

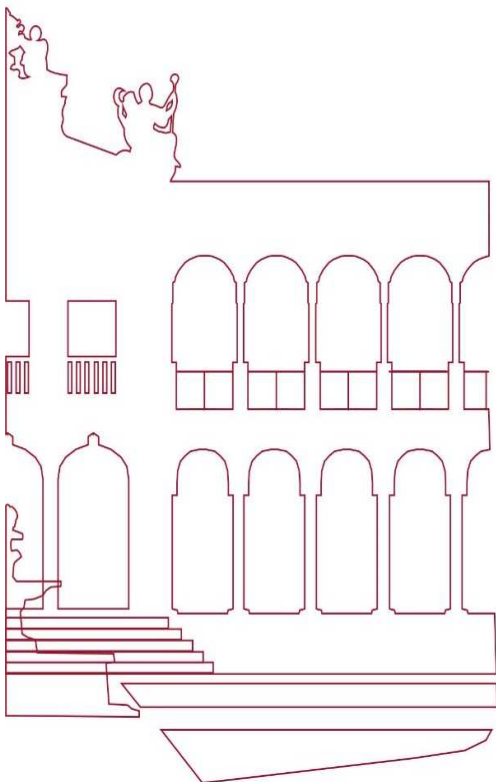
APLICAÇÃO DE CULTURAS MICROBIANAS AUTÓCTONES NA PRODUÇÃO DE ENCHIDOS TRADICIONAIS DO ALENTEJO E DA BEIRA BAIXA

Igor Alexandre da Silva Dias

Orientadores: Professor Doutor Miguel Nuno Geraldo Viegas dos Santos Elias

Doutora Marta Sofia Serrano Valente Casimiro Ferreira Laranjo

Tese apresentada à Universidade de Évora para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias e Ambientais



Évora, 2018

INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO E FORMAÇÃO

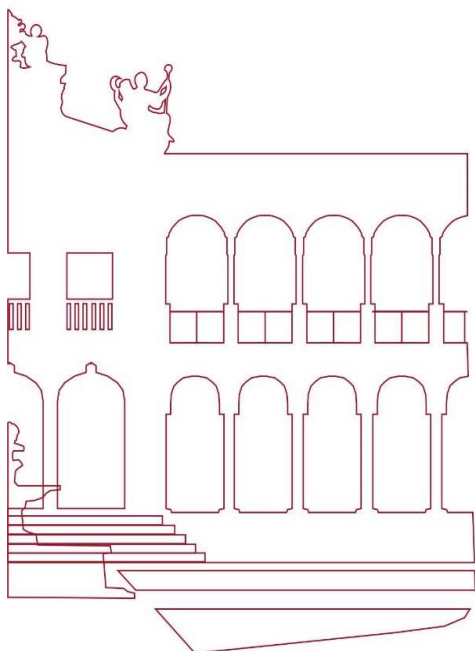
APLICAÇÃO DE CULTURAS MICROBIANAS AUTÓCTONES NA PRODUÇÃO DE ENCHIDOS TRADICIONAIS DO ALENTEJO E DA BEIRA BAIXA

Igor Alexandre da Silva Dias

Orientadores: Professor Doutor Miguel Nuno Geraldo Viegas dos Santos Elias

Doutora Marta Sofia Serrano Valente Casimiro Ferreira Laranjo

Tese apresentada à Universidade de Évora para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias e Ambientais



Évora, 2018

INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO E FORMAÇÃO



Este estudo foi financiado pelos seguintes projetos:

- Salsicharia tradicional portuguesa: estratégias para a melhoria da segurança e qualidade. *Portuguese traditional meat products: strategies to improve safety and quality*. Projeto **PTDC/AGR-ALI/119075/2010**. 2012-2014. Coordenação: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Instituições participantes: Universidade de Évora, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Instituto Tecnológico Agrário de Castilla y León, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.



