incubadas a 25°C durante 3 dias. Após contagem das colónias, os resultados foram expressos em log ufc/g.

### **3.2.1.8 Isolamento e contagem de *Salmonella* spp.**

A sementeira foi feita seguindo a norma ISO 6579 (2002), espalhando à superfície 0,1 ml da suspensão original e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo Rappaport-Vassiliadis (CM0669 OXOID). As placas semeadas foram incubadas a 41°C durante 24 horas. E depois em meio de enriquecimento Muller-Kauffmann (CM1048 OXOID). Posteriormente inoculou-se em meio de cultura seletivo agar XLD (CM0469 OXOID) e incubou-se a 37°C durante 24 horas. Por fim repicaram-se 5 colónias de cada placa para agar nutritivo incubado a 37°C durante 24 horas e efetuou-se o teste de confirmação com o auxílio do agar TSI. Consideraram-se positivos quando o declive apresentava uma coloração vermelha e a base amarela, com formação de gás. Após contagem das colónias e confirmação os resultados foram expressos em log ufc/g.

### **3.2.9 Isolamento e contagem de *Listeria monocytogenes***

A sementeira foi feita seguindo a norma ISO 11290-1 (1996), consistindo numa etapa de enriquecimento primário, seguido de um enriquecimento secundário e, posteriormente, inoculação em dois meios sólidos seletivos: o meio CHROMagar e o Oxford Agar ou o. As colónias no meio CHROMagar são verde-azuladas. No meio Oxford Agar as colónias apresentam um halo negro à sua volta. Após contagem de colónias típicas, isolaram-se as colónias suspeitas e efetuou-se o teste de coloração de Gram e o teste de mobilidade. Após contagem das colónias e confirmação os resultados foram expressos em log ufc/g.

### 3.3 Análises físico-químicas

#### 3.3.1 pH

A medição de pH foi realizada aos dias 1, 3, 5, 7 e 10. O valor de pH foi obtido através da média aritmética de três medições sucessivas realizadas em pontos aleatórios da amostra com um medidor de pH (WTW GmbH, PH 330i, Alemanha) acoplado a uma sonda colocada diretamente no hambúrguer de bovino Mertolengo D.O.P.

#### 3.3.2 Atividade da água

As amostras foram lentamente aquecidas até aos 25°C (temperatura ótima de medição) de forma a não ocorrer evaporação ou condensação e a medição da atividade da água foi realizada aos dias 1, 3, 5, 7 e 10.

Recorreu-se a um higrómetro eletrónico (Rotronic, HygroLab C1, Suíça), com duas sondas acopladas com resolução de  $\pm 0,001 a_w$  e precisão entre 0,01 e 0,02  $a_w$  para a obtenção dos resultados.

#### 3.3.3 Cor instrumental

A medição da cor foi realizada aos dias 1, 3, 5, 7 e 10 imediatamente após a abertura da embalagem de atmosfera modificada e antes da realização da análise sensorial. Esta medição foi realizada com recurso a um colorímetro Minolta Chromo Meter Cr-310 (Konica Minolta, Osaka, Japan) no espaço CIE-LAB (*Commission Internationale de l'Eclairage*, 1976) com observador padrão de 2°, iluminante D65 e um diâmetro de abertura de 4 mm.

Os resultados foram obtidos através da média aritmética de três medições sucessivas realizadas em pontos aleatórios da amostra, resultando nos três parâmetros de cor do espaço CIE-LAB:  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

### 3.4 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada em todos os tempos de estudo por um painel de provadores, constituído por 4 membros com experiência em avaliação sensorial de carne de bovino. As amostras foram avaliadas 60 minutos após a abertura da embalagem numa sala de análise sensorial localizada no laboratório TeQSA da UTAD. Todos os hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P estavam refrigerados a  $3^{\circ}\text{C}\pm 0,5$  e foram sujeitos à mesma iluminação e apresentados de forma individual e aleatória a cada membro do painel de provadores, que tinha em sua posse a ficha de análise sensorial (uma para cada hambúrguer de bovino Mertolengo D.O.P) e procedeu à respetiva avaliação.

As características avaliadas nesta análise foram as seguintes:

- Cor: vermelho vivo a vermelho escuro (escurecimento da cor vermelha), bege a castanho (intensidade da cor castanha);
- Intensidade do cheiro a carne deteriorada (de ausente até muito intenso);
- Cheiros detetados: adocicado, amanteigado, ranço, ácido, amoniacal, pútrido;

Estas características culminaram na apreciação global de frescura (AGF) que foi avaliada através de uma escala contínua de 0 a 9 cm. Posteriormente considerou-se:

- 6 a 9 cm (inclusive): carne fresca (F);
- 3 a 6 cm (inclusive): carne semi-fresca (SF);
- 0 a 3cm (inclusive): carne deteriorada (D).

### 3.5 Análise de dados

A análise de dados realizou-se com base na análise de variância que permite avaliar se existe uma diferença significativa entre as médias de um determinado conjunto de dados e se os fatores testados exercem influência em alguma variável dependente.

O efeito da adição de extrato de acerola e o efeito da adição de salicórnia foram avaliados através de ANOVA.

Considerou-se:

- Efeito não significativo quando  $p \geq 0,05$
- Efeito significativo quando  $p < 0,05$
- Efeito muito significativo quando  $p < 0,01$
- Efeito altamente significativo quando  $p < 0,001$

Quando foram encontradas diferenças significativas entre grupos pelo teste ANOVA foi utilizado, à posteriori, o teste HSD (“Honestly Significantly Different”) de Tukey de forma a aferir quais os grupos que diferiram significativamente entre si.

Por fim foi feita uma análise de multivariância através do coeficiente de correlação de Pearson que mede o grau de correlação entre duas variáveis. Apresenta valores entre 1 e -1 (sendo que  $p=1$  representa uma correlação positiva perfeita entre duas variáveis,  $p=-1$  representa uma correlação negativa perfeita entre duas variáveis e  $p=0$  significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra). Esta análise foi efetuada tendo em conta todas as amostras em estudo e todas as variáveis analisadas.

Toda a análise estatística foi feita com o auxílio do software JMP 14.



## **CAPÍTULO IV - Resultados e Discussão**



## 4.1 Determinações microbiológicas

### 4.1.1 Determinações microbiológicas da carne fresca de bovino Mertolengo D.O.P

Na tabela 4 é possível observar as contagens microbianas analisadas na carne fresca de bovino Mertolengo D.O.P antes da produção dos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P e imediatamente após o momento de abertura da embalagem de vácuo que proveio diretamente da sala de desmancha. Observa-se que não foram detetadas as bactérias patogénicas: *Salmonella* spp., *E. coli* 0157 e *Listeria monocytogenes* nas peças de carne embaladas em vácuo. Relativamente à microbiota deteriorativa verifica-se que *Pseudomonas* spp foi a que apresentava contagens mais elevadas, assim como os microrganismos totais psicrótróficos e mesófilos

Tabela 4: Contagens de microrganismos (média e desvio padrão) em carne fresca de bovino D.O.P. embalada a vácuo.

Microrganismo	log ufc/ g amostra
Mesófilos totais	4,59±0,17
Psicrotróficos totais	4,91±0,17
Enterobacteriaceae	3,69±1,43
<i>Pseudomonas</i> spp.	4,19±0,47
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	3,61±0,32
BAL	2,70±0,49
Fungos	ND
<i>Salmonella</i> spp.	ND
<i>E. coli</i>	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	ND

## 4.1.2 Determinações microbiológicas nos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.

### 4.1.2.1 Mesófilos

#### 4.1.2.1.1 Acerola

O gráfico da Figura 5 e a tabela 5 apresentam a evolução das contagens de microrganismos mesófilos totais relativos às amostras de controlo, sal e acerola. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 5,54 log ufc/ g amostra.

Não é possível observar a típica fase de lag do crescimento microbiano já que a primeira análise se realizou no primeiro dia e a segunda já no dia 3, por isso este intervalo acaba por incluir a fase lag e o início da fase de crescimento exponencial não demonstrando a evolução lenta típica da fase lag que ocorre normalmente até ao segundo dia. Por outro lado, observa-se apenas a fase de crescimento exponencial que ocorre por norma até ao dia 10. Conforme apresentado no gráfico da Figura 5 a amostra com acerola apresenta menor carga microbiana em comparação com as amostras com sal e controlo, atingindo valores médios finais de 7,89 log ufc/ g amostra embora não se encontrem diferenças significativas entre condições.

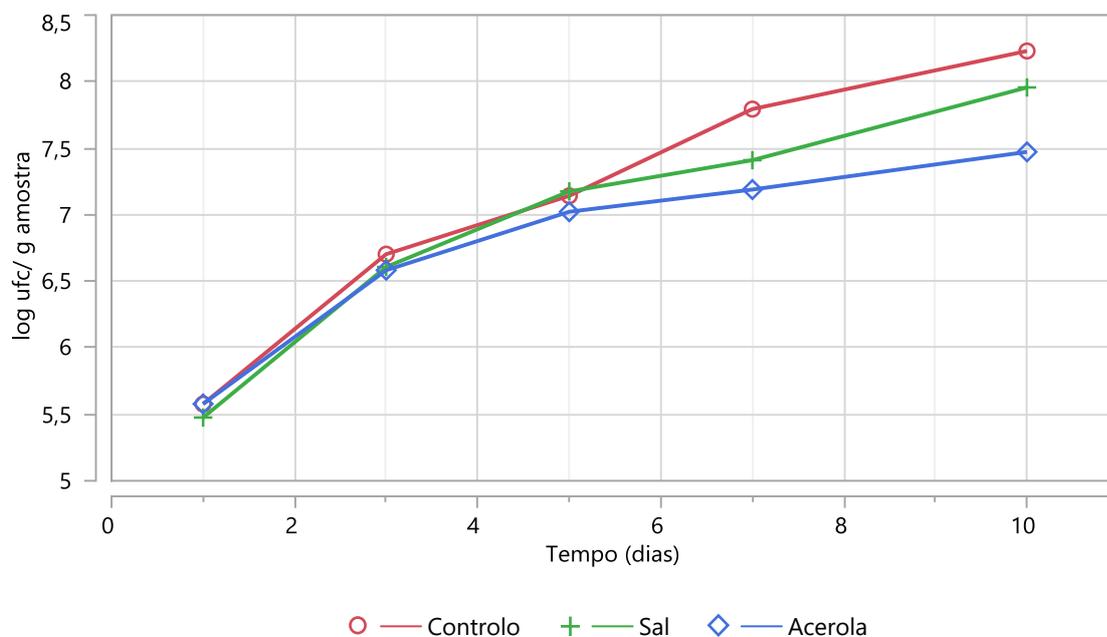


Figura 5: Gráfico da evolução das contagens de microrganismos mesófilos totais das amostras controlo, sal e acerola.

Analisando a Tabela 5 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo em todas as condições analisadas, como previsto devido ao desenvolvimento microbiano exponencial. Não foram apreciadas diferenças significativas entre diferentes condições como referido por (REALINI *et al.*, 2015) que demonstrou que a adição de acerola em hambúrgueres de bovino não alterou as contagens de microrganismos mesófilos totais.

Tabela 5: Contagens de microrganismos mesófilos totais (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	5,58±0,43 <sup>Aa</sup>	5,48±0,51 <sup>Aa</sup>	5,58±0,66 <sup>Aa</sup>	ns
3	6,70±0,25 <sup>Ba</sup>	6,61±0,28 <sup>Ba</sup>	6,58±0,12 <sup>Aba</sup>	ns
5	7,14±0,25 <sup>BCa</sup>	7,17±0,45 <sup>BCa</sup>	7,02±0,25 <sup>Ba</sup>	ns
7	7,79±0,11 <sup>CDa</sup>	7,41±0,40 <sup>BCa</sup>	7,19±0,29 <sup>Ba</sup>	ns
10	8,23±0,53 <sup>Da</sup>	7,96±0,03 <sup>Ca</sup>	7,47±0,33 <sup>Ba</sup>	ns
<b>Sig.</b>	***	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.1.2 Salicórnia

O gráfico da Figura 6 apresenta a evolução das contagens de microrganismos mesófilos totais relativos às amostras de controlo, sal salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 6,07 log ufc/ g amostra.

Tal como no comportamento registado no gráfico da Figura 4 é possível observar a fase de crescimento exponencial dos microrganismos, não chegando a atingir a fase estacionária.

O gráfico da Tabela 6 mostra que amostras de controlo e com sal demonstram contagens de microrganismos mesófilos iniciais menores do que as amostras com salicórnia. Por outro lado, é possível verificar que no período final a mesma situação não é registada, pelo que as amostras controlo, seguido das amostras com sal apresentam contagens microbianas superiores às amostras com salic. 1%, salic 1,5% e salic. 2%.

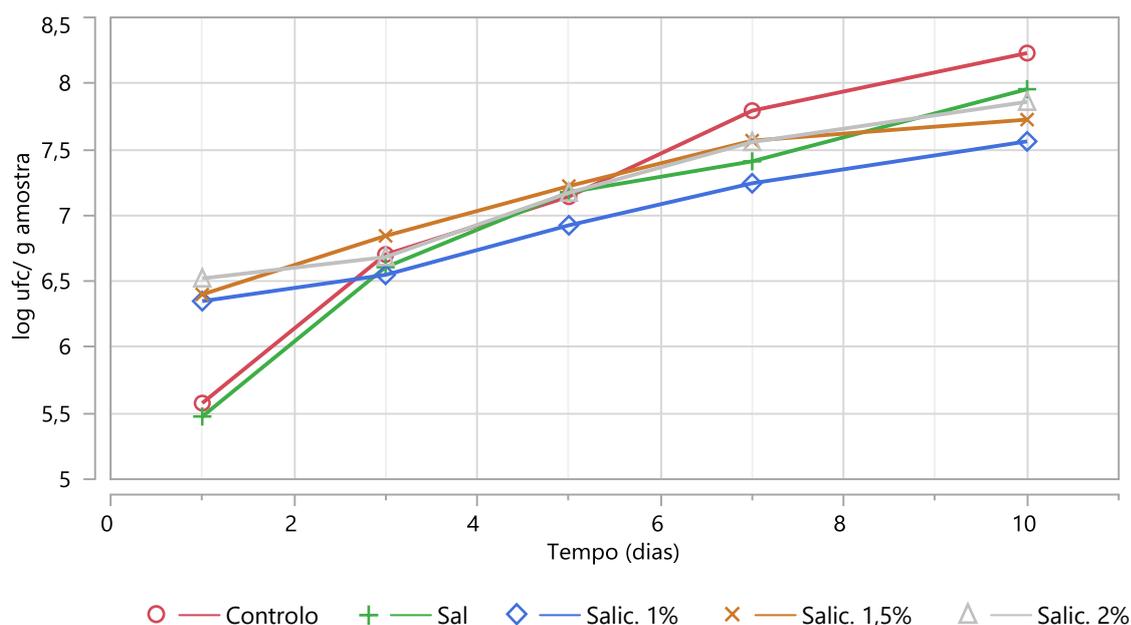


Figura 6: Gráfico da evolução das contagens de microrganismos mesófilos totais das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Conforme apresentado na Figura 6 e na Tabela 6 as amostras com salicórnia apresentam menor carga microbiana final em comparação com as amostras com sal e controlo, atingindo valores médios de 7,87 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 6 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo em todas as condições analisadas.

Tabela 6: Contagens de microrganismos mesófilos totais (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	5,58±0,43 <sup>Aa</sup>	5,48±0,51 <sup>Aa</sup>	6,35±0,15 <sup>Aa</sup>	6,40±0,14 <sup>Aa</sup>	6,52±0,07 <sup>Aa</sup>	ns
3	6,70±0,25 <sup>Ba</sup>	6,61±0,28 <sup>Ba</sup>	6,55±0,10 <sup>Aba</sup>	6,84±0,22 <sup>Ba</sup>	6,68±0,15 <sup>Aa</sup>	ns
5	7,14±0,25 <sup>BCa</sup>	7,17±0,45 <sup>BCa</sup>	6,92±0,10 <sup>BCa</sup>	7,22±0,16 <sup>BCa</sup>	7,17±0,24 <sup>Ba</sup>	ns
7	7,79±0,11 <sup>CDa</sup>	7,41±0,40 <sup>BCa</sup>	7,24±0,30 <sup>CDa</sup>	7,57±0,12 <sup>CDa</sup>	7,56±0,23 <sup>BCa</sup>	ns
10	8,23±0,53 <sup>Da</sup>	7,96±0,03 <sup>Ca</sup>	7,56±0,15 <sup>Da</sup>	7,73±0,12 <sup>Da</sup>	7,86±0,05 <sup>Ca</sup>	ns
<b>Sig.</b>	***	***	***	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.1.2.2 Psicrotróficos

#### 4.1.2.2.1 Acerola

Os resultados dos microrganismos psicrotróficos totais estão ilustrados no gráfico da Figura 7 e a Tabela 7 relativos às amostras de controlo, sal e acerola. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 5,49 log ufc/ g amostra.

Apenas é possível observar a fase de crescimento exponencial destes microrganismos.

É possível observar no gráfico da Figura 7 que as contagens iniciais da amostra com sal apresentam maiores contagens de microrganismos psicrotróficos, seguido das amostras controlo e por fim as amostras com acerola. No período final a condição com sal mantém-se a que apresenta contagens mais elevadas, mas os resultados para as amostras controlo e com acerola invertem-se, sendo que a amostra com acerola apresenta contagens mais elevadas entre ambas.

No período final as amostras apresentam um valor médio de 7,90 log ufc/ g amostra.

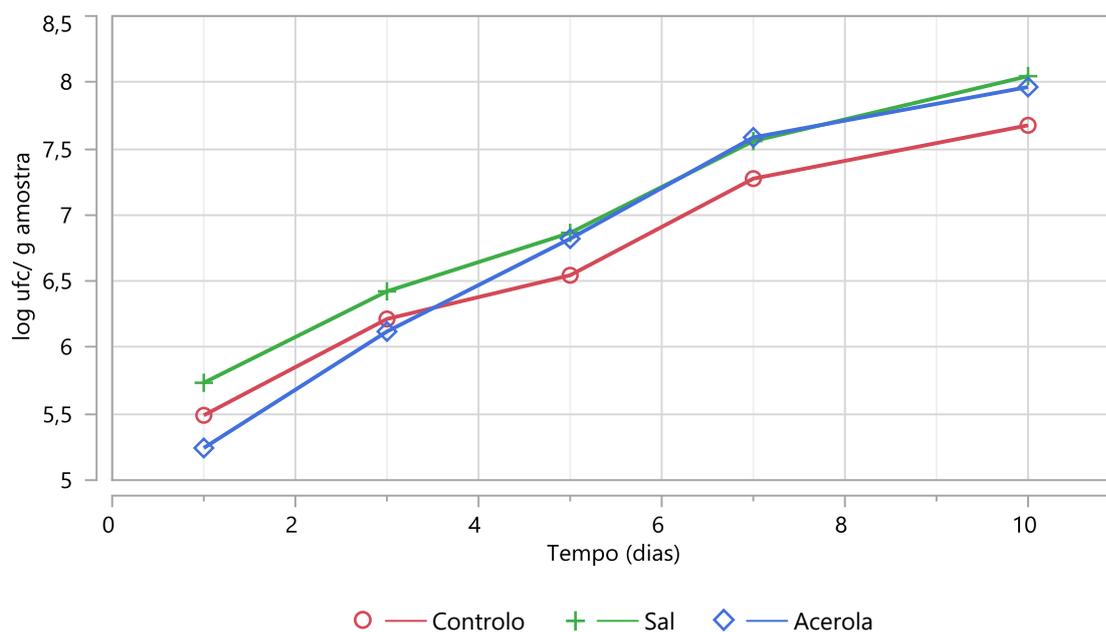


Figura 7: Gráfico da evolução das contagens de microrganismos psicrotróficos totais das amostras controlo, sal e acerola.

Na tabela 7 é possível verificar que existem diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) para o efeito tempo sobre o crescimento microbiano, onde se observa um desenvolvimento normal destes microrganismos.

Tabela 7: Contagens de microrganismos psicrotróficos totais (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	5,49±0,31 <sup>Aa</sup>	5,73±0,42 <sup>Aa</sup>	5,24±0,13 <sup>Aa</sup>	ns
3	6,22±0,06 <sup>ABa</sup>	6,42±0,35 <sup>ABa</sup>	6,12±0,09 <sup>Ba</sup>	ns
5	6,54±0,22 <sup>BCa</sup>	6,86±0,14 <sup>BCa</sup>	6,82±0,35 <sup>Ba</sup>	ns
7	7,27±0,33 <sup>CDa</sup>	7,56±0,48 <sup>CDa</sup>	7,58±0,17 <sup>Ca</sup>	ns
10	7,68±0,43 <sup>Da</sup>	8,05±0,22 <sup>Da</sup>	7,96±0,45 <sup>Ca</sup>	ns
<b>Sig.</b>	***	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.2.2 Salicórnia

O gráfico da Figura 8 apresenta a evolução das contagens de microrganismos psicrotróficos totais relativos às amostras de controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 5,41 log ufc/ g amostra.

Tal como demonstrado no gráfico da Figura 8 é possível observar a fase de crescimento exponencial dos microrganismos, não chegando a atingir a fase estacionária.

O gráfico da Tabela 8 indica que as amostras de controlo e com sal demonstram contagens de microrganismos psicrotróficos iniciais relativamente maiores do que as amostras com salicórnia. É possível verificar que no período final a amostra controlo apresenta contagens microbianas inferiores às amostras com salic. 1%, salic 1,5% e salic. 2%.

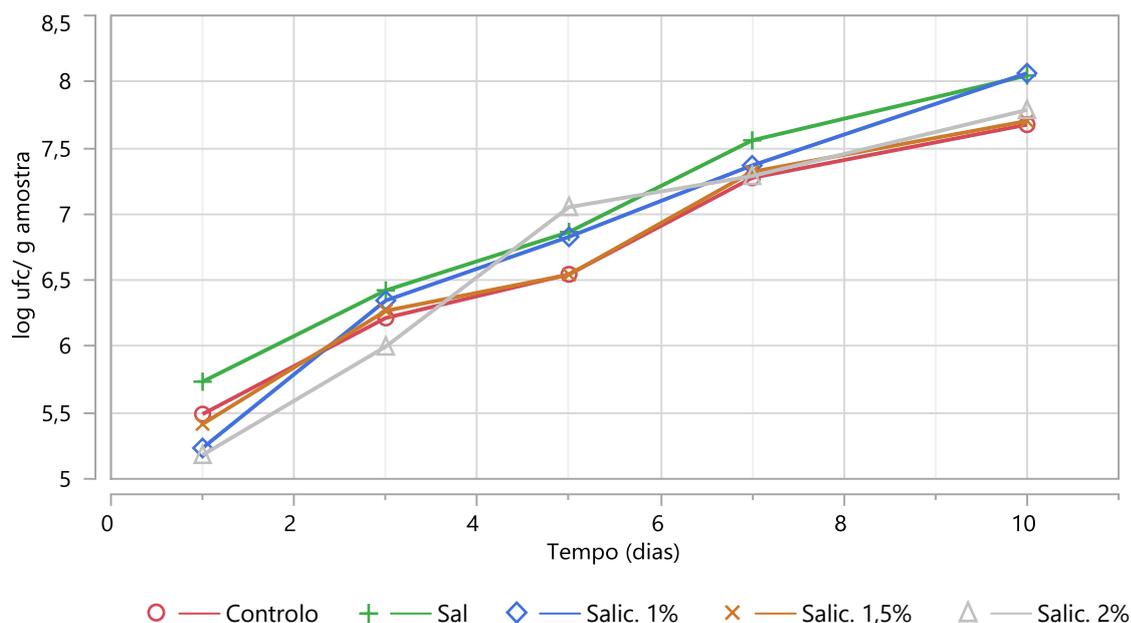


Figura 8: Gráfico da evolução das contagens de microrganismos psicotróficos totais das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Conforme apresentado na Figura 8 e na Tabela 8 as amostras com salicórnia apresentam maior carga microbiana final em comparação com as amostras com sal e controlo, atingindo valores médios finais de 7,86 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 8 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo em todas as condições analisadas.

Tabela 8: Contagens de microrganismos psicotróficos totais (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	5,49±0,31 <sup>Aa</sup>	5,73±0,42 <sup>Aa</sup>	5,23±0,48 <sup>Aa</sup>	5,41±0,6 <sup>Aa</sup>	5,18±0,59 <sup>Aa</sup>	ns
3	6,22±0,06 <sup>ABa</sup>	6,42±0,35 <sup>ABa</sup>	6,35±0,13 <sup>Ba</sup>	6,27±0,23 <sup>ABa</sup>	6,00±0,35 <sup>Aa</sup>	ns
5	6,54±0,22 <sup>BCa</sup>	6,86±0,14 <sup>BCa</sup>	6,83±0,04 <sup>BCa</sup>	6,54±0,23 <sup>BCa</sup>	7,05±0,48 <sup>Ba</sup>	ns
7	7,27±0,33 <sup>CDa</sup>	7,56±0,48 <sup>CDa</sup>	7,37±0,09 <sup>Ca</sup>	7,32±0,45 <sup>CDa</sup>	7,29±0,21 <sup>Ba</sup>	ns
10	7,68±0,43 <sup>Da</sup>	8,05±0,22 <sup>Da</sup>	8,06±0,06 <sup>Da</sup>	7,70±0,21 <sup>Da</sup>	7,79±0,08 <sup>Ba</sup>	ns
<b>Sig.</b>	***	***	***	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.1.2.3 Enterobacteriaceae

#### 4.1.2.3.1 Acerola

O gráfico da Figura 9 e a Tabela 9 apresentam a evolução das contagens de microrganismos mesófilos totais relativos às amostras controlo, sal e acerola. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 2,89 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 9 observa-se a fase de crescimento exponencial que ocorre por norma até ao dia 10.

O gráfico da Tabela 9 mostra que a amostra de controlo apresenta menor carga microbiana inicial seguida das amostras com sal e acerola, respetivamente. Por outro lado, verifica-se que no período final as contagens de Enterobacteriaceae são praticamente idênticas entre as diferentes condições analisadas.

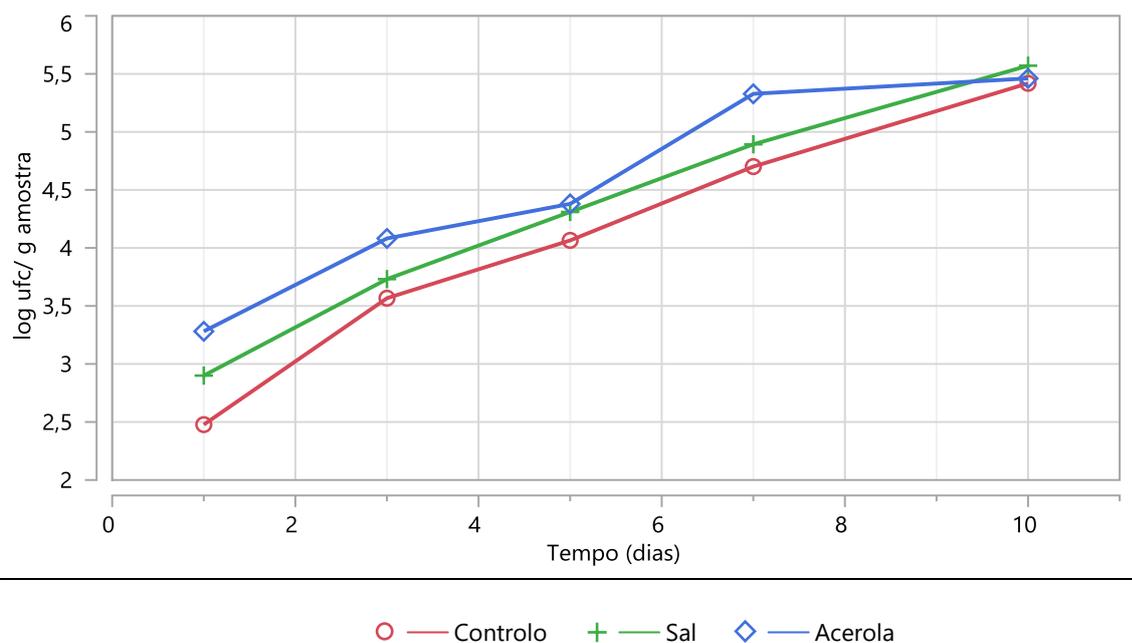


Figura 9: Gráfico da evolução das contagens de Enterobacteriaceae das amostras controlo, sal e acerola.

Conforme apresentado na Figura 9 e na Tabela 9 os valores médios finais são de 5,48 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 9 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas nas amostras de controlo

( $p < 0,01$ ) e também para as amostras com sal e acerola ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo em todas as condições analisadas.

Tabela 9: Contagens de Enterobacteriaceae (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	2,48±0,57 <sup>Aa</sup>	2,90±0,18 <sup>Aa</sup>	3,28±0,20 <sup>Aa</sup>	ns
3	3,57±0,75 <sup>ABa</sup>	3,73±0,16 <sup>ABa</sup>	4,08±0,14 <sup>ABa</sup>	ns
5	4,06±1,12 <sup>ABa</sup>	4,31±0,39 <sup>BCa</sup>	4,38±0,52 <sup>Ca</sup>	ns
7	4,70±0,48 <sup>Ba</sup>	4,89±0,63 <sup>CDa</sup>	5,33±0,44 <sup>Ca</sup>	ns
10	5,42±0,55 <sup>Ba</sup>	5,57±0,23 <sup>Da</sup>	5,46±0,25 <sup>Da</sup>	ns
Sig.	**	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.3.2 Salicórnia

O gráfico da Figura 10 e a Tabela 10 apresentam a evolução das contagens de Enterobacteriaceae relativas às amostras de controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 2,87 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 10 observa-se a fase de crescimento exponencial que ocorre por norma até ao dia 10.

O gráfico da Figura 10 indica que as amostras de controlo apresentam menor carga microbiana inicial do que as restantes. No período final as contagens de Enterobacteriaceae das amostras de salicórnia comparativamente ao controlo e às amostras com sal são superiores, podendo dever-se a uma contaminação que este ingrediente já apresentava.

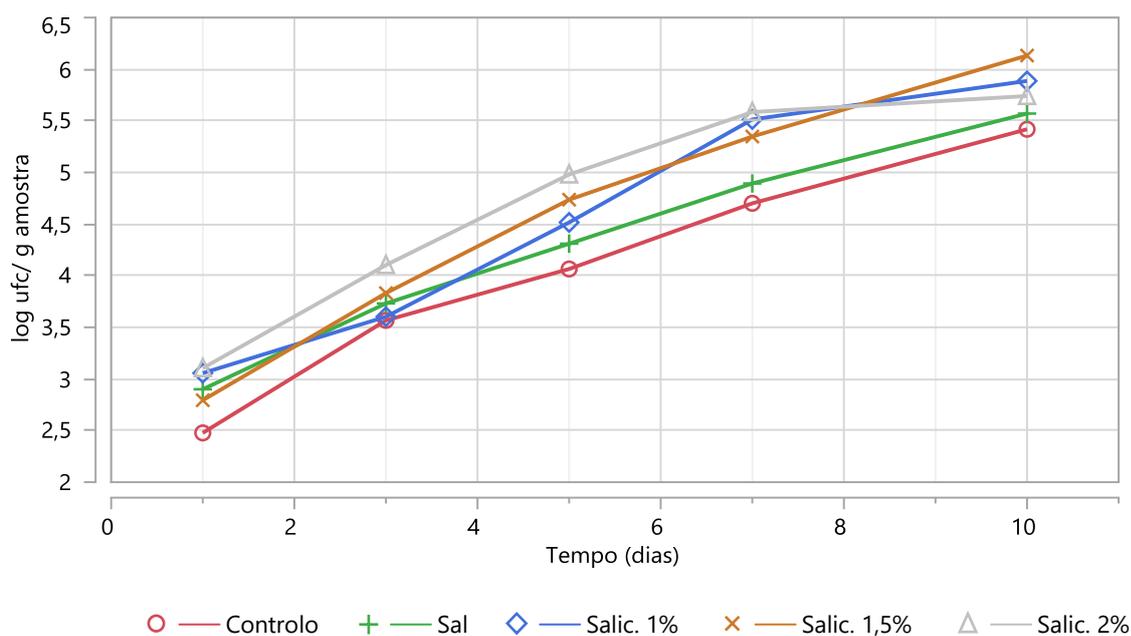


Figura 10: Gráfico da evolução das contagens de Enterobacteriaceae das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Conforme apresentado na Figura 10 e na Tabela 10 os valores médios finais são de 5,75 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 10 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas nas amostras de controlo ( $p < 0,01$ ) e também para as amostras com sal e acerola ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo em todas as condições analisadas.

Tabela 10: Contagens de Enterobacteriaceae (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	2,48±0,57 <sup>Aa</sup>	2,90±0,18 <sup>Aa</sup>	3,06±0,66 <sup>Aa</sup>	2,79±0,43 <sup>Aa</sup>	3,10±0,35 <sup>Aa</sup>	ns
3	3,57±0,75 <sup>ABa</sup>	3,73±0,16 <sup>ABa</sup>	3,60±0,39 <sup>ABa</sup>	3,83±0,84 <sup>ABa</sup>	4,10±0,25 <sup>Ba</sup>	ns
5	4,06±1,12 <sup>ABa</sup>	4,31±0,39 <sup>BCa</sup>	4,52±0,35 <sup>BCa</sup>	4,74±0,86 <sup>BCa</sup>	4,98±0,23 <sup>Ca</sup>	ns
7	4,70±0,48 <sup>Ba</sup>	4,89±0,63 <sup>CDa</sup>	5,51±0,12 <sup>CDa</sup>	5,35±0,72 <sup>BCa</sup>	5,58±0,18 <sup>CDa</sup>	ns
10	5,42±0,55 <sup>Ba</sup>	5,57±0,23 <sup>Da</sup>	5,89±0,14 <sup>Da</sup>	6,13±0,34 <sup>Ca</sup>	5,74±0,13 <sup>Da</sup>	ns
<b>Sig.</b>	<b>**</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.4 *Pseudomonas* spp

##### 4.1.2.4.1 Acerola

O gráfico da Figura 11 e a Tabela 11 apresentam a evolução das contagens de *Pseudomonas* spp. relativos às amostras de controlo, sal e acerola. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 3,54 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 11 observa-se a fase de crescimento exponencial. O mesmo mostra que a amostra de controlo apresenta maior carga microbiana inicial seguida das amostras com acerola e sal, respetivamente. Por outro lado, é possível verificar que no período final as contagens de *Pseudomonas* spp. são mais elevadas nas amostras com sal em relação às amostras de controlo e às amostras com acerola.

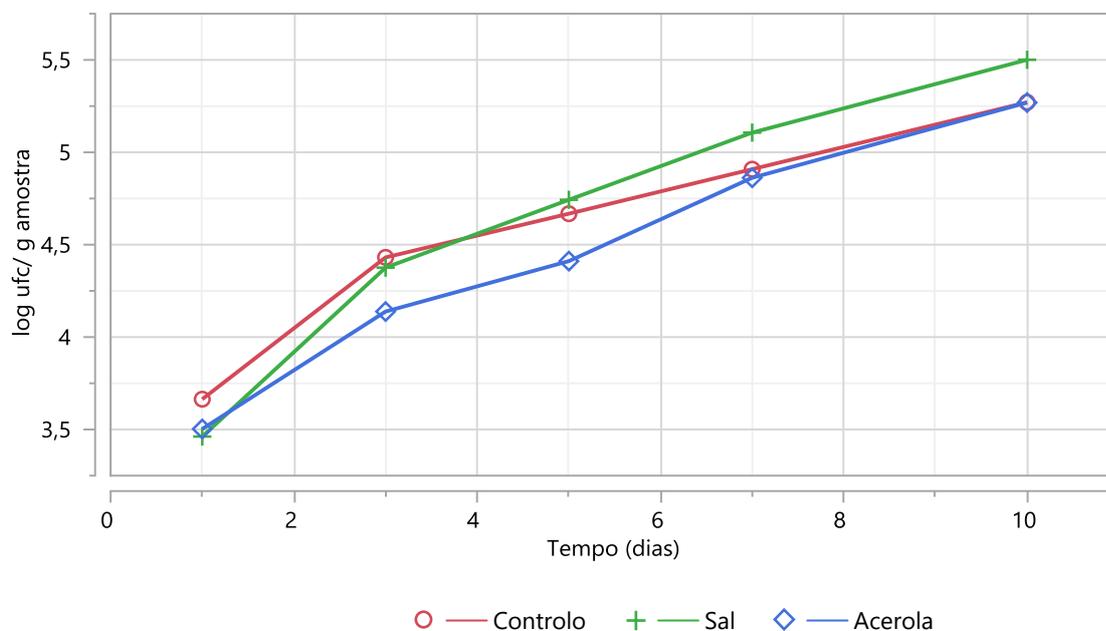


Figura 11: Gráfico da evolução das contagens de *Pseudomonas* spp. das amostras controlo, sal e acerola.

Conforme apresentado na Figura 11 e na Tabela 11 os valores médios finais são de 5,35 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 11 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas nas amostras de controlo ( $p < 0,05$ ) e também para as amostras com sal e acerola ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo em todas as condições analisadas.

Tabela 11: Contagens de *Pseudomonas* spp. (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	3,66±0,42 <sup>Aa</sup>	3,46±0,38 <sup>Aa</sup>	3,50±0,09 <sup>Aa</sup>	ns
3	4,43±0,32 <sup>ABa</sup>	4,38±0,17 <sup>ABa</sup>	4,14±0,17 <sup>ABa</sup>	ns
5	4,67±0,37 <sup>ABa</sup>	4,74±0,41 <sup>BCa</sup>	4,41±0,45 <sup>Ba</sup>	ns
7	4,91±0,41 <sup>Ba</sup>	5,11±0,49 <sup>BCa</sup>	4,86±0,26 <sup>BCa</sup>	ns
10	5,27±0,62 <sup>Ba</sup>	5,50±0,45 <sup>Ca</sup>	5,27±0,28 <sup>Ca</sup>	ns
<b>Sig.</b>	*	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.4.2 Salicórnica

O gráfico da Figura 12 e a Tabela 12 apresentam a evolução das contagens de *Pseudomonas* spp. relativas às amostras de controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 3,60 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 12 observa-se a fase de crescimento exponencial que ocorre por norma até ao dia 10.

O gráfico da Tabela 12 demonstra que as amostras com sal apresentam menor carga microbiana inicial do que as restantes, sendo as amostras com salic. 2% as que apresentam maior carga microbiana. No período final as contagens de *Pseudomonas* spp. são superiores para as amostras de salicórnica e sal comparativamente ao controlo.

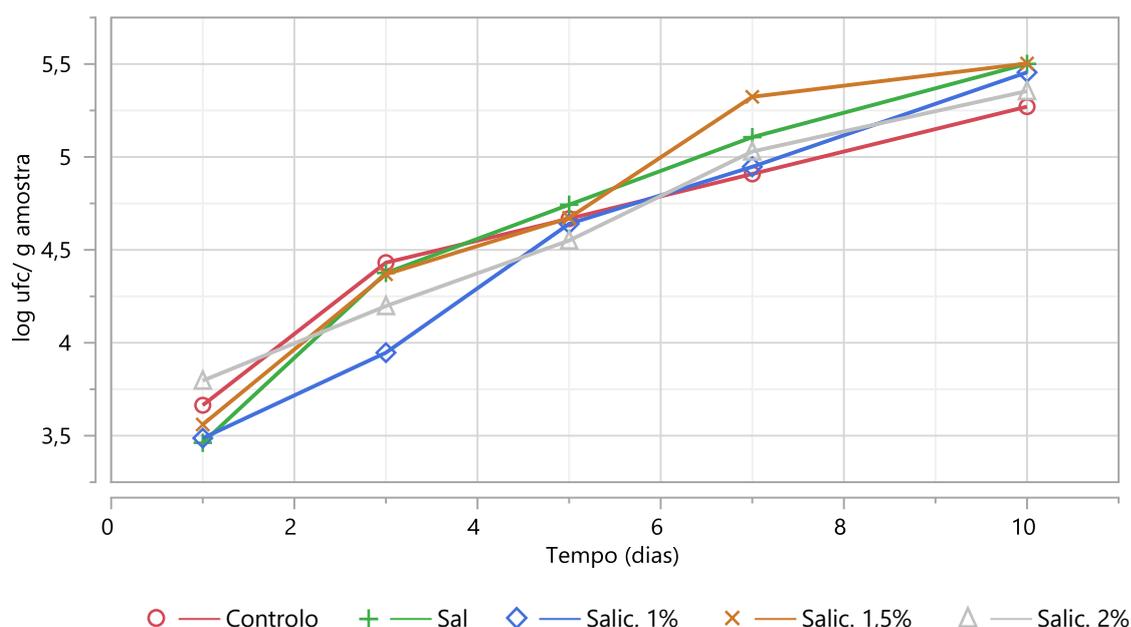


Figura 12: Gráfico da evolução das contagens de *Pseudomonas* spp das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Conforme apresentado na Figura 12 e na Tabela 12 os valores médios finais são de 5,36 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 12 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas nas amostras de controlo ( $p < 0,05$ ) e também para as amostras com sal e salicórnia ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo.

Tabela 12: Contagens de *Pseudomonas* spp (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	3,66±0,42 <sup>Aa</sup>	3,46±0,38 <sup>Aa</sup>	3,49±0,07 <sup>Aa</sup>	3,56±0,63 <sup>Aa</sup>	3,80±0,30 <sup>Aa</sup>	ns
3	4,43±0,32 <sup>ABa</sup>	4,38±0,17 <sup>ABa</sup>	3,95±0,21 <sup>Ba</sup>	4,37±0,11 <sup>ABa</sup>	4,20±0,18 <sup>ABa</sup>	ns
5	4,67±0,37 <sup>ABa</sup>	4,74±0,41 <sup>BCa</sup>	4,64±0,24 <sup>Ca</sup>	4,67±0,17 <sup>BCa</sup>	4,55±0,14 <sup>BCa</sup>	ns
7	4,91±0,41 <sup>Ba</sup>	5,11±0,49 <sup>BCa</sup>	4,95±0,16 <sup>Ca</sup>	5,32±0,53 <sup>BCa</sup>	5,03±0,06 <sup>CDa</sup>	ns
10	5,27±0,62 <sup>Ba</sup>	5,50±0,45 <sup>Ca</sup>	5,46±0,11 <sup>Da</sup>	5,24±0,23 <sup>Ca</sup>	5,35±0,18 <sup>Da</sup>	ns
Sig.	*	***	***	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.5 *Brochotrix thermosphacta*

#### 4.1.2.5.1 Acerola

O gráfico da Figura 13 e a Tabela 13 apresentam a evolução das contagens de *Brochotrix thermosphacta* relativos às amostras de controlo, sal e acerola. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 3,65 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 13 observa-se a fase de crescimento exponencial. O mesmo mostra que as amostras de controlo apresentam menor carga microbiana inicial quando comparadas com as amostras com acerola e sal. No tempo 10 observar-se que as contagens de *Brochotrix thermosphacta* são mais elevadas nas amostras com sal, seguidas das amostras com acerola em relação às amostras de controlo.