- Melhoria da qualidade de enchidos tradicionais alentejanos pelo recurso a baixos teores de sal, monitorização do tempo de fumagem e utilização de culturas de arranque. Projeto **PRODER, Medida 4.1/ 2009 – “Cooperação para a Inovação” (Ref. Grupo 261F – Projetos 13.017 a 13.021)**. 2010-2014. Coordenação: Paladares Alentejanos - Sociedade de Produção e Comercialização de Produtos Alimentares, Lda. (empresa transformadora de carne de porco da raça Alentejana). Instituições participantes: Universidade de Évora, Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Furterra - Segurança Alimentar, Lda., Herdade dos Bispos e Outeiro - Atividades Florestais, Lda.



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os que direta ou indiretamente participaram na sua realização.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Tecnologia e Pós-Colheita do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) da Universidade de Évora, que disponibilizou as condições necessárias para a realização deste trabalho.

A realização deste trabalho só foi possível devido à boa vontade e dedicação de várias pessoas, às quais pretendo expressar o meu sincero agradecimento e reconhecimento.

Ao Distinto Professor Doutor Miguel Elias, Orientador desta tese, pela paciência, simpatia, simplicidade, constante orientação, disponibilidade para a realização das várias atividades, pelo empenho revelado durante a realização das mesmas, bem como todo o apoio e esclarecimentos prestados.

À Caríssima Doutora Marta Laranjo, Coorientadora desta tese, pela paciência, pelos muitos conselhos, sugestões e esclarecimentos prestados no desenrolar da parte experimental e na redação da tese.

Ao Professor Doutor Gottlieb Basch, diretor do curso de doutoramento em Ciências Agrárias e Ambientais da Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora, pelo acolhimento no curso de doutoramento.

À empresa da Beira Baixa, principalmente ao meu grande amigo e Eng.º Alexandre Ribeiro, pela disponibilidade e oportunidade que me deu para realizar o trabalho nas suas instalações, não esquecendo os Senhores Luís Ribeiro e Fernando Pereirinha e todos os colaboradores da instituição pela simpatia e esclarecimentos prestados ao longo deste período.

À empresa do Alentejo por se disponibilizar para a realização deste trabalho.

À Escola Superior Agrária de Santarém (ESAS) e aos seus digníssimos diretores, Professor José Potes e Professora Maria José Diogo, pelo alento e apoio prestados, nomeadamente na impressão da tese.

Aos Professores Doutores Eduarda Potes, Cristina Queiroga, Ana Cristina Agulheiro-Santos, Ana Elisa Rato, Rosário Félix, António Raimundo, Margarida Oliveira, Maria Gabriela Lima, Helena Mira, Ana Ambrósio Paulo, Ana Neves, Marília Henriques, António Vicente, Paulo Pardal, Vanda Andrade e às Professoras Ana Teresa Ribeiro, Antonieta Santana, Ana Pinto e Cristina Laranjeira pelos constantes esclarecimentos e apoio prestados.

Às técnicas do laboratório de microbiologia da Universidade de Évora, Dr.^a Guilhermina Pias e Esperança Coelho, pela simpatia, alento e precioso apoio prestados. À Eng.^a Antónia Oliveira e ao Rui Bicho do laboratório de Enologia da Universidade de Évora, pelo precioso apoio durante a realização das determinações do pH e da a_w .

Às mestres e amigas Ana Rita Fialho, Joana Véstia e Sara Rodrigues, pela companhia durante as horas de refeição, intervalos e na labuta diária durante a execução de todas as determinações realizadas.

Às Engenheiras Maria da Conceição Faro e Ana Teresa Jorge e à Mestre Isabel Torgal, pela constante ajuda e disponibilidade demonstradas ao longo deste percurso.

A todos os membros do painel de provadores da Universidade de Évora.

Às empresas Induxtra de Suministros e PCA - Produção e Consultoria Alimentar, Lda pela constante disponibilidade e fornecimento de informação relativa a culturas de arranque comerciais.

À Raquel, minha querida esposa, por todo o apoio e por todos os momentos em que não pude estar presente, como queria e deveria.

A todos os meus familiares, particularmente aos meus pais, pelo alento transmitido durante a conceção deste trabalho.