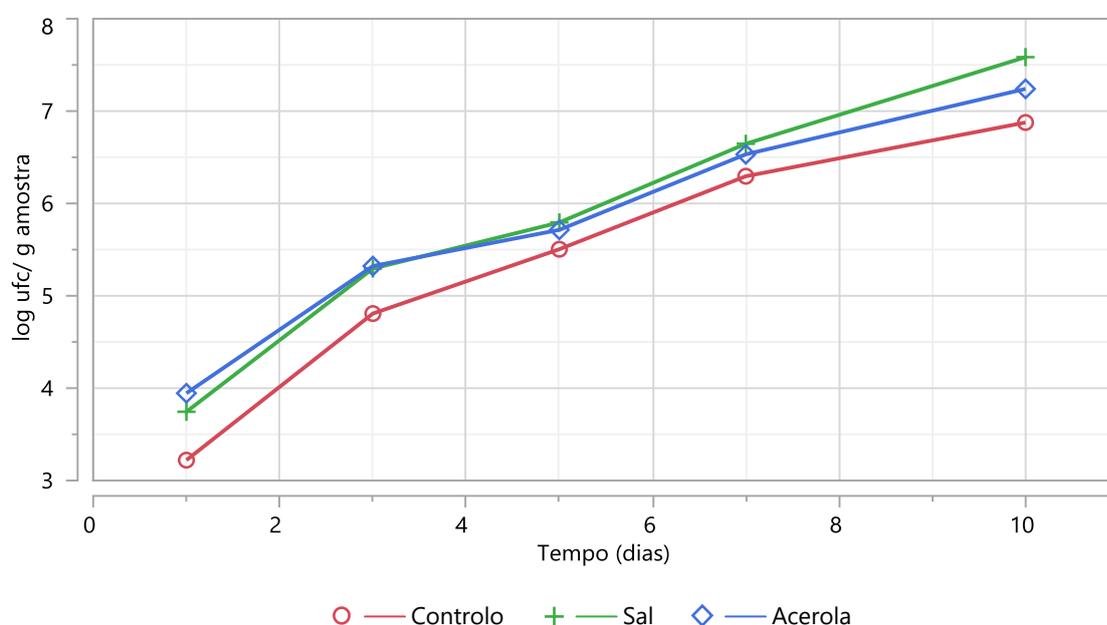


Figura 13: Gráfico da evolução das contagens de *Brochotrix thermosphacta* das amostras controlo, sal e acerola.

Conforme apresentado na Figura 13 e na Tabela 13 os valores médios finais são de 7,23 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 13 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas nas amostras de controlo ( $p < 0,001$ ) e também para as amostras com sal ( $p < 0,01$ ) e acerola ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo em todas as condições analisadas.

Tabela 13: Contagens de *Brochotrix thermosphacta*. (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	3,22±0,34 <sup>Aa</sup>	3,74±0,73 <sup>Aa</sup>	3,95±0,85 <sup>Aa</sup>	ns
3	4,81±0,14 <sup>Ba</sup>	5,29±0,43 <sup>ABa</sup>	5,32±0,53 <sup>ABa</sup>	ns
5	5,50±0,40 <sup>BCa</sup>	5,79±1,26 <sup>ABCa</sup>	5,71±0,83 <sup>BCa</sup>	ns
7	6,29±0,44 <sup>CDa</sup>	6,65±0,90 <sup>BCa</sup>	6,53±0,33 <sup>BCa</sup>	ns
10	6,88±0,11 <sup>Da</sup>	7,58±0,27 <sup>Ca</sup>	7,24±0,11 <sup>Ca</sup>	ns
<b>Sig.</b>	***	**	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.5.2 Salicórnia

O gráfico da Figura 14 e a tabela 14 apresenta a evolução das contagens de *Brochotrix thermosphacta* relativas às amostras de controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 3,38 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 14 observa-se a fase de crescimento exponencial que ocorre por norma até ao dia 10.

O gráfico da Tabela 14 demonstra que a amostr com sal apresentam maior carga microbiana inicial do que as restantes, sendo as amostras com salic. 1,5% a que apresenta menor carga microbiana. No período final as contagens de *Brochotrix thermosphacta* mantêm-se superiores para as amostras com sal comparativamente ao controlo e salicórnia.

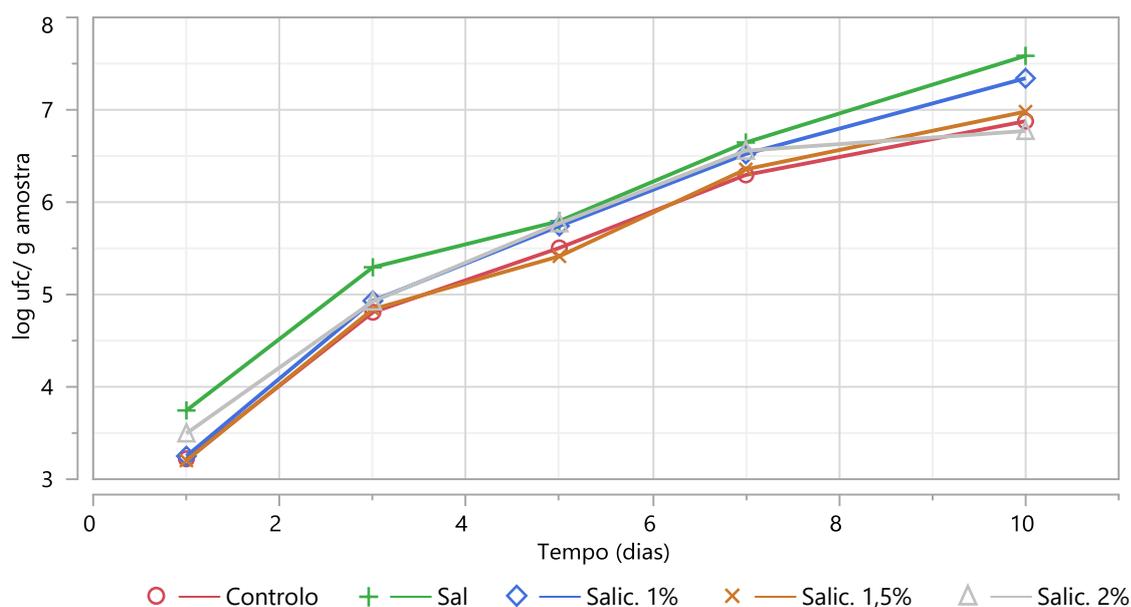


Figura 14: Gráfico da evolução das contagens de *Brochotrix thermosphacta* das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Conforme apresentado na Figura 14 e na Tabela 14 os valores médios finais são de 7,11 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 14 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo em todas as condições analisadas.

Tabela 14: Contagens de *Brochotrix thermosphacta*. (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	3,22±0,34 <sup>Aa</sup>	3,74±0,73 <sup>Aa</sup>	3,25±0,70 <sup>Aa</sup>	3,20±0,70 <sup>Aa</sup>	3,50±0,58 <sup>Aa</sup>	ns
3	4,81±0,14 <sup>Ba</sup>	5,29±0,43 <sup>ABa</sup>	4,93±0,44 <sup>Ba</sup>	4,84±0,83 <sup>Ba</sup>	4,92±0,23 <sup>Ba</sup>	ns
5	5,50±0,40 <sup>BCa</sup>	5,79±1,26 <sup>ABCa</sup>	5,74±0,94 <sup>BCa</sup>	5,41±0,75 <sup>BCa</sup>	5,77±0,46 <sup>BCa</sup>	ns
7	6,29±0,44 <sup>CDa</sup>	6,65±0,90 <sup>BCa</sup>	6,52±0,49 <sup>BCa</sup>	6,36±0,59 <sup>BCa</sup>	6,56±0,27 <sup>Ca</sup>	ns
10	6,88±0,11 <sup>Da</sup>	7,58±0,27 <sup>Ca</sup>	7,34±0,07 <sup>Ca</sup>	6,98±0,31 <sup>Ca</sup>	6,77±0,40 <sup>Ca</sup>	ns
<b>Sig.</b>	<b>***</b>	<b>**</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.6 Bactérias do ácido lático

##### 4.1.2.6.1 Acerola

O gráfico da Figura 15 e a Tabela 15 apresentam a evolução das contagens de bactérias do ácido lático (BAL) relativos às amostras de controlo, sal e acerola. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 3,08 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 15 observa-se a fase de crescimento exponencial. O mesmo mostra que as amostras com sal apresentam menor carga microbiana inicial quando comparadas com as amostras com acerola e sal. No tempo 10 observar-se que as contagens de BAL são mais elevadas nas amostras com sal, seguidas das amostras com acerola em relação às amostras de controlo.

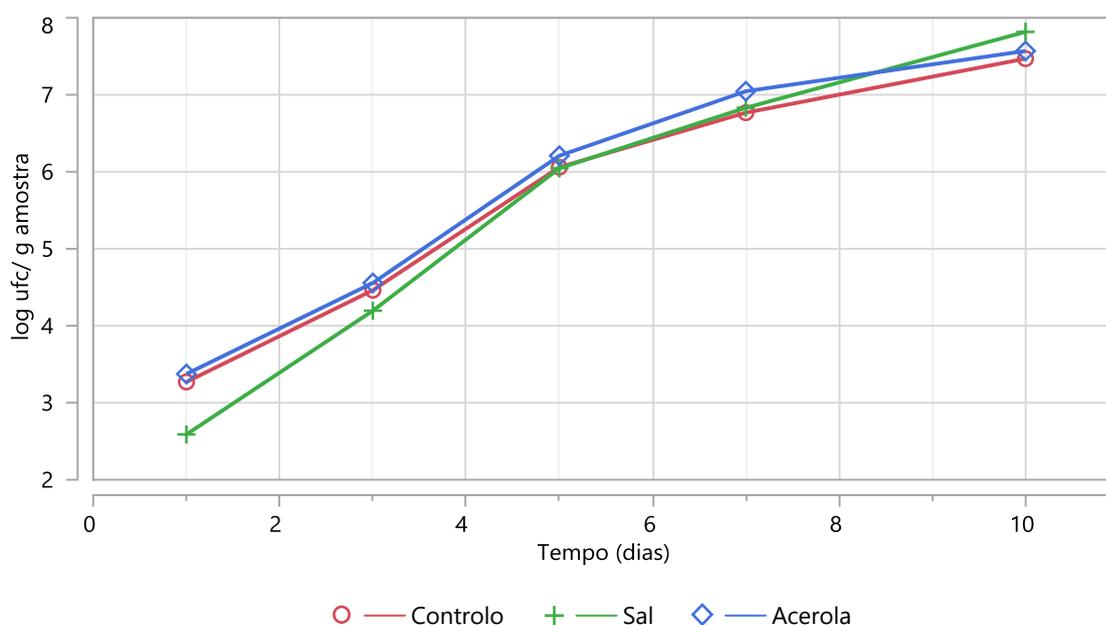


Figura 15: Gráfico da evolução das contagens de BAL das amostras controlo, sal e acerola.

Conforme apresentado na Figura 15 e na Tabela 15 os valores médios finais são de 7,62 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 15 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) em todas as condições analisadas.

Tabela 15: Contagens de BAL (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	3,27±0,31 <sup>Aa</sup>	2,59±0,98 <sup>Aa</sup>	3,37±0,54 <sup>Aa</sup>	ns
3	4,46±0,98 <sup>ABa</sup>	4,20±0,46 <sup>ABa</sup>	4,56±0,72 <sup>ABa</sup>	ns
5	6,06±0,72 <sup>BCa</sup>	6,05±1,13 <sup>BCa</sup>	6,21±0,90 <sup>BCa</sup>	ns
7	6,77±0,92 <sup>Ca</sup>	6,83±0,94 <sup>Ca</sup>	7,05±0,98 <sup>Ca</sup>	ns
10	7,47±0,33 <sup>Ca</sup>	7,82±0,13 <sup>Ca</sup>	7,57±0,12 <sup>Ca</sup>	ns
<b>Sig.</b>	***	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.6.2 Salicórnica

O gráfico da Figura 16 e a Tabela 16 apresenta a evolução das contagens de BAL relativas às amostras de controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%, os resultados são expressos por log ufc/ g amostra. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 2,84 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 16 observa-se a fase de crescimento exponencial que ocorre por norma até ao dia 10.

O gráfico da Tabela 16 demonstra que as amostras de controlo apresentam maior carga microbiana inicial do que as restantes. No período final as contagens de BAL são muito semelhantes entre condições embora a amostra com sal demonstre ser a mais contaminada.

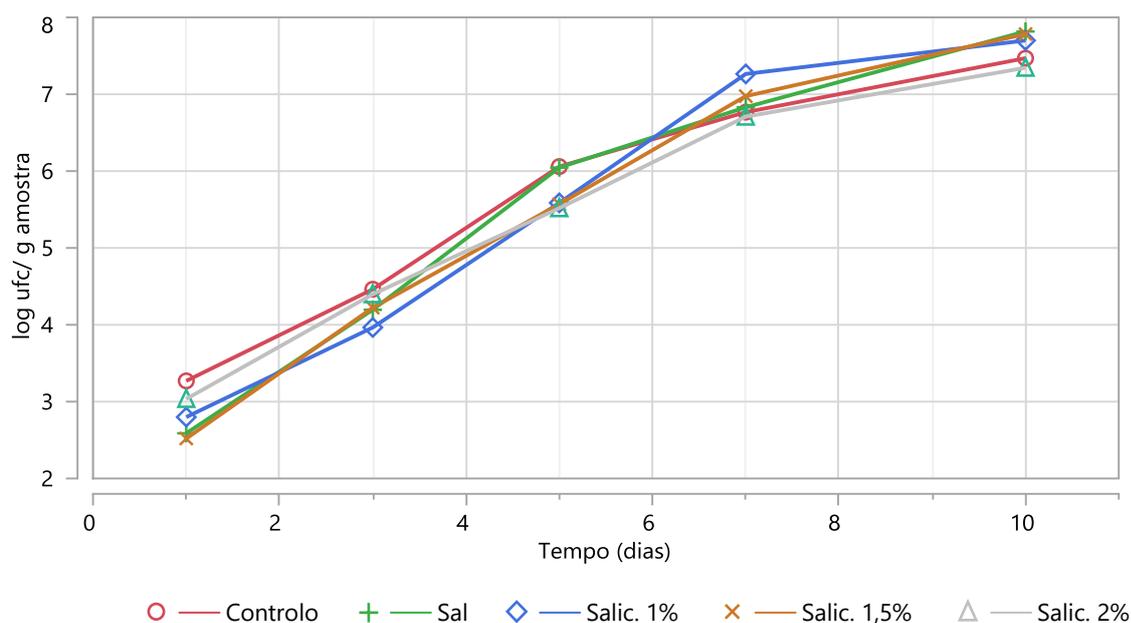


Figura 16: Gráfico da evolução das contagens de BAL das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Conforme apresentado na Figura 16 e na Tabela 16 os valores médios finais são de 7,62 log UFC/ g amostra.

Examinando a Tabela 16 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) pelo efeito tempo em todas as condições analisadas.

Tabela 16: Contagens de BAL (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	3,27±0,31 <sup>Aa</sup>	2,59±0,98 <sup>Aa</sup>	2,80±1,11 <sup>Aa</sup>	2,52±0,58 <sup>Aa</sup>	3,03±0,79 <sup>Aa</sup>	ns
3	4,46±0,98 <sup>ABa</sup>	4,20±0,46 <sup>ABa</sup>	3,97±0,66 <sup>ABa</sup>	4,22±0,55 <sup>ABa</sup>	4,40±0,62 <sup>ABa</sup>	ns
5	6,06±0,72 <sup>BCa</sup>	6,05±1,13 <sup>BCa</sup>	5,59±0,88 <sup>BCa</sup>	5,57±0,99 <sup>BCa</sup>	5,52±0,60 <sup>BCa</sup>	ns
7	6,77±0,92 <sup>Ca</sup>	6,83±0,94 <sup>Ca</sup>	7,26±0,34 <sup>CDa</sup>	6,98±0,91 <sup>CDa</sup>	6,71±0,17 <sup>CDa</sup>	ns
10	7,47±0,33 <sup>Ca</sup>	7,82±0,13 <sup>Ca</sup>	7,70±0,29 <sup>Da</sup>	7,78±0,58 <sup>Da</sup>	7,34±0,11 <sup>Da</sup>	ns
Sig.	***	***	***	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

## 4.1.2.7 Fungos

### 4.1.2.7.1 Acerola

O gráfico da Figura 17 e a tabela 17 apresentam a evolução das contagens de fungos relativos às amostras de controlo, sal e acerola. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 2,54 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 17 observa-se a fase de crescimento exponencial. O mesmo mostra que as amostras com sal, apresentam menor carga microbiana inicial quando comparadas com as amostras com acerola e controlo. No tempo 10 observar-se que as contagens de fungos são mais elevadas nas amostras de controlo, quando comparadas com as amostras com sal e acerola que se apresentam praticamente idênticas.

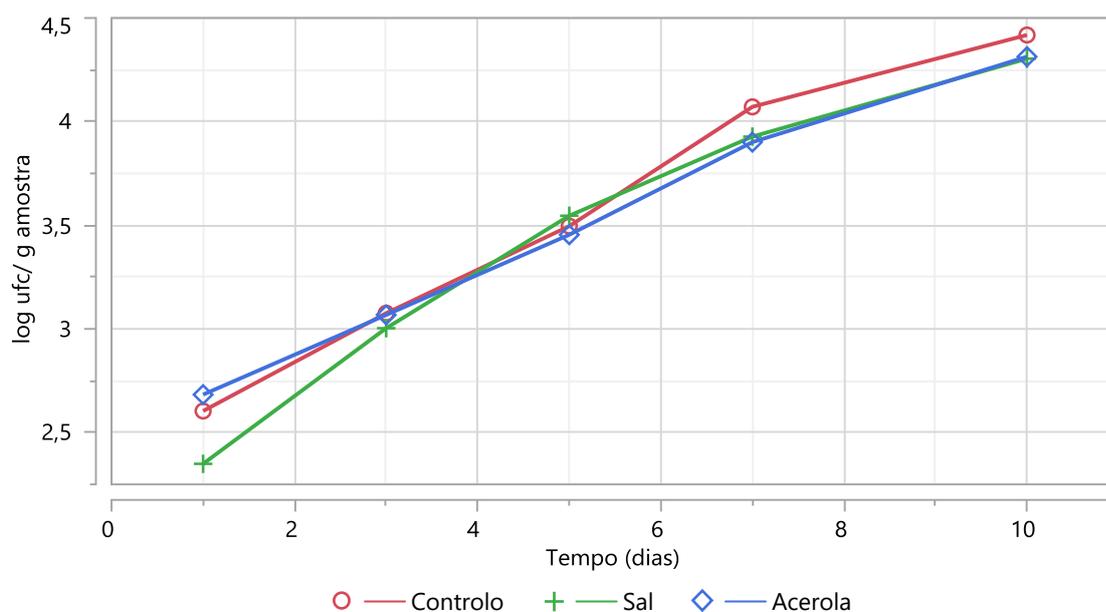


Figura 17: Gráfico da evolução das contagens de fungos das amostras controlo, sal e acerola.

Conforme apresentado na Figura 17 e na Tabela 17 os valores médios finais são de 4,34 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 17 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas nas amostras de controlo ( $p < 0,05$ ), nas amostras com sal ( $p < 0,001$ ) e também nas amostras com salicórnia ( $p < 0,01$ ) pelo efeito tempo.

Tabela 17: Contagens de fungos (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	2,60±0,52 <sup>Aa</sup>	2,35±0,25 <sup>Aa</sup>	2,68±0,14 <sup>Aa</sup>	ns
3	3,08±0,45 <sup>ABa</sup>	3,00±0,35 <sup>ABa</sup>	3,07±0,22 <sup>ABa</sup>	ns
5	3,50±0,74 <sup>ABa</sup>	3,55±0,34 <sup>BCa</sup>	3,45±0,27 <sup>ABCa</sup>	ns
7	4,07±0,62 <sup>ABa</sup>	3,93±0,18 <sup>CDa</sup>	3,90±0,6 <sup>BCa</sup>	ns
10	4,42±0,46 <sup>Ba</sup>	4,30±0,23 <sup>Da</sup>	4,31±0,69 <sup>Ca</sup>	ns
<b>Sig.</b>	*	***	**	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.7.2 Salicórnia

O gráfico da Figura 18 e a Tabela 18 apresenta a evolução das contagens de fungos relativas às amostras de controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%. A carga microbiana média inicial das amostras foi de 2,43 log ufc/ g amostra.

No gráfico da Figura 18 observa-se a fase de crescimento exponencial que ocorre por norma até ao dia 10.

O gráfico da Tabela 18 demonstra que as amostras de controlo apresentam maior carga microbiana inicial do que as restantes. No período final as contagens de fungos são muito semelhantes entre condições embora a amostra com salic. 1,5% demonstre ser a mais contaminada.

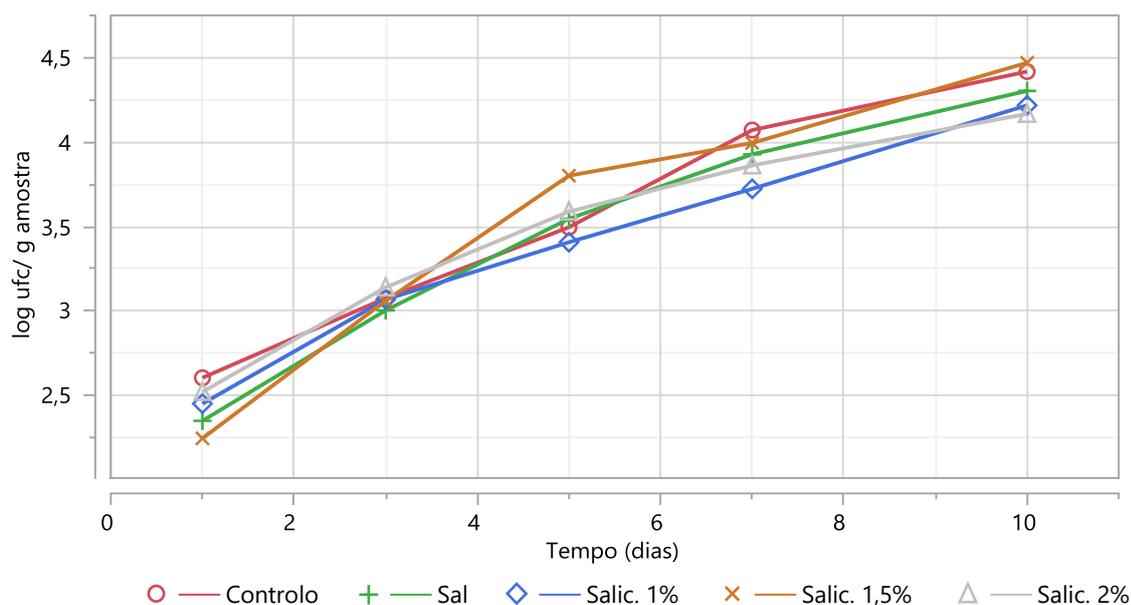


Figura 18: Gráfico da evolução das contagens de fungos das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Conforme apresentado na Figura 18 e na Tabela 19 os valores médios finais são de 4,32 log ufc/ g amostra.

Examinando a Tabela 18 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento com diferenças significativas nas amostras de controlo ( $p < 0,05$ ) e nas amostras com sal e salicórnia ( $p < 0,001$ ).

Tabela 18: Contagens de fungos (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	2,60±0,52 <sup>Aa</sup>	2,35±0,25 <sup>Aa</sup>	2,45±0,40 <sup>Aa</sup>	2,25±0,05 <sup>Aa</sup>	2,52±0,37 <sup>Aa</sup>	ns
3	3,08±0,45 <sup>ABa</sup>	3,00±0,35 <sup>ABa</sup>	3,07±0,19 <sup>ABa</sup>	3,06±0,04 <sup>Ba</sup>	3,14±0,18 <sup>ABa</sup>	ns
5	3,50±0,74 <sup>ABa</sup>	3,55±0,34 <sup>BCa</sup>	3,41±0,14 <sup>BCa</sup>	3,80±0,10 <sup>Ca</sup>	3,59±0,39 <sup>BCa</sup>	ns
7	4,07±0,62 <sup>ABa</sup>	3,93±0,18 <sup>CDa</sup>	3,72±0,10 <sup>CDa</sup>	3,99±0,06 <sup>Ca</sup>	3,86±0,37 <sup>BCa</sup>	ns
10	4,42±0,46 <sup>Ba</sup>	4,30±0,23 <sup>Da</sup>	4,22±0,20 <sup>Da</sup>	4,47±0,28 <sup>Da</sup>	4,17±0,42 <sup>Ca</sup>	ns
Sig.	*	***	***	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.1.3 Análise sumária das variáveis microbiológicas

Com o objetivo de efetuar uma discussão global de resultados dos parâmetros microbiológicos apresentam-se os gráficos de evolução de todos os microrganismos por condição analisada demonstrados no gráfico da Figura 19.

Observando a Figura 19 é possível constatar que o comportamento da microbiota presente na carne foi semelhante entre as diferentes condições analisadas.

Os microrganismos mais dominantes da microbiota deteriorativa analisada foram as BAL e a *Brochothrix thermosphacta* como descrito por (NYCHAS *et al*, 2002) que concluiu que em atmosfera modificada com menos de 50% CO<sub>2</sub> e com O<sub>2</sub> estes microrganismos são os mais prevalentes em carne de bovino em refrigeração.

Como é possível observar, embora a contaminação inicial de BAL seja relativamente baixa o seu crescimento é exponencial e atinge valores superiores a 7 log ufc/ g o que leva a odores ácidos e descoloração sendo alterações sensoriais típicas envolvidas na deterioração da carne por LAB. Deve-se essencialmente ao acumular de produtos finais do metabolismo das BAL como o ácido lático, ácido acético e o ácido butírico. Esta produção também é responsável pela redução apreciável do pH conforme exposto por BLACKBURN (2006).

Como referido anteriormente, *Brochothrix thermosphacta* foi um dos microrganismos prevalentes nas amostras de carne, este microrganismo produz diacetil e uma gama de ácidos gordos devido ao metabolismo aeróbico da glicose que dão origem a odores azedos, ácidos ou a mofo. Estes defeitos sensoriais podem ser observados uma vez que este organismo alcance valores de 5 log ufc/ g. (Holley, 2000).

Vários cientistas concluíram que contagens bacterianas de mesófilos totais entre 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> ufc/ g amostra são suficientes para começar a causar odores desagradáveis e descoloração (LIMBO, 2010), estes valores foram atingidos em média no dia 5.

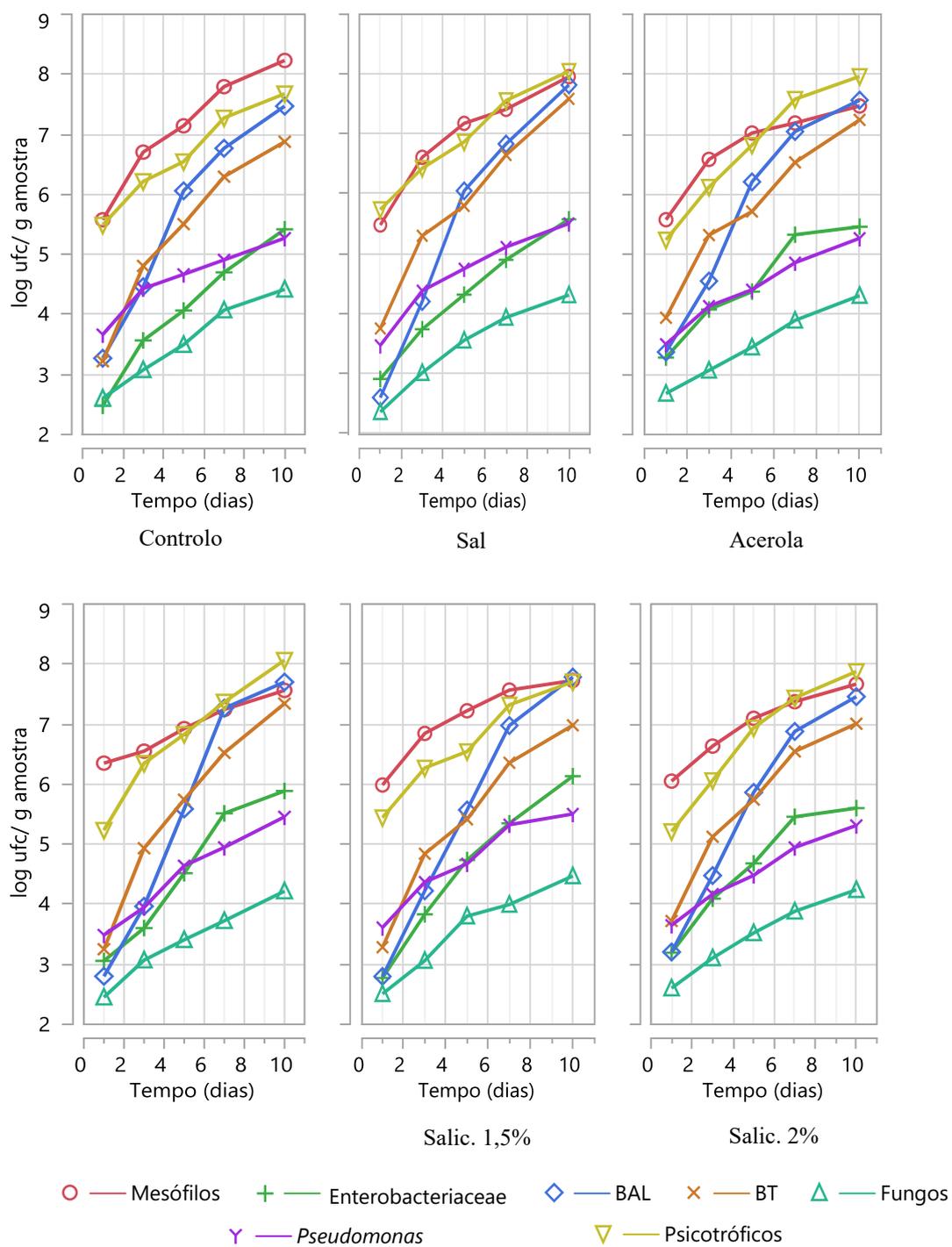


Figura 19: Gráficos da evolução dos microrganismos analisados de acordo com a condição.

## 4.2 Determinações físico-químicas nos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.

### 4.2.1 pH

É importante frisar que as amostras sujeitas a análises de pH foram anteriormente congeladas e que este processo pode afetar os resultados obtidos e possivelmente alterá-los. Segundo Leygonie *et al.* (2012) a congelação e posterior descongelação de carne fresca pode levar a uma diminuição do pH, isto explica-se devido ao facto do pH ser uma medida da quantidade de iões de hidrogénio livres ( $H^+$ ), é possível que o congelamento leve à produção subsequente de exsudato e este possa causar desnaturação das proteínas tampão, a liberação de iões de hidrogénio e uma consequente diminuição do pH medido. Alternativamente, a perda de fluido da carne pode causar um aumento na concentração dos solutos, o que resulta também numa diminuição do pH.

De qualquer forma, todas as amostras foram congeladas e descongeladas seguindo o mesmo procedimento, podendo considerar-se que o desvio de resultados devido ao processo de congelação/dcongelação é idêntico em todas as amostras e por isso as diferenças encontradas entre diferentes condições podem ser consideradas plausíveis.

#### 4.2.1.1 Acerola

Os valores médios de pH das amostras controlo, com sal e com acerola apresentam-se na Figura 20 e Tabela 19.

O pH médio inicial obtido no tempo 1 apresenta um valor de 5,71, o que está de acordo com JAY *et al.* (2000) que demonstra que este valor deve situar-se entre 5,70 e 5,90 para carne de bovino fresca.

Como está evidenciado no gráfico da Figura 20, a amostra com acerola apresenta o pH mais baixo ao longo de todo o período de análise, seguida da amostra com sal e por fim a amostra controlo. Esta evidência sugere que a adição de acerola, devido ao alto teor de ácido ascórbico que possui, poderá possibilitar a descida do pH em carne de bovino.

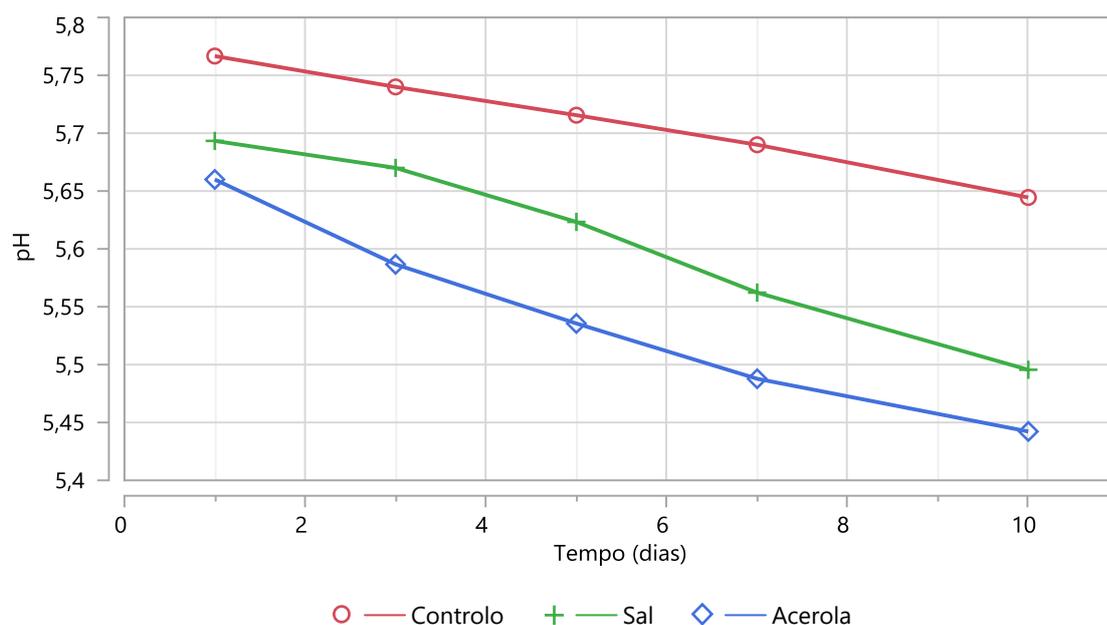


Figura 20: Gráfico da evolução do pH das amostras controlo, sal e acerola.

Conforme apresentado na Figura 20 e na Tabela 19 os valores médios finais correspondem a 5,53. Esta descida de pH pode ser explicada pela alta prevalência de BAL na carne ao longo de todo o período analisado, devido à produção de ácido láctico, acético, butírico, entre outros conforme exposto por BLACKBURN (2006).

Examinando a Tabela 19 verifica-se que existe uma descida de pH contínua ao longo do período de armazenamento. Também é possível observar que a amostra com acerola tem, em todos os tempos, valores inferiores de pH em relação às outras condições.

Tabela 19: Valores de pH (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	5,77±0,19 <sup>Aa</sup>	5,69±0,18 <sup>Aa</sup>	5,66±0,14 <sup>Aa</sup>	ns
3	5,74±0,26 <sup>Aa</sup>	5,67±0,11 <sup>Aa</sup>	5,59±0,08 <sup>Aa</sup>	ns
5	5,72±0,04 <sup>Aa</sup>	5,62±0,13 <sup>Aa</sup>	5,54±0,04 <sup>Aa</sup>	ns
7	5,69±0,26 <sup>Aa</sup>	5,56±0,04 <sup>Aa</sup>	5,49±0,03 <sup>Aa</sup>	ns
10	5,64±0,23 <sup>Aa</sup>	5,50±0,13 <sup>Aa</sup>	5,44±0,15 <sup>Aa</sup>	ns
<b>Sig.</b>	ns	ns	ns	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.2 Salicórnia

Os valores médios de pH das amostras controlo, com sal e com diferentes concentrações de salicórnia apresentam-se na Figura 21 e Tabela 20.

O pH médio inicial obtido no tempo 1 apresenta um valor de 5,71, o que está de acordo com JAY *et al.* (2000) que demonstra que este valor deve situar-se entre 5,70 e 5,90 para carne de bovino fresca.

Como está evidenciado no gráfico da Figura 20, a amostra controlo apresenta o pH inicial e final mais elevado, comparando com as amostras com salicórnia e sal.

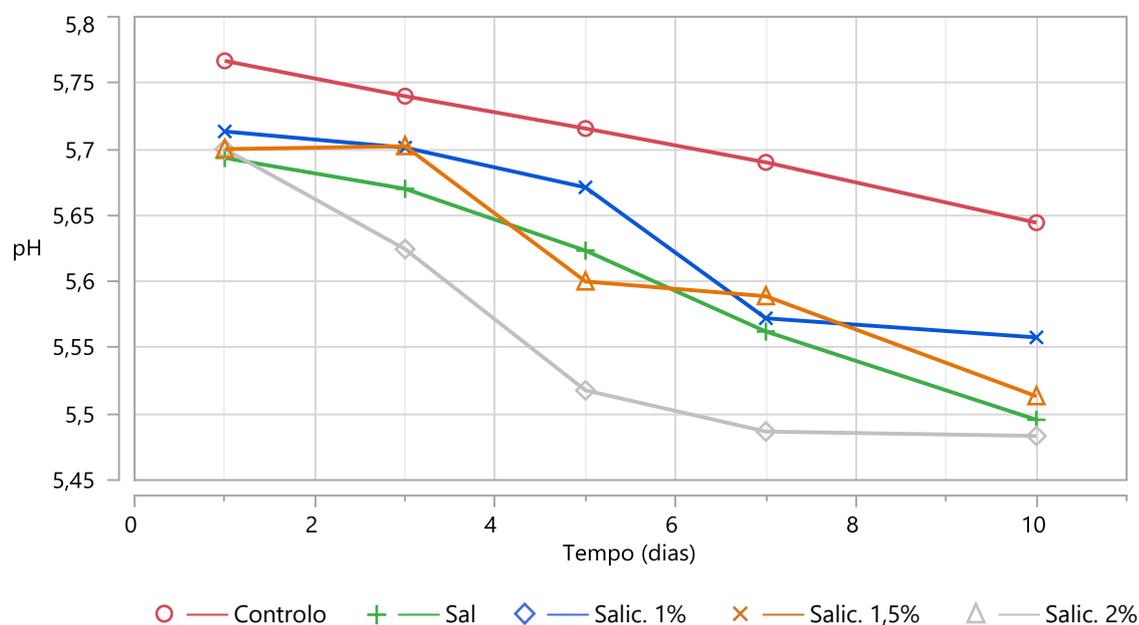


Figura 21: Gráfico da evolução do pH das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Conforme apresentado na Figura 21 e na Tabela 20 os valores médios finais correspondem a 5,54. Como dito anteriormente esta descida de pH pode ser atribuída à alta prevalência de BAL na carne ao longo de todo o período de armazenamento, tal como foi descrito por BLACKBURN (2006).

Examinando a Tabela 20 verifica-se que existe uma descida de pH contínua, em todas as condições, ao longo do período de armazenamento. Também é possível observar que todas as condições com salicórnia apresentam, em todos os tempos, valores inferiores de pH em relação à condição controlo.

Tabela 20: Valores de pH (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	5,77±0,19 <sup>Aa</sup>	5,69±0,18 <sup>Aa</sup>	5,71±0,13 <sup>Aa</sup>	5,70±0,18 <sup>Aa</sup>	5,70±0,19 <sup>Aa</sup>	ns
3	5,74±0,26 <sup>Aa</sup>	5,67±0,11 <sup>Aa</sup>	5,70±0,04 <sup>Aa</sup>	5,70±0,25 <sup>Aa</sup>	5,62±0,17 <sup>Aa</sup>	ns
5	5,72±0,04 <sup>Aa</sup>	5,62±0,13 <sup>Aa</sup>	5,67±0,09 <sup>Aa</sup>	5,60±0,13 <sup>Aa</sup>	5,52±0,10 <sup>Aa</sup>	ns
7	5,69±0,26 <sup>Aa</sup>	5,56±0,04 <sup>Aa</sup>	5,57±0,15 <sup>Aa</sup>	5,59±0,20 <sup>Aa</sup>	5,49±0,10 <sup>Aa</sup>	ns
10	5,64±0,23 <sup>Aa</sup>	5,50±0,13 <sup>Aa</sup>	5,56±0,22 <sup>Aa</sup>	5,51±0,19 <sup>Aa</sup>	5,48±0,25 <sup>Aa</sup>	ns
<b>Sig.</b>	ns	ns	ns	ns	ns	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

## 4.2.2 Atividade da água

### 4.2.2.1 Acerola

Os valores médios de atividade da água ( $a_w$ ) das amostras controlo, com sal e com acerola apresentam-se na Figura 22 e Tabela 21.

A  $a_w$  média inicial obtida no tempo 1 apresenta um valor de 0,989, estando de acordo com SCHMIDT *et al* (2007) que demonstra que este valor deve situar-se entre 0,980 e 0,992 para carne de bovino fresca.

Como está evidenciado no gráfico da Figura 22, a amostra com acerola apresenta a  $a_w$  mais baixa ao longo de todo o período de análise, seguida da amostra com sal e por fim a amostra controlo. Os resultados demonstram, como descrito por SCHMIDT *et al.* (2007), que a presença de cloreto de sódio e outros iões diminuem a atividade da água das carnes e dos produtos cárneos.

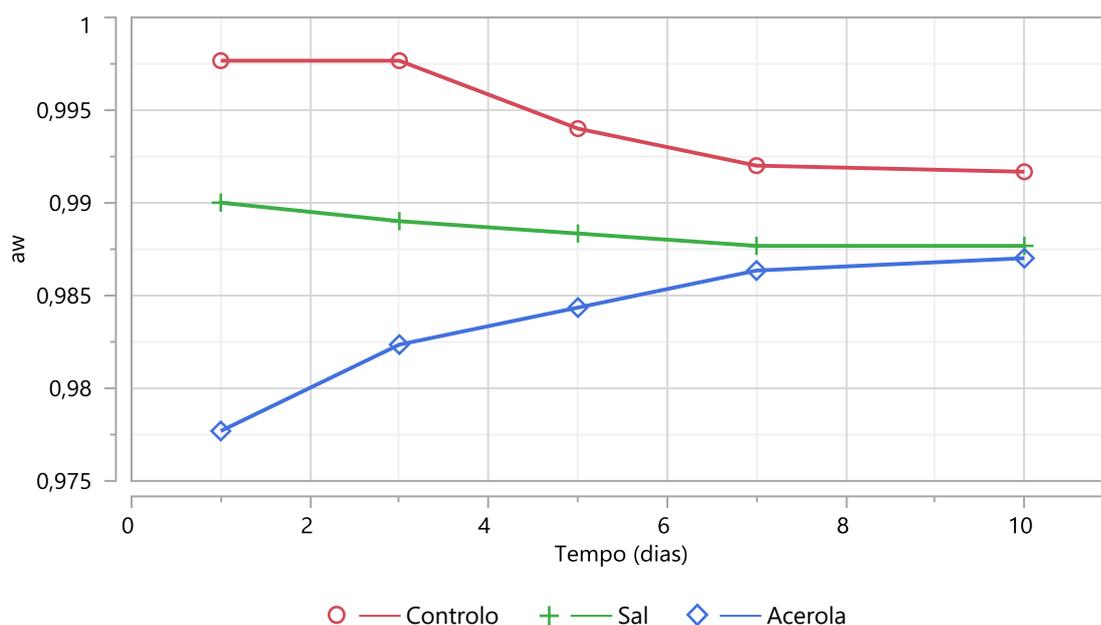


Figura 22: Gráfico da evolução da  $a_w$  das amostras controlo, sal e acerola.

Conforme apresentado na Figura 22 e na Tabela 21 os valores médios finais correspondem a 0,989.

Examinando a Tabela 21 observar-se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no tempo 1 entre as diferentes condições, de realçar que a amostra controlo difere significativamente das outras amostras analisadas.