A todos aqueles que não mencionei mas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a elaboração deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos!

Aplicação de culturas microbianas autóctones na produção de enchidos tradicionais do Alentejo e da Beira Baixa

RESUMO

A utilização de culturas de arranque poderá contribuir para a melhoria da qualidade e segurança dos enchidos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes culturas de arranque nas características físico-químicas, microbiológicas, reológicas e sensoriais e nos teores de amins biogénicas de paios de porco preto, do Alentejo, e painhos da Beira Baixa, produzidos em ambiente industrial.

Inocularam-se culturas puras de *Staphylococcus equorum* 5MSA4, *S. equorum* S2M7, *Lactobacillus curvatus* L2B2 e *L. sakei* CV3C2 e culturas mistas de levedura 2RB4, *S. xylosus* CECT7057, *L. sakei* CECT7056, *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, com diferentes composições e concentrações de inoculação que variaram de 10^3 a 10^8 células/g de massa, sendo que para a levedura a concentração inoculada foi sempre de 10^6 células/g de massa.

Os efeitos positivos das inoculações foram mais evidentes sobre as características gerais dos dois tipos de enchidos produzidos quando foram inoculadas culturas mistas, na concentração 10^8 células/g de massa, particularmente ao nível da segurança dos enchidos (redução dos teores totais de amins biogénicas e das contagens e presença de microrganismos patogénicos). As inoculações não tiveram um efeito muito evidente sobre a cor, as características reológicas e a avaliação sensorial dos produtos, todavia, as culturas de arranque testadas não prejudicaram nenhum dos três conjuntos de parâmetros de qualidade referidos, porém, também não lhes conferiram características diferenciadoras.

A cultura mista *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, na concentração 10^8 células/g de massa, contribuiu para a segurança dos dois tipos de enchidos estudados sem depreciar a qualidade sensorial dos mesmos, mostrando aptidão para ser inoculada em fábricas, processos tecnológicos e regiões distintos.

As culturas de arranque autóctones estudadas neste trabalho não apresentaram prejuízos para as características dos produtos, podendo considerar-se que a sua utilização pode contribuir para a segurança dos enchidos, sem comprometer a qualidade sensorial.

Palavras-chave: Enchidos tradicionais portugueses, culturas de arranque, qualidade e segurança alimentar.

Application of autochthonous microbial cultures in the production of the traditional sausages of Alentejo and Beira Baixa

ABSTRACT

The use of starter cultures may contribute to the improvement of sausage quality and safety.

The objective of this work was to evaluate the effects of different starter cultures on the physicochemical, microbiological, rheological and sensory characteristics and biogenic amines content of paio de porco preto, from Alentejo, and painhos from Beira Baixa, produced in industrial environments.

Pure cultures of *Staphylococcus equorum* 5MSA4, *S. equorum* S2M7, *Lactobacillus curvatus* L2B2 and *L. sakei* CV3C2 and mixed cultures of yeast 2RB4, *S. xylosus* CECT7057, *L. sakei* CECT7056, *S. equorum* S2M7 and *L. sakei* CV3C2 were inoculated, with different compositions and inoculation concentrations ranging from 10^3 to 10^8 cells/g of meat batter, wherein for the yeast the inoculated concentration was always 10^6 cells/g of meat batter.

The positive effects of the inoculations were more evident on the general characteristics of the two types of sausages produced when mixed cultures were inoculated, at a concentration of 10^8 cells/g meat batter, particularly for sausage safety (reduction of the total contents of biogenic amines and counts and presence of pathogenic microorganisms). Inoculations did not have a very evident effect on colour, rheological characteristics, and sensory evaluation of the products, however, the starter cultures tested did not affect any of the three sets of quality parameters mentioned, but also did not confer distinctive characteristics.

The mixed culture *S. equorum* S2M7 and *L. sakei* CV3C2, at a concentration of 10^8 cells/g of meat batter, contributed to the safety of the two types of sausages studied without depreciating the sensory quality of the sausages, showing the aptitude to be inoculated in different manufactured units, technological processes and regions.