Tabela 21: Valores de  $a_w$  (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	0,998±0,002 <sup>Aa</sup>	0,990±0,007 <sup>Aab</sup>	0,978±0,010 <sup>Ab</sup>	*
3	0,998±0,003 <sup>Aa</sup>	0,989±0,006 <sup>A</sup>	0,982±0,009 <sup>Aa</sup>	ns
5	0,994±0,001 <sup>Aa</sup>	0,988±0,009 <sup>Aa</sup>	0,984±0,007 <sup>Aa</sup>	ns
7	0,992±0,010 <sup>Aa</sup>	0,988±0,005 <sup>Aa</sup>	0,986±0,006 <sup>Aa</sup>	ns
10	0,991±0,002 <sup>Aa</sup>	0,988±0,009 <sup>Aa</sup>	0,987±0,002 <sup>Aa</sup>	ns
<b>Sig.</b>	ns	ns	ns	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.2 Salicórnia

Os valores médios de  $a_w$  das amostras controlo, com sal e com diferentes concentrações de salicórnia apresentam-se na Figura 23 e Tabela 22.

A  $a_w$  média inicial obtido no tempo 1 apresenta um valor de 0,991, o que está de acordo com SCHMIDT *et al* (2007) que demonstra que este valor deve situar-se entre 0,980 e 0,992 para carne fresca de bovino.

Como está evidenciado no gráfico da Figura 23, a amostra controlo apresenta a  $a_w$  inicial e final mais elevada, comparando com as amostras com salicórnia e sal. As amostras com diferentes concentrações de salicórnia demonstram uma  $a_w$  final inferior à amostra de sal. Vai de encontro ao que foi demonstrado por SCHMIDT *et al* (2007) que quando a concentração iónica aumenta, a  $a_w$  diminui proporcionalmente, sabe-se também que a salicórnia é rica em diversos iões para além do cloreto de sódio (cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio).

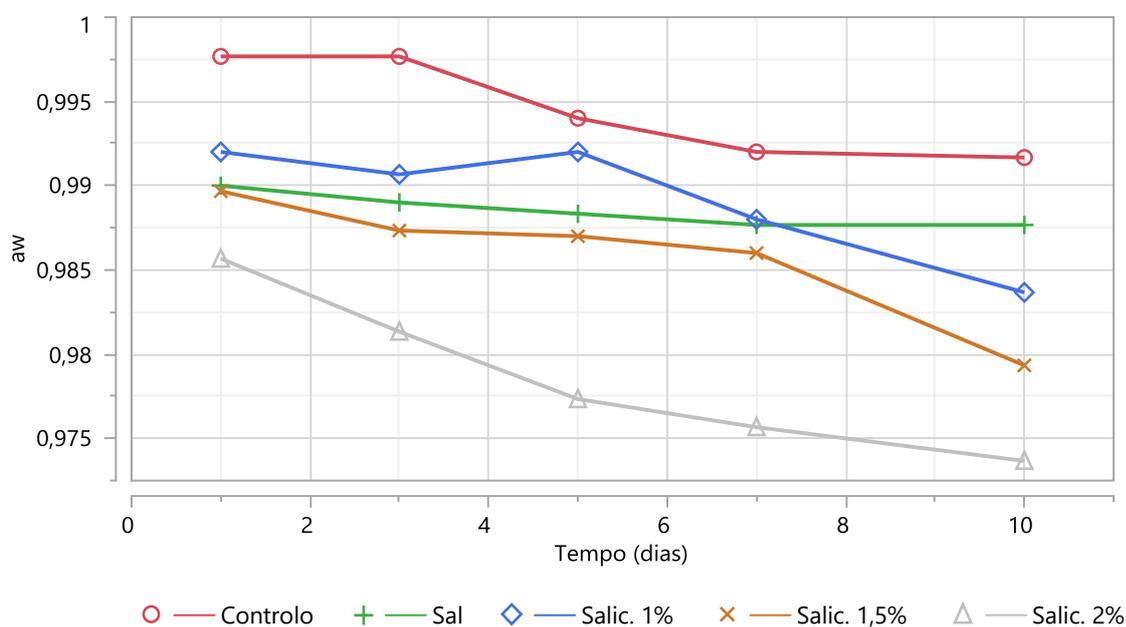


Figura 23: Gráfico da evolução da  $a_w$  das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Conforme apresentado na Figura 23 e na Tabela 22 os valores médios finais da  $a_w$  correspondem a 0,983.

É possível observar que todas as condições com salicórnia apresentam, em todos os tempos, valores inferiores de  $a_w$  em relação à condição controlo.

De salientar, na Tabela 22, as diferenças significativas entre condições presentes no tempo 5 ( $p < 0,05$ ) indicando diferenças entre a amostra de salic. 2% e todas as outras condições. No tempo 10 também é possível notar diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre todas as condições de salicórnia e o controlo, por outro lado a amostra salic. 2% difere também da amostra com sal e da amostra com salic. 1%.

Tabela 22: Valores de  $a_w$  (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	0,998±0,002 <sup>Aa</sup>	0,990±0,007 <sup>Aa</sup>	0,992±0,007 <sup>A</sup>	0,990±0,004 <sup>Aa</sup>	0,986±0,008 <sup>A</sup>	ns
3	0,998±0,003 <sup>Aa</sup>	0,989±0,006 <sup>Aa</sup>	0,991±0,004 <sup>Aa</sup>	0,987±0,011 <sup>Aa</sup>	0,981±0,001 <sup>ABa</sup>	ns
5	0,994±0,001 <sup>Aa</sup>	0,988±0,009 <sup>Aab</sup>	0,992±0,004 <sup>Aab</sup>	0,987±0,005 <sup>Aab</sup>	0,977±0,003 <sup>ABb</sup>	*
7	0,992±0,010 <sup>Aa</sup>	0,988±0,005 <sup>Aa</sup>	0,988±0,008 <sup>Aa</sup>	0,986±0,006 <sup>Aa</sup>	0,976±0,003 <sup>ABa</sup>	ns
10	0,991±0,002 <sup>Aa</sup>	0,988±0,009 <sup>Aab</sup>	0,984±0,002 <sup>Abc</sup>	0,979±0,002 <sup>AcD</sup>	0,974±0,004 <sup>Bd</sup>	***
<b>Sig.</b>	ns	ns	ns	ns	*	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Coordenadas de cor CIE-L\*a\*b\*

A determinação da cor objetiva das amostras de carne baseou-se na determinação de acordo com o espaço de cor CIE-Lab.

Os resultados correspondentes estão apresentados separadamente de acordo com cada coordenada de cor ao longo de todo o período de armazenamento dos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P.

### 4.2.3.1 Parâmetro L\*

#### 4.2.3.1.1 Acerola

Os resultados médios do parâmetro L\* das amostras controlo, com sal e com acerola estão representados na Figura 24 e Tabela 23.

O valor médio inicial do parâmetro L\* no tempo inicial corresponde a 38,16 que está de acordo com LI et al. (2012) que analisou os parâmetros de cor e definiu que a coordenada L\* apresenta um valor de  $37.61 \pm 0.31$  no dia 1. Analisando o gráfico da Figura 24 é possível verificar que a amostra controlo obteve durante todo o período valores superiores quanto ao parâmetro L\*, seguido da amostra com acerola sendo que a amostra com sal foi a que apresentou valores mais baixos, também se aprecia um aumento da luminosidade até ao dia 3 que começa a declinar progressivamente até ao fim do período analisado até atingir uma média de 39,55.

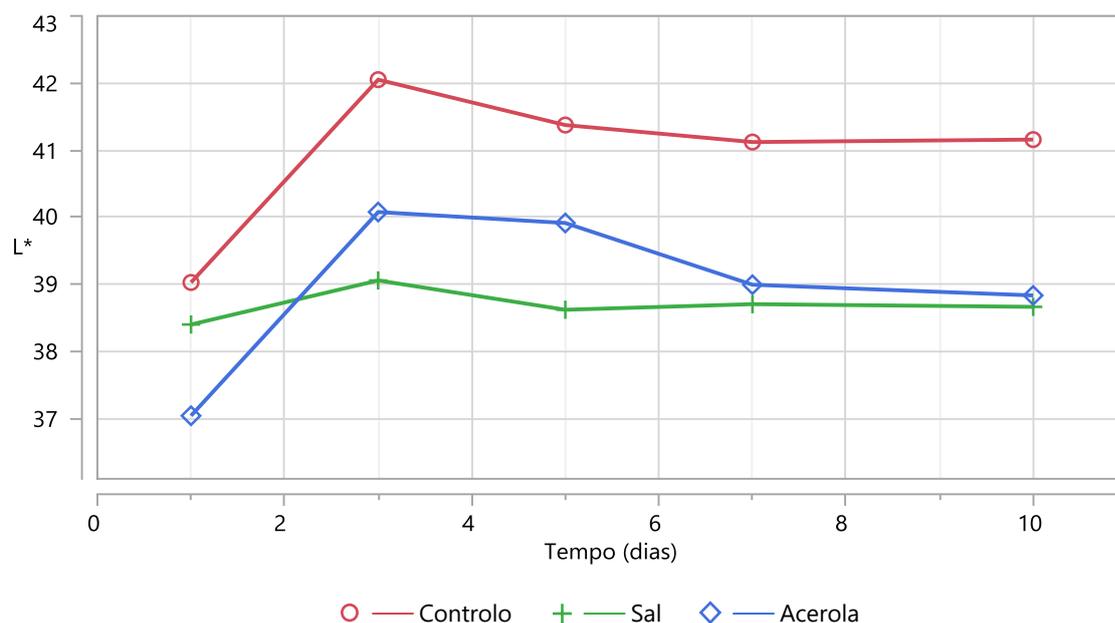


Figura 24: Gráfico da evolução do parâmetro L\* das amostras controlo, sal e acerola.

Na Tabela 23 é possível verificar que não se observa nenhuma diferença significativa quanto ao parâmetro L\* tendo em conta o efeito tempo e o efeito dos diferentes ingredientes adicionados.

Tabela 23: Valores do parâmetro L\* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	39,03±0,96 <sup>Aa</sup>	38,40±2,43 <sup>Aa</sup>	37,04±1,85 <sup>Aa</sup>	ns
3	42,05±1,01 <sup>Aa</sup>	39,06±2,94 <sup>Aa</sup>	40,08±0,59 <sup>Aa</sup>	ns
5	41,37±0,23 <sup>Aa</sup>	38,62±0,54 <sup>Aa</sup>	39,91±0,12 <sup>Aa</sup>	ns
7	41,12±0,56 <sup>Aa</sup>	38,70±1,32 <sup>Aa</sup>	38,99±1,72 <sup>Aa</sup>	ns
10	41,16±2,32 <sup>Aa</sup>	38,66±0,03 <sup>Aa</sup>	38,83±0,13 <sup>Aa</sup>	ns
<b>Sig.</b>	ns	ns	ns	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.1.2 Salicórnia

Os resultados médios do parâmetro L\* das amostras controlo, com sal e diferentes concentrações de salicórnia estão representados na Figura 25 e Tabela 24.

O valor médio inicial do parâmetro L\* no tempo inicial corresponde a 35,9., o que não está de acordo com o parâmetro definido por LI et al. (2012), o que pode ser explicado pela adição de salicórnia que, pela sua forte coloração, alterou o padrão de cor dos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P de forma expressiva. Analisando o gráfico da Figura 25 é possível verificar que a amostra controlo obteve durante todo o período valores superiores quanto ao parâmetro L\*, por outro lado as amostras com salicórnia apresentaram valores mais baixos deste parâmetro. Quanto maior quantidade de salicórnia foi adicionada menor foi a luminosidade medida. também se aprecia um aumento da luminosidade até ao dia 3 que começa a declinar progressivamente até ao fim do período analisado até atingir uma média de 39,55.

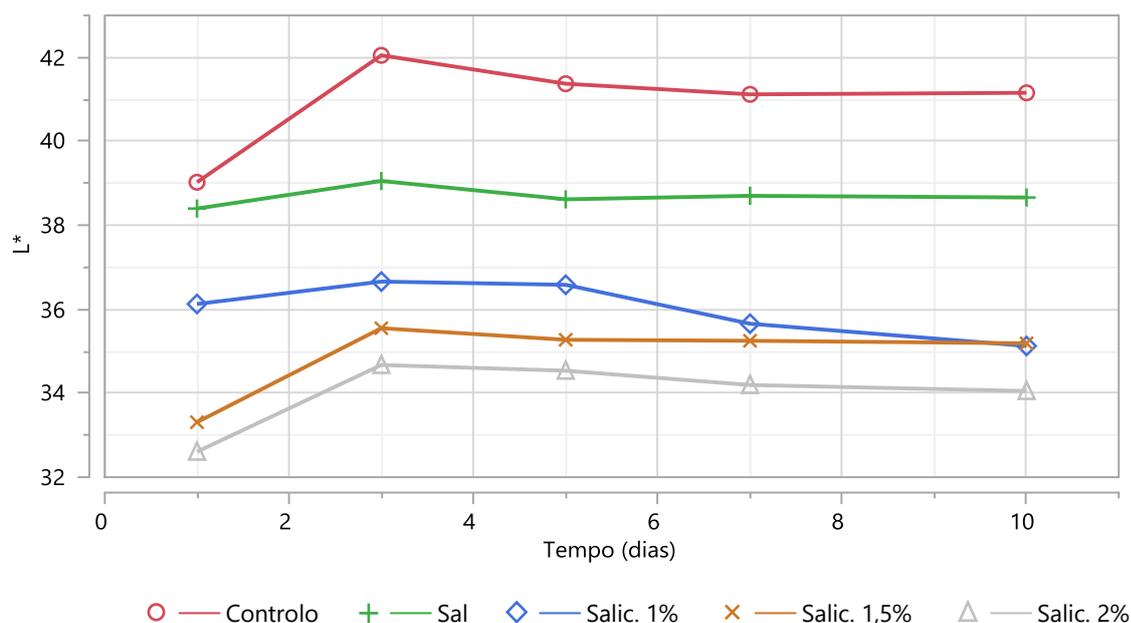


Figura 25: Gráfico da evolução do parâmetro L\* das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Analisando a Tabela 24 é possível verificar diferenças significativa quanto ao parâmetro L\* tendo em conta o efeito tempo e o efeito dos diferentes ingredientes adicionados. Quanto ao tempo é possível denotar diferenças significativas entre o tempo 1 e o tempo 10 relativos à amostra de salic. 2% ( $p < 0,05$ )

Tabela 24: Valores do parâmetro L\* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	39,03±0,96 <sup>Aa</sup>	38,40±2,43 <sup>Aa</sup>	36,13±2,28 <sup>Aab</sup>	33,31±1,98 <sup>Ab</sup>	32,61±0,61 <sup>Bb</sup>	**
3	42,05±1,01 <sup>Aa</sup>	39,06±2,94 <sup>Aab</sup>	36,66±0,24 <sup>Abc</sup>	37,58±0,22 <sup>Abc</sup>	34,67±0,80 <sup>Ac</sup>	***
5	41,37±0,23 <sup>Aa</sup>	38,62±0,54 <sup>Ab</sup>	36,58±0,10 <sup>Ac</sup>	35,55±0,14 <sup>Ad</sup>	34,54±0,66 <sup>Ad</sup>	***
7	41,12±0,56 <sup>Aa</sup>	38,70±1,32 <sup>Ab</sup>	35,66±0,20 <sup>Ac</sup>	35,27±0,21 <sup>Ac</sup>	34,20±0,40 <sup>ABc</sup>	***
10	41,16±2,32 <sup>Aa</sup>	38,66±0,03 <sup>Aa</sup>	35,13±0,11 <sup>Ab</sup>	35,19±0,38 <sup>Ab</sup>	34,05±0,61 <sup>ABb</sup>	***
<b>Sig.</b>	ns	ns	ns	ns	*	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.2.3.2 Parâmetro $a^*$

#### 4.2.3.2.1 Acerola

Os resultados médios do parâmetro  $a^*$  das amostras controlo, com sal e com acerola estão representados na Figura 26 e Tabela 25.

Era esperado que no tempo inicial houvesse um aumento da coordenada  $a^*$  devido à passagem da forma desoximioglobina em oximioglobina devido à MAP rica em  $O_2$ , como se pode verificar no gráfico da Figura 26. LIMBO *et al.* (2010)

O valor médio inicial do parâmetro  $a^*$  no tempo inicial corresponde a 21,10, similar aos resultados obtidos por LI *et al.* (2012) em carne picada embalada em MAP com alto teor de oxigénio. Analisando o gráfico da Figura 26 é possível verificar que a amostra controlo obteve valores superiores quanto ao parâmetro  $a^*$  nos 3 primeiros dias mas de seguida a partir do dia 3 a situação inverteu-se sendo que a acerola obteve resultados superiores em relação a este parâmetro, também se aprecia um aumento do parâmetro  $a^*$  até ao dia 3 que começa a declinar progressivamente até ao fim do período analisado até atingir uma média final de 17,24. O declínio da coordenada  $a^*$  deve-se à oxidação gradual da mioglobina e ao acumular de metamioglobina com o tempo decorrido (LIMBO *et al.*, 2010).

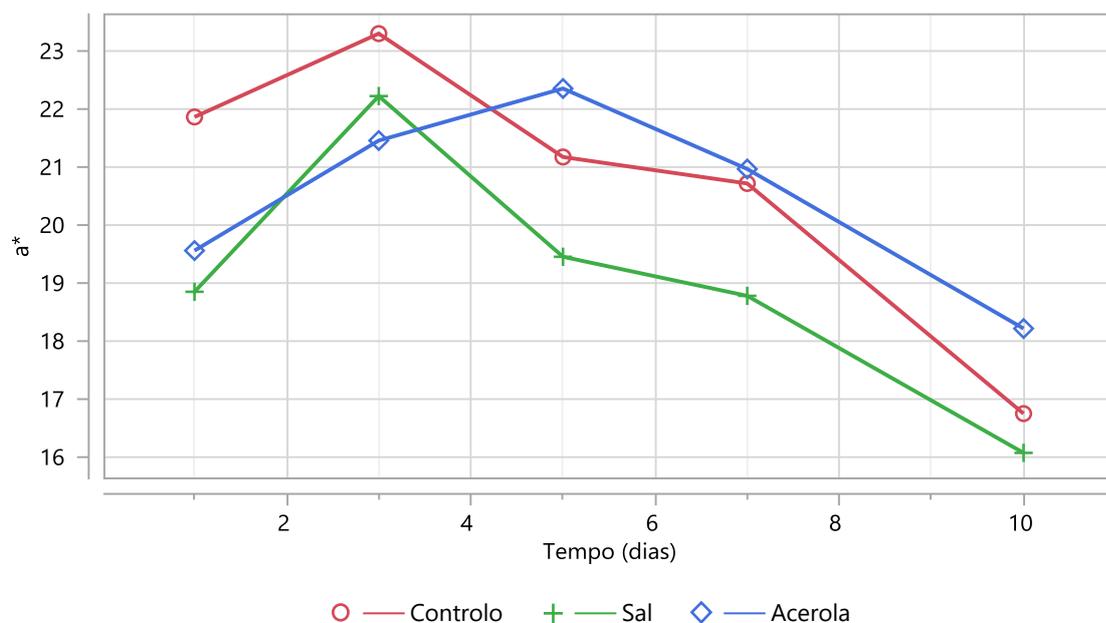


Figura 26: Gráfico da evolução do parâmetro  $a^*$  das amostras controlo, sal e acerola.

Analisando a Tabela 25 é possível verificar que diferenças significativas quanto ao parâmetro  $a^*$  tendo em conta o efeito tempo e o efeito dos diferentes ingredientes adicionados. Quanto ao efeito tempo é possível denotar diferenças significativas em todas as condições analisadas ( $p < 0,05$ ). Quanto às diferentes condições denota-se diferenças significativas no tempo 1, no qual a condição controlo difere significativamente da condição com sal e com acerola ( $p < 0,01$ ).

Tabela 25: Valores do parâmetro  $a^*$  (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	21,86±0,84 <sup>ABa</sup>	18,85±0,25 <sup>ABb</sup>	19,56±0,77 <sup>ABb</sup>	**
3	23,30±1,99 <sup>Aa</sup>	22,22±1,59 <sup>Aa</sup>	21,46±0,71 <sup>ABa</sup>	ns
5	21,17±1,48 <sup>ABa</sup>	19,45±1,82 <sup>ABa</sup>	22,35±1,35 <sup>Aa</sup>	ns
7	20,72±0,46 <sup>ABa</sup>	18,78±0,92 <sup>ABa</sup>	20,97±0,70 <sup>ABa</sup>	ns
10	16,75±0,60 <sup>Ba</sup>	16,07±1,23 <sup>Ba</sup>	18,22±1,53 <sup>Ba</sup>	ns
<b>Sig.</b>	*	*	*	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.2.1 Salicórnia

Os resultados médios do parâmetro  $a^*$  das amostras controlo, com sal e diferentes concentrações de salicórnia estão representados na Figura 27 e Tabela 26.

O valor médio inicial do parâmetro  $a^*$  no tempo inicial corresponde a 17,70, o que não está em linha com o que foi observado por (LI et al. 2012), podendo ser explicado pelo facto das amostras com salicórnia adicionada adquirirem uma coloração mais acastanhada proveniente dos pigmentos da salicórnia. Analisando o gráfico da Figura 27 é possível verificar que a amostra controlo obteve durante todo o período valores superiores quanto ao parâmetro  $a^*$ , seguido da amostra com sal sendo que as amostras com salicórnia obtiveram os valores mais baixos. Pode-se afirmar que com o aumento da concentração de salicórnia, diminui a cor vermelha das amostras. Também se aprecia um aumento da coordenada  $a^*$  até ao dia 3 que começa a declinar progressivamente até ao fim do período analisado até atingir uma média de 15,44.