The studied autochthonous starter cultures did not depreciate the characteristics of the products, and thus their use may contribute to sausage safety without compromising sensory quality.

Keywords: Fermented meat sausages, starter cultures, quality and food safety.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XX
ABREVIATURAS	XXI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Enchidos	3
2.1.1. Definição	3
2.1.2. Breve perspetiva histórica.....	4
2.1.3. Produção de enchidos em Portugal	5
2.1.4. Etapas gerais do processo de fabrico.....	5
2.2. Evolução dos perfis físico, bioquímico e microbiológico durante a produção de enchidos	7
2.2.1. Perfil físico.....	8
2.2.2. Perfil bioquímico	9
2.2.2.1. Glicólise em enchidos.....	10
2.2.2.2. Proteólise	11
2.2.2.2.1. Proteólise em enchidos	12
2.2.2.2.2. Transformação dos aminoácidos.....	13
2.2.2.3. Lipólise	14
2.2.2.3.1. Lipólise em enchidos.....	15
2.2.2.3.2. Oxidação lipídica em enchidos	16
2.2.2.4. Formação do <i>flavour</i> em enchidos.....	16
2.2.3. Perfil microbiológico	17
2.3. Culturas de arranque	20
2.3.1. Principais culturas de arranque inoculadas em enchidos.....	23
2.3.2. Contributo das culturas de arranque para a melhoria da qualidade e segurança dos enchidos	24
2.3.2.1. Bactérias lácticas.....	28
2.3.2.2. <i>Staphylococcaceae</i> e <i>Micrococcaceae</i>	33

2.3.2.3. Leveduras	35
2.3.2.4. Bolores	36
2.4. Aminas biogénicas.....	38
2.4.1. Classificação das aminas biogénicas	38
2.4.2. Formação das aminas biogénicas.....	39
2.4.3. Fatores que influenciam a formação de aminas biogénicas	39
2.4.4. Microrganismos produtores de aminas biogénicas em géneros alimentícios.....	43
2.4.5. Aminas biogénicas nos géneros alimentícios e as suas implicações para a saúde humana	44
2.4.6. Limites para a presença de aminas biogénicas em géneros alimentícios e principais métodos utilizados na determinação de aminas biogénicas em enchidos.....	45
2.4.7. Teores de aminas biogénicas em enchidos.....	48
2.4.8. Efeito das culturas de arranque na produção de aminas biogénicas em enchidos..	52
2.5. Análise sensorial	56
2.5.1. Métodos sensoriais	56
2.5.2. Atributos visuais.....	57
2.5.3. Atributos do aroma, sabor e <i>flavour</i>	57
2.5.4. Atributos da textura	58
2.6. Métodos utilizados para a determinação da textura.....	59
2.7. Medição objetiva da cor	61
3. OBJETIVOS.....	63
4. MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1. Matérias-primas e ingredientes	64
4.2. Processos de fabrico.....	64
4.3. Características gerais dos enchidos	66
4.4. Ensaio de inoculação.....	66
4.4.1. Culturas de arranque.....	66
4.4.2. Inoculações das massas com culturas puras.....	69
4.4.3. Inoculações das massas com culturas mistas	71
4.4.4. Planos de amostragem.....	73
4.5. Métodos analíticos.....	76
4.5.1. Parâmetros físicos (temperatura, humidade relativa e perdas de peso)	76
4.5.2. Parâmetros físico-químicos.....	77
4.5.3. Parâmetros microbiológicos	77
4.5.4. Determinação de aminas biogénicas	80
4.5.5. Determinação objetiva da cor.....	81