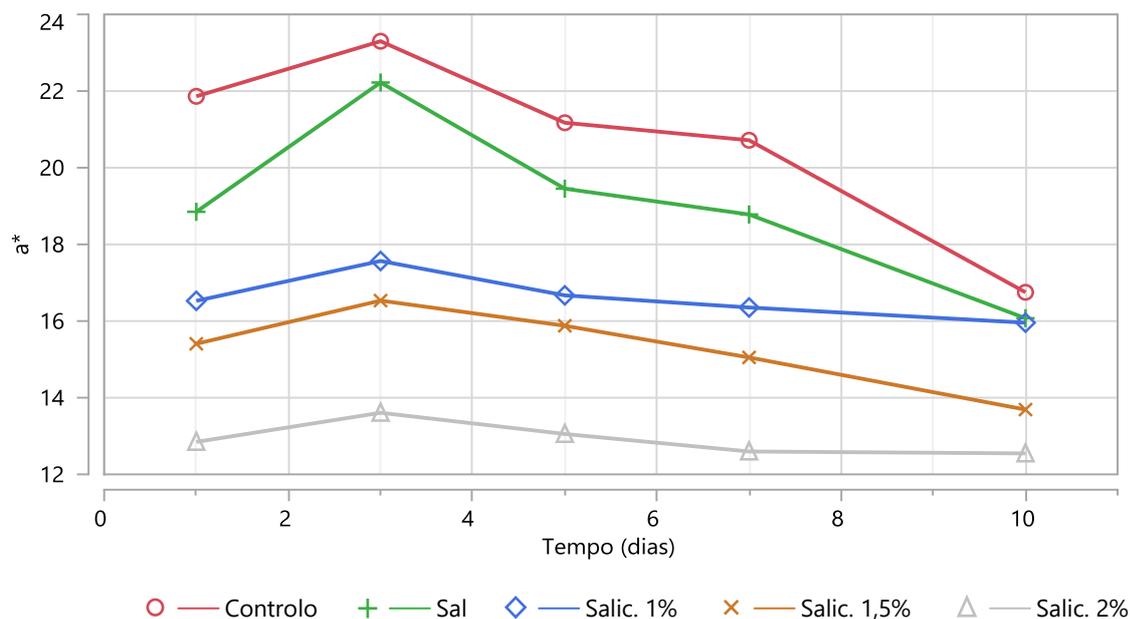


Figura 27: Gráfico da evolução do parâmetro  $a^*$  das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Examinando a Tabela 26 é possível verificar que existem diferenças significativas quanto ao parâmetro  $a^*$  tendo em conta o efeito tempo e o efeito dos diferentes ingredientes adicionados. Quanto ao efeito tempo é possível denotar diferenças significativas em relação à condição controlo e com sal ( $p < 0,05$ ). Quanto às diferentes condições denota-se diferenças significativas em todos os tempos excetuando o tempo 10, no qual a condição controlo e a condição com sal difere significativamente das condições com salicórnia ( $p < 0,001$ ). O efeito tempo não é possível ser verificado nas amostras com salicórnia, provavelmente devido ao facto da adição de salicórnia mascarar a cor e o estado de oxidação da mioglobina que dá a cor vermelha à carne fresca.

Tabela 26: Valores do parâmetro a\* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	21,86±0,84 <sup>ABa</sup>	18,85±0,25 <sup>ABa</sup>	16,53±0,31 <sup>Ab</sup>	15,41±1,19 <sup>Ab</sup>	12,85±1,01 <sup>Ac</sup>	***
3	23,30±1,99 <sup>Aa</sup>	22,22±1,59 <sup>ABab</sup>	17,57±0,36 <sup>Abc</sup>	16,53±0,60 <sup>Abc</sup>	13,61±0,09 <sup>Ac</sup>	***
5	21,17±1,48 <sup>ABa</sup>	19,45±1,82 <sup>Aa</sup>	16,67±0,15 <sup>Ab</sup>	15,88±0,45 <sup>Ab</sup>	13,05±0,65 <sup>Ab</sup>	***
7	20,72±0,46 <sup>ABa</sup>	18,78±0,92 <sup>ABa</sup>	16,35±0,19 <sup>Ab</sup>	15,05±0,90 <sup>Abc</sup>	12,60±0,75 <sup>Ac</sup>	***
10	16,75±0,60 <sup>Ba</sup>	16,07±1,23 <sup>B</sup>	15,96±0,76 <sup>Aa</sup>	13,69±1,01 <sup>Aa</sup>	12,55±1,99 <sup>Aa</sup>	ns
<b>Sig.</b>	*	*	ns	ns	ns	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.2.3.3 Parâmetro b\*

#### 4.2.3.3.1 Acerola

Os resultados médios do parâmetro b\* das amostras controlo, com sal e com acerola estão representados na Figura 28 e Tabela 27.

O valor médio inicial do parâmetro b\* no tempo inicial corresponde a 12,41. Analisando o gráfico da Figura 28 é possível verificar que a amostra controlo obteve valores superiores quanto ao parâmetro b\* nos 3 primeiros dias mas de seguida a partir do dia 3 a situação inverteu-se sendo que a acerola obteve resultados superiores em relação a este parâmetro, também se aprecia um aumento do parâmetro b\* até ao dia 3 em relação às amostras controlo e com sal, em oposição à amostra com acerola que apresenta uma evolução positiva até ao dia 5, por fim o parâmetro b\* começa a declinar progressivamente até ao fim do período analisado até atingir uma média final de 9,52.

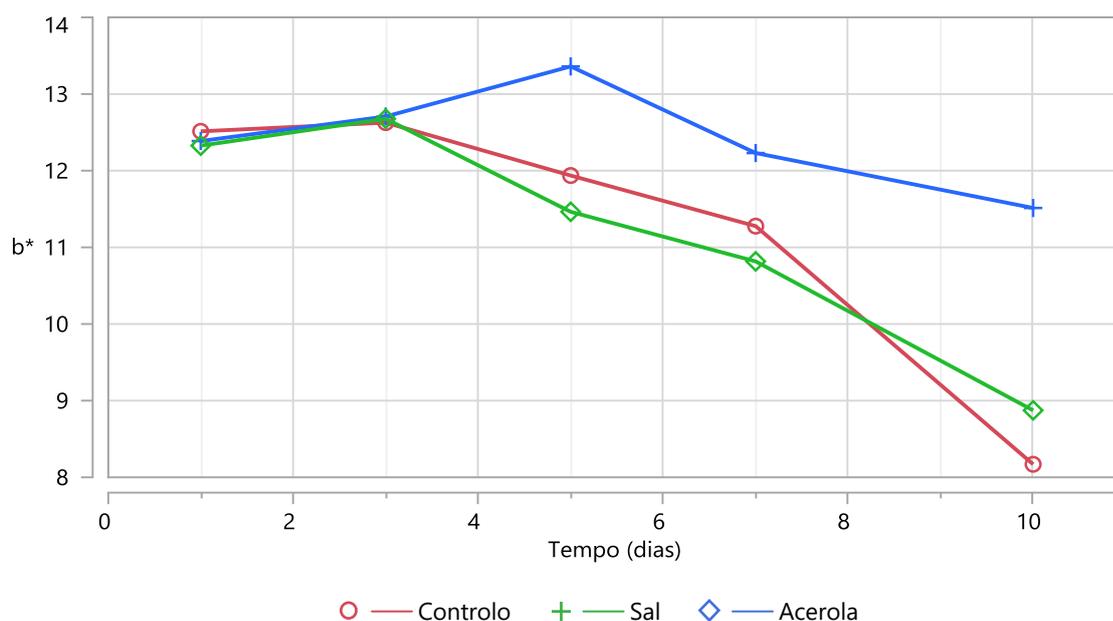


Figura 28: Gráfico da evolução do parâmetro b\* das amostras controlo, sal e acerola.

Examinando a tabela 28 é possível verificar que não existem diferenças significativas quanto ao parâmetro b\* tendo em conta o efeito tempo. Estes resultados vão ao encontro do demonstrado por (Li et al., 2012) onde não foram encontradas diferenças significativas no parâmetro b\* de carne de bovino armazenada em MAP ao longo do tempo.

Tabela 27: Valores do parâmetro b\* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	12,51±0,95 <sup>Aa</sup>	12,33±0,12 <sup>Aa</sup>	12,39±0,44 <sup>Aa</sup>	ns
3	12,63±0,69 <sup>Aa</sup>	12,68±1,21 <sup>Aa</sup>	12,71±1,01 <sup>Aa</sup>	ns
5	11,94±0,03 <sup>Aa</sup>	11,46±1,25 <sup>Aa</sup>	13,36±0,4A <sup>Aa</sup>	ns
7	11,28±2,69 <sup>Aa</sup>	10,82±1,23 <sup>Aa</sup>	12,23±0,93 <sup>Aa</sup>	ns
10	8,17±0,92 <sup>Aa</sup>	8,87±1,30 <sup>Aa</sup>	11,51±0,41 <sup>Aa</sup>	ns
<b>Sig.</b>	ns	ns	ns	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.3.3.1 Salicórnia

Os resultados médios do parâmetro  $b^*$  das amostras controlo, com sal e diferentes concentrações de salicórnia estão representados na Figura 29 e Tabela 28.

O valor médio inicial do parâmetro  $b^*$  no tempo inicial corresponde a 12,23. Analisando o gráfico da Figura 29 é possível verificar que a amostra com salic. 1% obteve durante o período inicial valores superiores quanto ao parâmetro  $b^*$ , seguido da amostra controlo. No entanto o parâmetro  $b^*$  mantém-se mais estável nas amostras com salicórnia, possibilitando no período final resultados superiores quando comparados com o controlo e a amostra com acerola adicionada. Também se aprecia um aumento do parâmetro  $b^*$  até ao dia 3 que começa a declinar progressivamente até ao fim do período analisado até atingir uma média de 9,62.

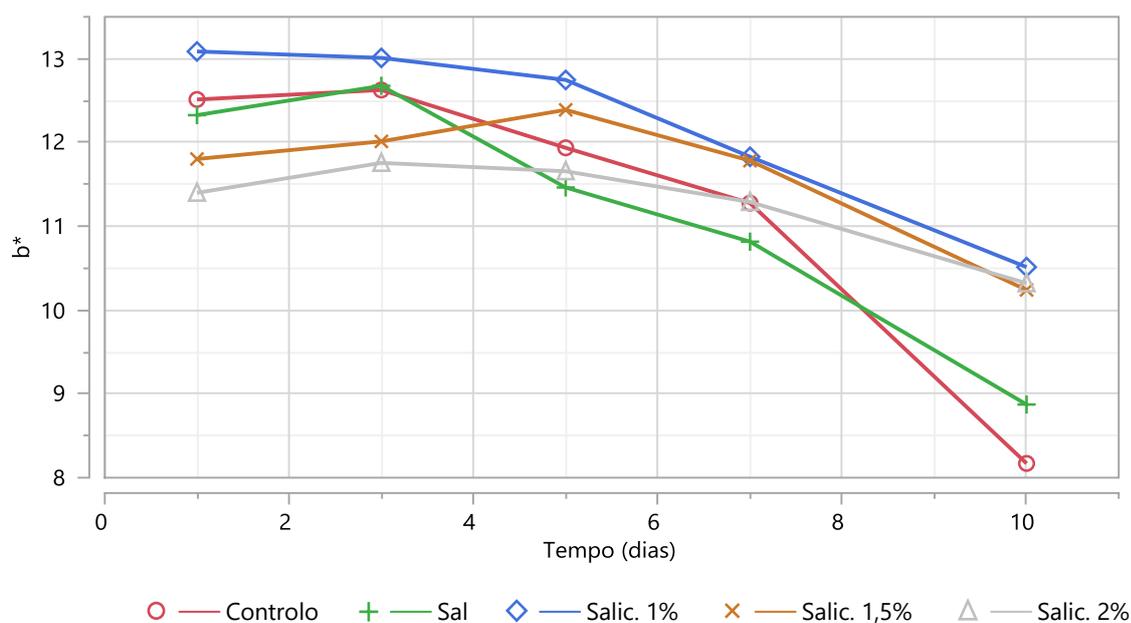


Figura 29: Gráfico da evolução do parâmetro  $b$  das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Examinando a tabela 28 é possível verificar que não existem diferenças significativas quanto ao parâmetro  $b^*$ , como descrito por LI *et al.* (2012) que não encontrou diferenças significativas no parâmetro  $b^*$  ao longo do tempo em carne de bovino armazenada em MAP.

Tabela 28: Valores do parâmetro b\* (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	12,51±0,95 <sup>Aa</sup>	12,33±0,12 <sup>Aa</sup>	13,09±0,75 <sup>Aa</sup>	11,80±0,57 <sup>Aa</sup>	11,40±1,09 <sup>Aa</sup>	ns
3	12,63±0,69 <sup>Aa</sup>	12,68±1,21 <sup>Aa</sup>	13,01±0,59 <sup>Aa</sup>	12,01±0,38 <sup>Aa</sup>	11,76±0,84 <sup>Aa</sup>	ns
5	11,94±0,03 <sup>Aa</sup>	11,46±1,25 <sup>Aa</sup>	12,75±0,40 <sup>Aa</sup>	12,39±0,41 <sup>Aa</sup>	11,66±0,36 <sup>Aa</sup>	ns
7	11,28±2,69 <sup>Aa</sup>	10,82±1,23 <sup>Aa</sup>	11,83±0,96 <sup>Aa</sup>	11,78±0,71 <sup>Aa</sup>	11,29±1,20 <sup>Aa</sup>	ns
10	8,17±0,92 <sup>Aa</sup>	8,87±1,30 <sup>Aa</sup>	10,51±0,86 <sup>Aa</sup>	10,24±0,67 <sup>Aa</sup>	10,32±0,60 <sup>Aa</sup>	ns
<b>Sig.</b>	ns	ns	ns	ns	ns	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Análise sensorial

#### 4.3.1 Cor

Foram analisados dois parâmetros de cor na análise sensorial recorrendo a uma escala de 0 a 9 cm, o escurecimento da cor vermelha que varia entre vermelho-vivo até ao vermelho escuro (sendo que 0 cm é a cor mais viva e 9 cm a cor mais escura). A intensidade da cor castanha também foi avaliada e varia entre bege e castanho escuro (sendo que 0 cm corresponde à cor mais clara e 9 cm à cor mais escura).

##### 4.3.1.1 Acerola

O gráfico da Figura 30 e a Tabela 29 demonstram a evolução da cor dos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P segundo a análise sensorial executada pelo painel de provadores treinado.

De acordo com os gráficos da Figura 30 é possível observar que, como esperado, a cor vermelho-vivo começa a tornar-se vermelho escuro e a cor castanha intensifica-se, ao longo do tempo decorrido. É também possível observar que os hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P com acerola apresentam uma menor coloração acastanhada ao longo do período analisado.

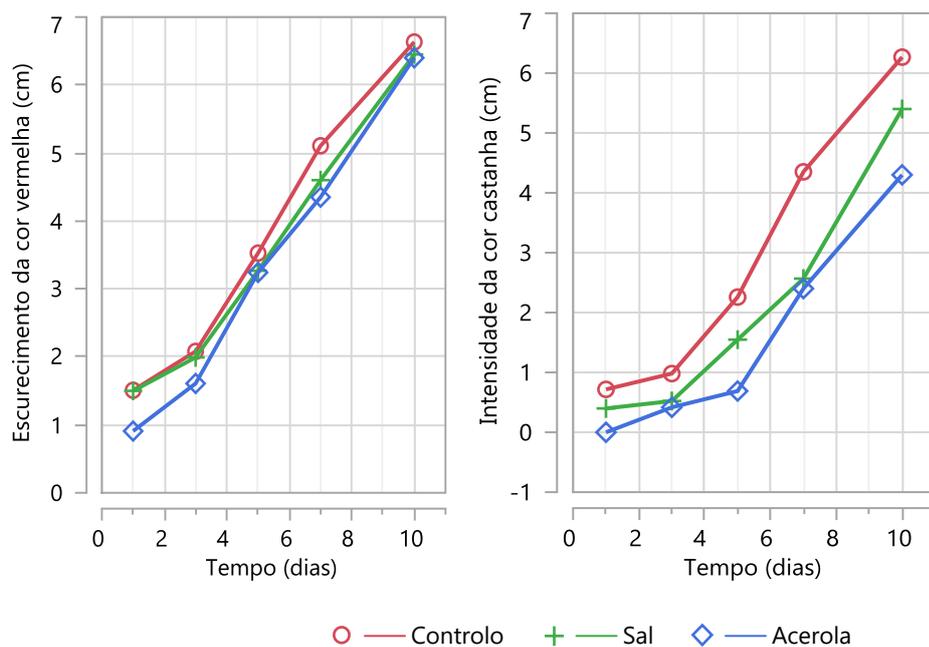


Figura 30: Gráfico da evolução da cor observada das amostras controlo, sal e acerola.

A Tabela 29 demonstra que existem diferenças significativas em relação ao efeito do tempo nos parâmetros relacionados com a cor da carne, como era expectável, devido à deterioração química e microbiana que ocorre ao longo do tempo que causa oxidação da mioglobina e a consequente acumulação de metahemoglobina. (LIMBO *et al.* 2010)

Tabela 29: Cor vermelha e castanha observada (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
<b>Vermelho</b>				
1	1,51±0,78 <sup>Aa</sup>	1,50±0,25 <sup>Aa</sup>	0,91±0,85 <sup>Aa</sup>	ns
3	2,08±0,97 <sup>Aa</sup>	1,99±0,41 <sup>Aa</sup>	1,61±0,56 <sup>ABa</sup>	ns
5	3,53±0,45 <sup>ABa</sup>	3,27±0,47 <sup>Ba</sup>	3,24±0,69 <sup>BCa</sup>	ns
7	5,11±1,57 <sup>BCa</sup>	4,60±1,18 <sup>Ca</sup>	4,35±1,45 <sup>Ca</sup>	ns
10	6,63±0,73 <sup>Ca</sup>	6,45±0,30 <sup>Da</sup>	6,40±0,70 <sup>Da</sup>	ns
<b>Sig.</b>	***	***	***	
<b>Castanho</b>				
1	0,72±0,33 <sup>Aa</sup>	0,40±0,19 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	ns
3	0,98±0,84 <sup>ABa</sup>	0,52±0,30 <sup>Aa</sup>	0,42±0,08 <sup>ABa</sup>	ns
5	2,26±0,89 <sup>ABa</sup>	1,55±0,21 <sup>ABa</sup>	0,69±0,20 <sup>BCa</sup>	ns
7	4,35±1,27 <sup>ABa</sup>	2,57±0,97 <sup>ABa</sup>	2,40±0,56 <sup>BCa</sup>	ns
10	6,27±2,14 <sup>Ba</sup>	5,40±1,87 <sup>Ba</sup>	4,30±1,83 <sup>Ca</sup>	ns
<b>Sig.</b>	*	**	**	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.1.2 Salicórnia

O gráfico da Figura 31 e a Tabela 30 demonstram a evolução da cor dos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P segundo a análise sensorial executada pelo painel de provadores treinado.

No gráfico da Figura 31 verifica-se que o painel de provadores definiu imediatamente no tempo 1 que as condições com salicórnia adicionada aparentavam uma cor vermelho mais escuro e também com maior intensidade de cor castanha. É possível observar que com o aumento da concentração de salicórnia também ocorre o aumento da percepção de vermelho mais escuro e maior intensidade da cor castanha em todos os tempos analisados. É importante constatar que esta coloração mais escura nos tempos iniciais quando comparada com a amostra controlo não se liga com a deterioração, mas sim devido à própria pigmentação da salicórnia. Ao longo do tempo ocorre o escurecimento da cor vermelha e a intensificação da

cor castanha de todas as amostras em estudo devido à acumulação de metahemoglobina como referido anteriormente.

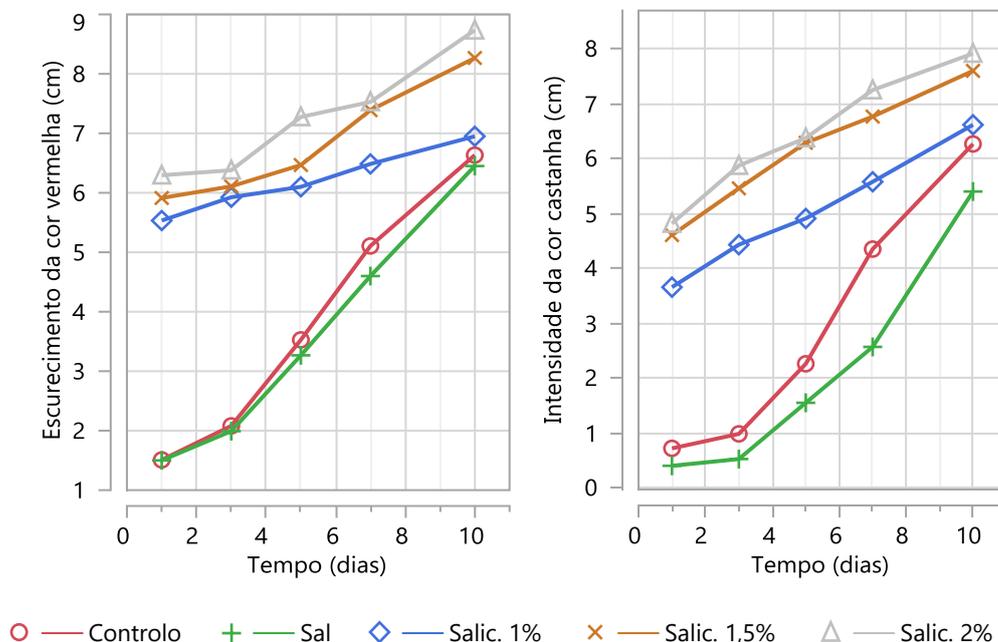


Figura 31: Gráfico da evolução da cor observada das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salc. 2%.

Em relação à Tabela 30 observam-se diferenças significativas quanto ao efeito tempo e entre as diferentes condições analisadas.

Quanto ao efeito tempo é possível observar diferenças significativas em relação a todas as condições quando observada a cor vermelha. Em relação ao parâmetro da cor castanha as amostras com salicórnia não demonstraram diferenças significativas.

Quando se observa as diferenças entre condições, presentes na Tabela 35, é possível denotar que as amostras com salicórnia adicionada diferem significativamente das amostras com sal e controlo em todos os tempos analisados, tanto em relação à cor vermelha com a cor castanha.

Tabela 30: Cor vermelha e castanha observada (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
<b>Vermelho</b>						
1	1,51±0,78 <sup>Aa</sup>	1,50±0,25 <sup>Aa</sup>	5,53±0,89 <sup>Ab</sup>	5,91±0,41 <sup>Ab</sup>	6,29±0,73 <sup>Ab</sup>	***
3	2,08±0,97 <sup>Aa</sup>	1,99±0,41 <sup>Aa</sup>	5,93±0,99 <sup>Ab</sup>	6,11±0,90 <sup>Ab</sup>	6,38±0,93 <sup>Ab</sup>	***
5	3,53±0,45 <sup>ABa</sup>	3,27±0,47 <sup>Ba</sup>	6,10±0,77 <sup>ABb</sup>	6,47±0,35 <sup>ABb</sup>	7,28±1,53 <sup>ABb</sup>	***
7	5,11±1,57 <sup>BCa</sup>	4,60±1,18 <sup>Ca</sup>	6,49±0,60 <sup>ABb</sup>	7,39±0,83 <sup>BCb</sup>	7,53±1,13 <sup>ABb</sup>	***
10	6,63±0,73 <sup>Ca</sup>	6,45±0,30 <sup>Da</sup>	6,95±0,39 <sup>Bb</sup>	8,27±0,64 <sup>Cb</sup>	8,73±0,49 <sup>Bb</sup>	***
<b>Sig.</b>	***	***	*	**	*	
<b>Castanho</b>						
1	0,72±0,33 <sup>Ab</sup>	0,40±0,19 <sup>Aa</sup>	3,66±1,55 <sup>Ab</sup>	4,61±1,80 <sup>Ab</sup>	4,82±1,18 <sup>Ab</sup>	*
3	0,98±0,84 <sup>ABa</sup>	0,52±0,30 <sup>Aa</sup>	4,43±1,45 <sup>Ab</sup>	5,46±1,47 <sup>Ab</sup>	5,87±2,21 <sup>Ab</sup>	**
5	2,26±0,89 <sup>ABa</sup>	1,55±0,21 <sup>ABa</sup>	4,91±0,98 <sup>Ab</sup>	6,29±1,75 <sup>Ab</sup>	6,38±2,08 <sup>Ab</sup>	*
7	4,35±1,27 <sup>ABab</sup>	2,57±0,97 <sup>ABa</sup>	5,58±1,67 <sup>Ab</sup>	6,77±1,15 <sup>Ab</sup>	7,25±1,19 <sup>Ab</sup>	*
10	6,27±2,14 <sup>Bab</sup>	5,40±1,87 <sup>Bb</sup>	6,62±1,16 <sup>Aabc</sup>	7,60±1,23 <sup>Abc</sup>	7,92±0,35 <sup>Ac</sup>	**
<b>Sig.</b>	*	*	ns	ns	ns	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.2 Cheiro a deteriorado

O cheiro a deteriorado foi avaliado com auxílio de uma escala de 0 a 9 cm, sendo que 0 cm corresponde a ausência de cheiro a deteriorado e 9 cm corresponde à maior intensidade de cheiro a deteriorado.

#### 4.3.2.1 Acerola

O gráfico da Figura 32 da imagem demonstra a evolução do cheiro a deteriorado sentido ao longo do tempo de estudo. A amostra com acerola adicionada apresenta valores de cheiro a deteriorado menores quando comparados com a amostra controlo e a amostra com sal. Esta diferença torna-se perceptível principalmente a partir do dia 5.

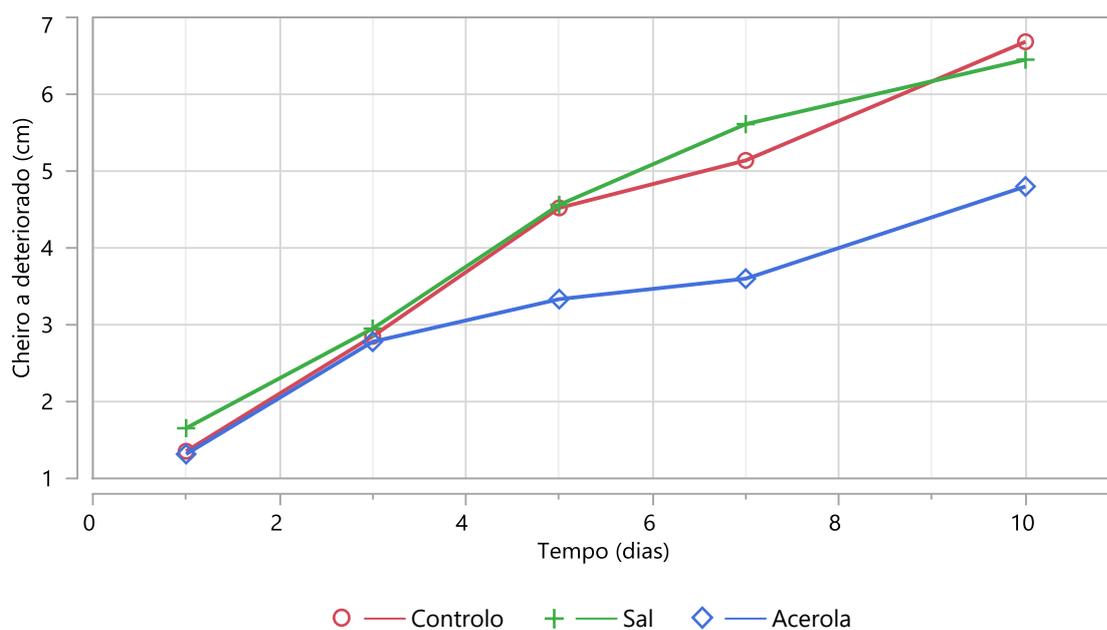


Figura 32: Gráfico da evolução do cheiro a deteriorado nas amostras controlo, sal e acerola.

Como seria esperado, observando a Tabela 31, o efeito tempo é notório nas condições analisadas observando-se diferenças significativas ( $p < 0,01$ ). Por outro lado, no tempo 10 é possível notar diferenças significativas entre condições, sendo que a condição com acerola difere significativamente das amostras controlo e com sal ( $p < 0,01$ ), este facto pode dever-se à menor contaminação microbiana que amostra com acerola demonstrou em relação às *Pseudomonas* (Figura 11), conhecido microrganismo pela sua grande atividade proteolítica e consequentemente deteriorativa. (NYCHAS, 2008). Esta menor contaminação pode permitir a menor presença de *off-odors*, já que este microrganismo está diretamente ligado à presença dos mesmos.

Tabela 31: Cheiro a deteriorado (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	1,35±0,93 <sup>Aa</sup>	1,65±0,39 <sup>Aa</sup>	1,32±0,92 <sup>Aa</sup>	ns
3	2,85±0,42 <sup>ABa</sup>	2,95±1,66 <sup>ABa</sup>	2,78±0,74 <sup>ABa</sup>	ns
5	4,52±1,19 <sup>BCa</sup>	4,56±0,85 <sup>BCa</sup>	3,33±0,33 <sup>BCa</sup>	ns
7	5,14±1,82 <sup>BCa</sup>	5,61±1,02 <sup>BCa</sup>	3,60±1,02 <sup>BCa</sup>	ns
10	6,68±0,85 <sup>Ca</sup>	6,45±0,23 <sup>Ca</sup>	4,80±0,50 <sup>Cb</sup>	**
<b>Sig.</b>	**	***	**	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.2.2 Salicórnia

O gráfico da Figura 33 demonstra a evolução do cheiro a deteriorado sentido ao longo do tempo de estudo. A amostra com salicórnia 1% adicionada apresenta valores de cheiro a deteriorado menores quando comparados com as outras amostras. Esta diferença torna-se perceptível principalmente a partir do dia 5 até ao final do estudo.

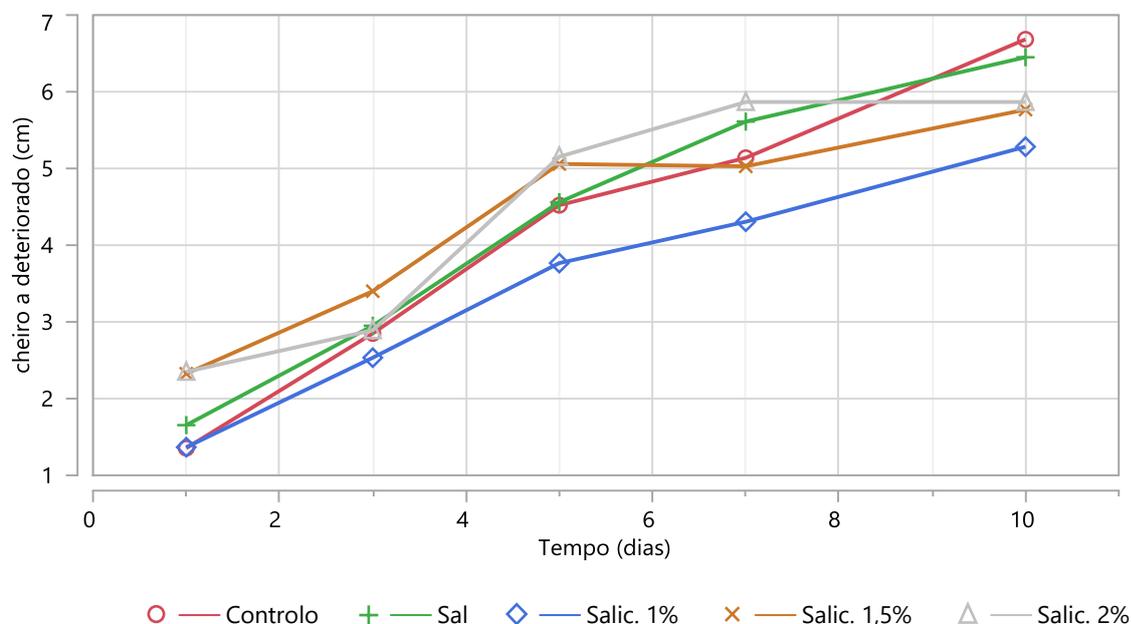


Figura 33: Gráfico da evolução do cheiro a deteriorado nas amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%

Na Tabela 32 denota-se que existem diferenças significativas para o efeito tempo (amostras controlo, com sal e salic. 1%), como seria esperado devido à ação de bactérias deteriorativas que causam proteólise e libertação de produtos do metabolismo que causam *off-odors* (NYCHAS, 2008). Também ocorreram alterações significativas entre condições no último tempo em análise ( $p < 0,05$ ), no qual a amostra com salic.1% diferiu das demais.

Tabela 32: Cheiro a deteriorado (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	1,35±0,93 <sup>Aa</sup>	1,65±0,39 <sup>Aa</sup>	1,37±1,37 <sup>Aa</sup>	2,33±0,71 <sup>Aa</sup>	2,35±0,72 <sup>Aa</sup>	ns
3	2,85±0,42 <sup>ABa</sup>	2,95±1,66 <sup>ABa</sup>	2,53±1,28 <sup>ABa</sup>	3,40±1,97 <sup>Aa</sup>	2,89±0,95 <sup>Aa</sup>	ns
5	4,52±1,19 <sup>BCa</sup>	4,56±0,85 <sup>BCa</sup>	3,77±0,93 <sup>ABa</sup>	5,06±3,02 <sup>Aa</sup>	5,15±1,96 <sup>Aa</sup>	ns
7	5,14±1,82 <sup>BCa</sup>	5,61±1,02 <sup>Ca</sup>	4,31±1,37 <sup>ABa</sup>	5,03±1,58 <sup>Aa</sup>	5,87±1,90 <sup>Aa</sup>	ns
10	6,68±0,85 <sup>Ca</sup>	6,45±0,23 <sup>Ca</sup>	5,28±0,35 <sup>Bb</sup>	5,77±0,20 <sup>Ab</sup>	5,87±0,53 <sup>Ab</sup>	*
<b>Sig.</b>	**	***	*	ns	ns	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.3 Avaliação global de frescura

Os resultados obtidos na apreciação global de frescura estão representados na Figura 34 e Tabela 35 correspondentes à análise do efeito da acerola e na Figura 35 e Tabela 36 encontram-se os resultados correspondentes ao efeito da salicórnia.

A avaliação global de frescura (AGF) está avaliada numa escala de 0 a 9 cm, sendo classificada como: carne fresca de 6 a 9 cm, carne semi-fresca de 3 a 6 cm e carne deteriorada de 0 a 3 cm.

A qualidade da carne, de acordo com a análise sensorial, foi determinada pelas linhas coloridas presentes na Figura 34 e Figura 35. A linha verde separa a carne fresca da semi-fresca e a linha vermelha separa carne semi-fresca de carne considerada deteriorada.

### 4.3.3.1 Acerola

No tempo inicial as amostras apresentavam-se frescas, com um valor médio de AGF de 7,95 cm.

Ao longo do período de armazenamento das amostras observa-se um decréscimo contínuo da AGF.

Observando o gráfico da Figura 34 é possível realizar que a amostra com acerola obteve melhores resultados de AGF durante todos os períodos em análise, como descrito por (REALINI *et al.*, 2015) que concluiu que a utilização de acerola a 0,15% melhorava as qualidades sensoriais de hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P. As condições de controlo e com sal apresentam resultados muito similares, tanto no início como no fim do período de observação.

No tempo final as amostras apresentam um valor média de AGF correspondente a 0,59 determinando assim carne deteriorada.

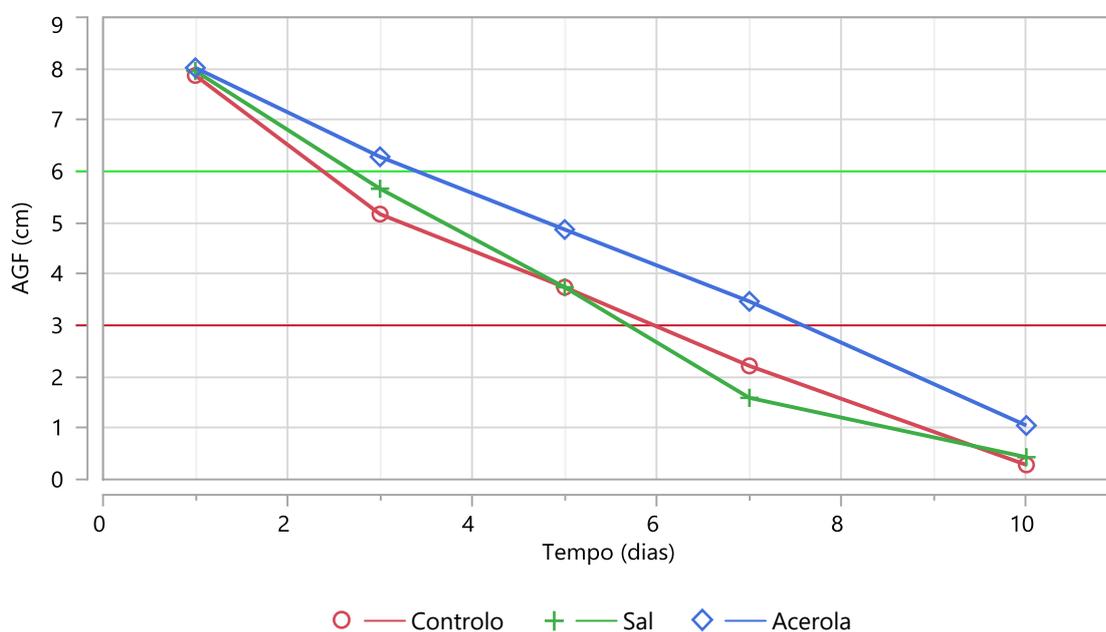


Figura 34: Gráfico da evolução da avaliação global de frescura das amostras controlo, sal e acerola.

Desta forma, de acordo com o gráfico da Figura 37 e a Tabela 38 é possível observar que as condições controlo e com sal são consideradas deterioradas antes de atingir o dia 6, enquanto que a condição com acerola apenas atinge o mesmo grau de deterioração depois do

dia 7, sendo por isso razoável crer que a adição de acerola aumentou o tempo de vida útil do hambúrguer em pelo menos 1 dia.

Observando a Tabela 33 é possível verificar que apenas se encontram diferenças significativas ao nível da evolução da AGF de acordo com o tempo decorrido ( $p < 0,001$ ) como era esperado devido à deterioração inevitável que ocorre em carne fresca.

Tabela 33: Avaliação global de frescura (cm, média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Acerola	Sig.
1	7,87±0,73 <sup>Aa</sup>	7,95±0,68 <sup>Aa</sup>	8,02±0,63 <sup>Aa</sup>	ns
3	5,17±0,85 <sup>ABa</sup>	5,66±1,66 <sup>ABa</sup>	6,28±0,26 <sup>Ba</sup>	ns
5	3,74±0,63 <sup>ABCa</sup>	3,74±0,58 <sup>BCa</sup>	4,87±0,49 <sup>BCa</sup>	ns
7	2,21±1,90 <sup>BCa</sup>	1,59±1,30 <sup>BCa</sup>	3,47±0,84 <sup>Ca</sup>	ns
10	0,28±0,20 <sup>Ca</sup>	0,43±0,49 <sup>Ca</sup>	1,05±0,05 <sup>Da</sup>	ns
Sig.	**	***	***	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3.2 Salicórnia

No tempo inicial as amostras apresentavam-se frescas, com um valor médio de AGF de 6,85 cm.

No gráfico da Figura 35 observa-se longo do período de armazenamento das amostras observa-se um decréscimo contínuo da AGF. É possível realizar que as condições de controlo e com sal apresentam valores superiores de AGF sendo muito similares, até ao dia 5. Por outro lado, a partir do dia 7 a amostra com salic. 1% obteve resultados superiores em termos de AGF quando comparada com as outras amostras. As amostras com salic. 1,5% e 2% apresentaram valores piores de AGF ao longo de todo o período em análise, igualando-se à amostra com sal no tempo 7.

No tempo final as amostras apresentam um valor média de AGF correspondente a 0,48 determinando assim carne deteriorada.

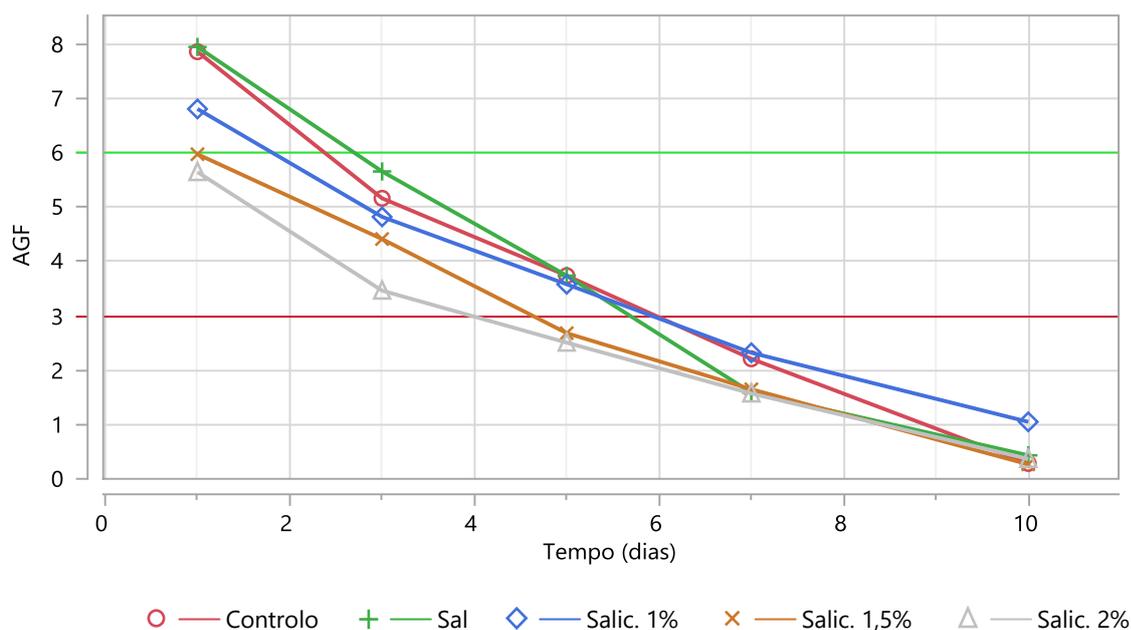


Figura 35: Gráfico da evolução da avaliação global de frescura das amostras controlo, sal, salic. 1%, salic. 1,5% e salic. 2%.

Desta forma, de acordo com o gráfico da Figura 35 e a Tabela 34 é possível observar que as condições controlo, com sal e com salic. 1% são consideradas deterioradas ao nível do dia 6, enquanto que as condições com salic. a 1,5% e 2% atingem o mesmo grau de deterioração mais cedo, antes do dia 5.

Observando a Tabela 34 é possível verificar que se encontram diferenças significativas ao nível da evolução da AGF de acordo com o tempo decorrido, devido à progressão da deterioração. Também é possível observar diferenças significativas entre as diferentes condições no tempo 1 ( $p < 0,01$ ). As amostras com salic. 1,5% e com salic. 2% demonstram ser significativamente diferentes das amostras controlo e com sal, este facto vai de encontro à conclusão que a salicórnia nestas concentrações provoca uma alteração apreciável na AGF muito provavelmente devido à alteração de cor que a sua adição proporciona.

Tabela 34: Avaliação global de frescura (média e desvio padrão) em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P ao longo do período de armazenamento, de acordo com a condição e o tempo.

Tempo (dias)	Controlo	Sal	Salic. 1%	Salic. 1,5%	Salic. 2%	Sig.
1	7,87±0,73 <sup>Aa</sup>	7,95±0,68 <sup>Aa</sup>	6,81±0,47 <sup>Ab</sup>	5,98±0,71 <sup>Ab</sup>	5,65±0,68 <sup>Ab</sup>	**
3	5,17±0,85 <sup>ABa</sup>	5,66±1,66 <sup>ABa</sup>	4,83±2,11 <sup>ABa</sup>	4,42±1,19 <sup>ABa</sup>	3,47±1,23 <sup>ABa</sup>	ns
5	3,74±0,63 <sup>ABCa</sup>	3,74±0,58 <sup>BCa</sup>	3,58±0,59 <sup>ABa</sup>	2,68±1,03 <sup>ABa</sup>	2,51±1,07 <sup>ABa</sup>	ns
7	2,21±1,90 <sup>BCa</sup>	1,59±1,30 <sup>BCa</sup>	2,32±1,30 <sup>ABa</sup>	1,65±0,36 <sup>ABa</sup>	1,57±0,13 <sup>ABa</sup>	ns
10	0,28±0,20 <sup>Ca</sup>	0,43±0,49 <sup>Ca</sup>	1,05±0,58 <sup>Ba</sup>	0,27±0,12 <sup>Ba</sup>	0,37±0,38 <sup>Ba</sup>	ns
Sig.	**	***	*	*	*	

ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* – significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* – muito significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Médias na mesma linha que apresentam letras minúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias na mesma coluna que apresentam letras maiúsculas diferentes distinguem-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Correlação de Pearson

A Tabela 35 demonstra o coeficiente da correlação de Pearson entre os diversos parâmetros descritos, de forma a avaliar a possível correlação entre as várias variáveis analisadas.

Como evidenciado na Tabela 41 os parâmetros microbiológicos estão correlacionados negativamente com o parâmetros sensoriais, desde o cheiro a deteriorado, a cor visual, a AGF e também o parâmetro  $a^*$  (componente vermelha da carne), por isso o aumento dos parâmetros microbiológicos leva à diminuição da componente vermelha da carne e também à diminuição dos parâmetros sensoriais como seria esperado, devido à produção de compostos do metabolismo dos microrganismos que levam a descoloração e odores desagradáveis como descrito por (BLACKBURN 2006)

É possível apreciar também uma correlação negativa entre a  $a_w$  e os microrganismos analisados, que vai ao encontro de (SCHMIDT et al, 2007) que descreve a relação entre o crescimento microbiano e a  $a_w$  e refere que a fase *lag* do crescimento microbiano é tão maior quanto menor for a  $a_w$ . Embora nunca seja possível diminuir a  $a_w$  ao ponto de inibição da multiplicação microbiana em carne porque causaria alterações extremas de textura e suculência.

Como esperado existe uma correlação negativa entre a coordenada de cor  $a^*$  e o escurecimento da cor vermelha, sendo que quanto maior o escurecimento da cor vermelha menor o valor do parâmetro  $a^*$ .

O facto de a cor da carne ser o fator-chave como indicador de frescura e de qualidade como indicado por (MANCINI e HUNT, 2005) pode ser evidenciado pela correlação positiva que existe entre o parâmetro  $a^*$  (componente vermelha da carne) e a AGF realizada pelo painel de provadores. Esta correlação sugere que o aumento da componente vermelha leva a um aumento da AGF por parte dos provadores e que por outro lado a diminuição desta componente (descoloração) é um fator importante para a decisão sobre a frescura e qualidade da carne. (LIMBO *et al*, 2010).

O cheiro a deteriorado tem uma correlação negativa com a AGF evidenciando a importância do cheiro na avaliação da qualidade da carne, já que quanto maior o cheiro a deteriorado menor irá ser a AGF. Também o escurecimento da cor vermelha e a intensidade da cor castanha demonstram correlação negativa em relação à AGF, sendo que quanto mais escura e mais acastanhada a carne se encontra menor será a AGF pois não vai ao encontro das expectativas de cor da carne fresca como descrito por MANCINI e HUNT (2005).



## **CAPÍTULO V – Conclusão**



## 5. Conclusão

Os objetivos do estudo foram plenamente atingidos. Pretendia-se avaliar o efeito que *Malpighia emarginata* e *Salicornia ramosissima* em pó causam em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P e a sua potencial utilização como aditivos naturais.

No que respeita à utilização de *Malpighia emarginata*, este ingrediente mostrou resultados satisfatórios principalmente ao nível da diminuição do cheiro a deteriorado onde mostrou diferenças significativas em relação ao controlo no último tempo em análise ( $p < 0,01$ ), demonstrou melhoria na manutenção da cor vermelha típica da carne e, como a cor é o fator mais importante para a determinação do grau de frescura também obteve resultados positivos na apreciação global de frescura, podendo considerar-se que aumentou a estabilidade da cor e a qualidade dos hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P. Pode, por isso ser considerada uma fonte antioxidante natural passível de ser utilizada em produtos cárneos.

Relativamente ao uso de *Salicornia ramosissima*, a sua utilização demonstrou a diminuição da  $a_w$  em relação à amostra controlo. A amostra com 1% de salicórnia demonstrou menor cheiro a deteriorado no último tempo em análise quando comparado com o controlo ( $p < 0,05$ ). Os hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P com este ingrediente adicionado a uma concentração de 1,5 ou 2% adquirem uma coloração mais escura devido aos pigmentos da própria planta, diminuindo assim a coloração vermelha da carne e conseqüentemente a apreciação global de frescura causando um impacto negativo acrescido no parâmetro  $a^*$  ( $p < 0,001$ ) e na avaliação por parte do painel de avaliadores que considerou as amostras com salicórnia com uma cor mais escura quando comparada com o controlo ( $p < 0,001$ ). Considera-se que a utilização de *Salicornia ramosissima* a concentrações superiores a 1% não é adequada para preparados de carne, mais concretamente em hambúrgueres de bovino Mertolengo D.O.P por alterar em demasia as características intrínsecas do aspeto da carne de bovino.

A adição destes ingredientes podem retardar a deterioração e por isso aumentar a qualidade do produto final, por outro lado a perspetiva da utilização da Salicórnia em outros produtos de carne como em certos transformados de carne, onde a cor pode ser um fator menos preponderante é aliciante, embora seja essencial investigação futura acerca do assunto.



## **CAPÍTULO VI - Referências Bibliográfica**



## 6. Bibliografia

- ABURTO, N.J., ZIOLKOVSKA, A., HOOPER, L., ELLIOTT, P., CAPPUCCIO, F.P., MEERPOHL, J.J. (2013) *Effect of lower sodium intake on health: systematic review and meta-analyses*. BMJ – 5 de Abril 2013.
- ALBARRACÍN, W., SÁNCHEZ, I.C., GRAU, R., BARAT, J.M. (2011) *Salt in food processing: usage and reduction: a review*. International Journal of Food Science and Technology 46: 1329–1336.
- ASSOCIAÇÃO DE CRIADORES DE BOVINOS MERTOLENGOS (2008) Catálogo de Touros – Avaliação Genética.
- AHN, D.U., NAM, K.C. (2004) *Effects of ascorbic acid and antioxidants on color, lipid oxidation and volatiles of irradiated ground beef*. Radiation Physics and Chemistry 71: 149–154.
- AYRES, J. C. (1960) *Temperature relationships and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef*. Food Res. 25, 1-18.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G., J. FONTANA A., J. SCHMIDT, S., P. LABUZA, T. (2007). *Water Activity in Foods. Fundamentals and Applications*. IFT Press: 419-420.
- BEAUFORT, A., CARDINAL, M., LE-BAIL, A., MIDELET-BOURDIN, G. (2009). *The effects of superchilled storage at -2 degrees C on the microbiological and organoleptic properties of cold-smoked salmon before retail display*. International Journal of Refrigeration 32: 1850–1857.
- BLACKBURN, C., (2006) *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing Limited.
- BETTS, G., & FOOD, C. (2006). *Other spoilage bacteria. Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.5.668>
- BRAUN, P., SUTHERLAND, J.P. (2004). *Predictive modelling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity by a cocktail of Brochothrix thermosphacta*. International Journal of Food Microbiology, 95, 169–175
- BREWER, M. S., ZHU, L. G., BIDNER, B., MEISINGER, D. J., McKEITH, F. K. (2001). *Measuring pork color: Effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters*. Meat Science, 57(2), 169–176.
- BUCHANAN, R. L., PALUMBO, S. A. (1985) *Aeromonas hydrophila and Aeromonas sobria as potential food poisoning species: a review*. J. Food Safety. 7, 15-29.

- BUCK, D.F., 1991. *Antioxidants. Food additive user's handbook*. Blackie and son Ltd, London, 1-46
- CASABURI, A., PIOMBINO, P., NYCHAS, G., VILLANI, F., ERCOLINI, D. (2015) *Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage*. Food Microbiology 45: 83-102.
- CASTELLANO, P.H., HOLZAPFEL, W.H., VIGNOLO, G.M. (2004). *The control of Listeria innocua and Lactobacillus sakei in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain Lactobacillus casei CRL705*. Food Microbiol 21(3): 291-298.
- CARPENTER, C. E., CORNFORTH, D. P., WHITTIER, D. (2001). *Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction*. Meat Science, 57(4), 359–363.
- CDC (2016) *Listeria (Listeriosis)* – visitado a 13/01/19 às 18h00m:  
<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>
- CDC (2018) *Clostridium perfringens* – visitado a 13/01/19 às 18h00m:  
<https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/clostridium-perfringens.html>.
- CHIRIFE, J., BUERA, M.P., LABUZA, T.P. (1996) *Water activity, water glass dynamics, and the control of microbiological growth in foods*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 36(5): 465-513.
- COX, N.A., CASON, J.A., RICHARDSON, L.J. (2011) *Minimization of Salmonella Contamination on Raw Poultry*. Annu. Rev. Food Sci. Technol 2:75-95.
- DAINTY, R. H., SHAW, B. G., de BOER, K. A. and SCHEPS, E. S. J. (1975) *Protein changes caused by bacterial growth on beef*. J. Appl. Bacteriol. 39, 72-81
- DAVY, A.J., BISHOP, G.F., COSTA, C.S.B. (2001) *Salicornia L.* Journal of Ecology 89: 681–707.
- DESMOND, E. (2006) *Reducing salt: A challenge for the meat industry*. Meat Science 74: 188–196
- DGADR (2012) *Carne Mertolenga DOP: Caderno de Especificações*. pp. 1-6.
- ESKIN, N. A. M. (1990) *Biochemist of Foods*. 2nd Edition. San Diego, Academic Press Inc.
- DOULGERAKI, A.I., PARAMITHIOTIS, S., KAGKLI, D.M., NYCHAS, G.J.E. (2010) *Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions*. Food Microbiol. 27, 1028-1034.
- EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY (2018) *Environmental indicator report. In support to the monitoring of the Seventh Environment Action Programme*. EEA Reportort 19. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

- EVANS, R.J., 1991. *Alternatives to synthetic antioxidants*. Food Ingredients Europe. Conference Proceedings, Paris, 281-284
- FAPOJUWO, O. (1981) *The composition and stability of lipids in meat products and a spectrofluorometric assay for malonaldehyde in biological tissues*. Retrospective Theses and Dissertations. State of Iowa University.
- GARNETT, T. (2010) *Intensive versus extensive livestock systems and greenhouse gas emissions*. Food Climate Change Research Network Briefing Paper.
- GERHARDT, U (1980) *Aditivos e ingredientes*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- GILL, C. O., NEWTON, K. G. (1978) The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Sci.* 2, 207-217.
- GILL, C. O., NEWTON, K. G. (1980) *Growth of bacteria on meat at room temperatures*. J. Appl. Bacteriol. 49, 315-323.
- GILL, C. O. (1983) *Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat*. *Journal of Food Protection* 46(5): 444-452.
- GILL, C. O. (1986) *The control of microbial spoilage in fresh meats*. In *Advances in meat research*. Volume 2. Meat and poultry microbiology. (Ed. Pearson, A.M., Dutson, T.) pp. 49-88. Westport, Connecticut, Avi Publishing Co. Inc.
- GOUTEFONGEA, R. (1991) La salazon. *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. Ed. Acribia, Zaragoza, 125-149
- GRAM, L., RAYN, L., RASCH, M., BRUHN, J.B., CHRISTENSEN, A.B., GIVSKOV, M. (2002) *Food spoilage interactions between food spoilage bacteria*. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 79-97.
- HANSEN, E., JUNCHER, D., HENCKEL, P., KARLSSON, A., BERTELSEN, G., SKIBSTED, L. H. (2004). *Oxidative stability of chilled pork chops following long term freeze storage*. *Meat Science* 68: 479–484.
- HE, F.J., MACGREGOR, G.A. (2010). *Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation*. *Progress in Cardiovascular Diseases* 52: 363–382.
- HOLLEY, R.A. (2000). *Brochothrix*. In *Encyclopaedia of Food Microbiology*, Volume 1. Academic Press, London, pp. 314–318.
- HORNSTEIN, I., CROWE, P.F., HINER, R., (1967) *Composition of lipids in some beef muscles*. *Ibid.* 32:650-655.
- JAY, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology* (6th ed.). Gaithersburg, Maryland: ASPEN.

- JOO, S.Y., CHOI, H.Y. (2014) *Antioxidant Activity and Quality Characteristics of Pork Patties Added with Saltwort (Salicornia herbacea L.) Powder*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 43(8): 1189-1196.
- KIM, H.W., HWANG, K.E., SONG, D.H., KIM, Y.J., LIM, Y.B, HAM, Y.K., YEO, E.J., CHANG, S.J., CHOI, Y.S., KIM, C.J. (2014) *Effect of glasswort (Salicornia herbacea L.) on the texture of frankfurters*. Meat Science 97: 513–517.
- KONO, T., COLOWICK, S.P. (1961) *Isolation of skeletal muscle cell membrane and some of its properties*. Arch. Biochem. Biophys. 93:520-533.
- KOOS, J. T. (1991) Sodium lactate: A natural way to improve quality and safety of meat and poultry products. Food Ingredients Europe. Conference Proceedings, Paris: 315-320
- KUCHMAK, M., DUGAN, L.R. (1965) *Composition and positional distribution of fatty acids in phospholipids isolated from pork muscle tissues*. Journal of the American Oil Chemists' Society 42:45-48.
- LADIKOS, D., LOUGOVOIS, V. (1990). *Lipid Oxidation in Muscle Foods : A Review*. Department of Food Science, University of Leeds 35, 295–314.
- LAWRIE, R. A., LEDWARD, D. A. (2006). *Lawrie's Meat Science*. Seventh English, edition ed. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.
- LEE, S., FAUSTMAN, C., DJORDJEVIC, D., FARAJI, H., DECKER, E.A. (2006). *Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with n-3 fatty acids*. Meat Science 72(1): 18–24.
- LEYGONIE, C., BRITZ, T. J., & HOFFMAN, L. C. (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat : Review. *MESC*, 91(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.013>
- LI, X., LINDAHL, G., ZAMARATSKAIA, G., & LUNDSTRÖM, K. (2012). *Influence of vacuum skin packaging on color stability of beef longissimus lumborum compared with vacuum and high-oxygen modified atmosphere packaging*. *MESC*, 92(4), 604–609. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.006>
- LIMBO, S., TORRI, L., SINELLI, N., FRANZETTI, L., & CASIRAGHI, E. (2010). *Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures*. Meat Science, 84(1), 129-136.
- LIEM, D.G., MIREMADI, F., KEAST, S.J. (2011) Reducing sodium in foods: the effect on flavor. *Nutrients* 3: 694-711.

- MANCINI, R.A., HUNT, M.C. (2005) *Current research in meat color*. Meat Science 71: 100-121.
- MEZADRI, T., VILLAÑO, D., FERNANDEZ-PACHON, M.S., GARCIA-PARRILLA, M.C., TRONCOSO, A.M. (2008) *Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (Malpighia emarginata DC.) fruits and derivatives*. Journal of Food Composition and Analysis 21: 282– 290.
- NAGAMINE, I., SAKURAI, H., NGUYEN, H.T.T., MIYAHARA, M., PARKANYIOVA, J., REBLOVA, Z., POKORNY, J. (2004) *Antioxidant Activity of Acerola Extracts*. Czech Journal of Food Science 22 (Special Issue): 155-158.
- NEWTON, K. G., GILL, C. O. (1978) *The development of the anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures*. J. Appl. Bacteriol. 44, 91-95.
- NYCHAS, G.J.E., SKANDAMIS, P.N., TASSOU, C.C., KOUTSOUMANIS, K.P., (2008) *Meat spoilage during distribution*. Meat Sci. 78, 77-89.
- O'KEEFE, P.W., WELLINGTON, G.H., MATTICK, L.R., STOUFFER, J.R. (1968) *Composition of bovine muscle lipids at various carcass locations*. Ibid. 33:188-192.
- O'SULLIVAN, M. G., BYRNE, D. V., MARTENS, M. (2003a). *Evaluation of pork colour: Sensory colour assessment using trained and untrained sensory panelists*. Meat Science, 63(1), 119–129.
- O'SULLIVAN, M. G., BYRNE, D. V., MARTENS, H., GIDSKEHAUG, G. H., ANDERSEN, H. J., & Martens, M. (2003b). *Evaluation of pork colour: Prediction of visual sensory quality of meat from instrumental and computer vision methods of colour analysis*. Meat Science, 65(2), 909–918.
- PALUMBO, S. A. (1985) *Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens?* J. Food Protect. 49, 1003-1009.
- PETSIOS, S., FREDRIKSSON-ABOMAA, M., SAKKAS, H., PAPADOPOULOU, C. (2016) *Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of Yersinia enterocolitica in food*. International Journal of Food Microbiology 237: 5–72.
- REALINI, C.E., GUARDIA, M.D., DIAZ, I., GARCIA-REGUEIRO, J.A., ARNAU, J. (2015) *Effects of acerola fruit extract on sensory and shelf-life of salted beef patties from grinds differing in fatty acid composition*. Meat Science 99: 18-24.
- SANCHEZ-ESCALANTE, A., DJENANE, D., TORRESCANO, G., BELTRÁN, G.A., RONCALES, P. (2003) *Antioxidant Action of Borage, Rosemary, Oregano, and Ascorbic*

- Acid in Beef Patties Packaged in Modified Atmosphere*. Journal of Food Science 68 (1): 339-344.
- RUUSUNEN, M., PUOLLANE, E. (2005) *Reducing sodium intake from meat products*. Meat Science 70: 531–541.
- SCANGA, J. A., GRONA, A. D., BELK, K. E., SOFOS, J. N., & BELLINGER, G. R. (2000). *Microbiological contamination of raw beef trimmings and ground beef*, 56, 1–8.
- SHANGE, N., MAKASI, T.N., GOOUWS, P.A., HOFFMAN, L.C. (2018) *The influence of normal and high ultimate muscle pH on the microbiology and colour stability of previously frozen black wildebeest (Connochaetes gnou) meat*. Meat Science 135: 14-19.
- SHIVAS, S.D., KROPF, D.H., HUNT, M.C., KASTNER, C.L., KENDALL, J.L.A., DAYTON, A.D. (1984) *Effects of Ascorbic Acid on Display Life of Ground Beef*. Journal of Food Protection 47(1): 11-15.
- SINELL, H.J. (1981) *Introduccion a la higiene de los alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza, 30-35.
- SINELLI, N., LIMBO, S., TORRI, L., DI, V., & CASIRAGHI, E. (2010). *Evaluation of freshness decay of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaged at different temperatures using NIR and MIR spectroscopy*. MESC, 86(3), 748–752. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.016>
- SLADE, L., LEVINE, H., REID, D.S. (1991) *Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 30(2-3):115-360.
- STANBOROUGH, T., FEGAN, N., POWELL, S.M., TAMPLIN, M., CHANDRY, P.S. *Insight into the Genome of Brochothrix thermosphacta, a Problematic Meat Spoilage Bacterium*. American Society for Microbiology – Applied and Environmental Microbiology 83 (5).
- STOOPS, J., RUYTERS, S., BUSSCHAERT, P., SPAEPEN, R. (2015) *Bacterial community dynamics during cold storage of minced meat packaged under modified atmosphere and supplemented with different preservatives* - International Journal of Food Microbiology 237: 5–72.
- TEOTIA, J.S. (1974). *Chemical pasteurization of poultry meat*. Dissertation Abstracts International, B, 34: 4142.
- VOYSEY, P.A. 1999. *Guidelines for the measurement of water activity and ERH in foods*. Gloucestershire: Campden & Chorleywood Food Research Association Group.

Campden & Chorleywood Food Research Association Group.

WATTS, B.M., (1961) *Campbell Flavor Chemistry Symposium*, Campbell Soup Co., Camden, N.J. 83-96.

WATTS, B.M., (1962) *Lipids and Their Oxidations*, Edited by H.W. Schultz, E.A. Day and R.C. Sinnhuber, Avi. Publishing Co., Westport. 202-214.

WEGLARZ, A. (2010) *Meat quality defined based on pH and colour depending on cattle category and slaughter season*. Czech J. Anim. Sci. 55(12): 548–556.

WOODS, S. J., LOPES, M., CAVALEIRO, C., & RAMOS, F. (2017). *Sodium Reduction in Bread: A Role for Glasswort*, 00, 1–16. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12277>

YOUNG, L. L., REVIERI, R. D., COLE, A. B. (1988) *Fresh red meats: a place to apply modified atmospheres*. Food Technol. 42: 65-69.

ZHOU, G. H., XU, X. L., LIU, Y. (2010). *Preservation technologies for fresh meat – A review*, 86, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.033>



## **CAPÍTULO VII – Anexos**



## ANEXOS

## A. Composição da carne conforme a espécie

	Água (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cinzas (%)
<b>Bovino</b>	71-73	20-22	5-8	0-7
<b>Suíno</b>	71	22	6	0-8
<b>Cordeiro</b>	74	20	5	0-6
<b>Frango</b>	76	21	3	1

Adaptado de *The Canadian Nutrient File, Health and Welfare Canada* (1991).

## B. Ficha de análise sensorial

Análise sensorial de Hambúrguer Nome \_\_\_\_\_ Código \_\_\_\_\_ Assinale com um X

## COR

Vermelho (vivo- escuro)

--	--

Castanho (claro- escuro)

--	--

## CHEIRO a carne deteriorada (Intensidade)

--	--

Pouco intenso

Muito intenso

## Quais os CHEIRO(S) que detectou (Intensidade):

Adocicado

--	--

Amanteigado

--	--

Ranço

--	--

Acídico

--	--

Amoniacal

--	--

Pútrido

--	--

## APRECIÇÃO GLOBAL de frescura

--	--

Muito fresca

Muito deteriorada