4.5.6. Parâmetros reológicos - Análise do perfil de textura.....	82
4.5.7. Análise sensorial.....	82
4.6. Análise estatística	83
5. APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	85
5.1. Ensaio de inoculação em paios de porco preto, do Alentejo, com culturas puras de <i>Staphylococcus</i>	85
5.1.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)	85
5.1.2. Parâmetros microbiológicos	90
5.1.3. Determinação de aminas biogénicas	99
5.1.4. Parâmetros da cor	108
5.1.5. Parâmetros reológicos	111
5.1.6. Análise sensorial.....	114
5.1.7. Principais conclusões do ensaio	119
5.2. Ensaio de inoculação em paios de porco preto, do Alentejo, com culturas puras de <i>Lactobacillus</i>	120
5.2.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)	120
5.2.2. Parâmetros microbiológicos	124
5.2.3. Determinação de aminas biogénicas	134
5.2.4. Parâmetros da cor	141
5.2.5. Parâmetros reológicos	143
5.2.6. Análise sensorial.....	146
5.2.7. Principais conclusões do ensaio	150
5.3. Ensaio de inoculação em paios de porco preto, do Alentejo, com culturas mistas ..	152
5.3.1. Inoculação com culturas mistas na concentração 10^6 células por grama de massa	152
5.3.1.1 Parâmetros físico-químicos (pH e a_w).....	152
5.3.1.2. Parâmetros microbiológicos	156
5.3.1.3. Determinação de aminas biogénicas	164
5.3.1.4. Parâmetros da cor	170
5.3.1.5. Parâmetros reológicos	172
5.3.1.6. Análise sensorial.....	175
5.3.1.7. Principais conclusões do ensaio	177
5.3.2. Inoculação com culturas mistas na concentração 10^8 células por grama de massa.....	179
5.3.2.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w).....	179
5.3.2.2. Parâmetros microbiológicos	183
5.3.2.3. Determinação de aminas biogénicas	189

5.3.2.4. Parâmetros da cor	196
5.3.2.5. Parâmetros reológicos	198
5.3.2.6. Análise sensorial.....	201
5.3.2.7. Principais conclusões do ensaio	204
5.4. Ensaio de inoculação em painhos da Beira Baixa com culturas puras de <i>Staphylococcus</i>	206
5.4.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)	206
5.4.2. Parâmetros microbiológicos	210
5.4.3. Determinação de aminas biogénicas	217
5.4.4. Parâmetros da cor	225
5.4.5. Parâmetros reológicos	227
5.4.6. Análise sensorial.....	230
5.4.7. Principais conclusões do ensaio	233
5.5. Ensaio de inoculação em painhos da Beira Baixa com culturas puras de <i>Lactobacillus</i>	234
5.5.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)	234
5.5.2. Parâmetros microbiológicos	237
5.5.3. Determinação aminas biogénicas	243
5.5.4. Parâmetros da cor	248
5.5.5. Parâmetros reológicos	250
5.5.6. Análise sensorial.....	252
5.5.7. Principais conclusões do ensaio	255
5.6. Ensaio de inoculação em painhos da Beira Baixa com culturas mistas	257
5.6.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)	257
5.6.2. Parâmetros microbiológicos	261
5.6.3. Determinação de aminas biogénicas	268
5.6.4. Parâmetros da cor	274
5.6.5. Parâmetros reológicos	277
5.6.6. Análise sensorial.....	279
5.6.7. Principais conclusões do ensaio	283
6. CONCLUSÕES GERAIS	284
7. PERSPETIVAS PARA ESTUDOS FUTUROS.....	287
8. BIBLIOGRAFIA.....	288
ANEXO 1.....	a

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies mais frequentemente utilizadas como culturas de arranque para a produção de enchidos cárneos fermentados.....	24
Tabela 2 - Contributos das bactérias lácticas, ECN, <i>Micrococcaceae</i> , bolores e leveduras usados como culturas de arranque para a manutenção e melhoria da qualidade dos enchidos.	25
Tabela 3 - Composição de algumas culturas de arranque comerciais usadas em produtos cárneos fermentados.....	26
Tabela 4 - Estudos de inoculação em diferentes produtos, incluindo tipo e concentração das culturas de arranque.....	27
Tabela 5 - Contribuição das bactérias lácticas usadas como culturas de arranque para a manutenção e melhoria da qualidade e segurança dos enchidos.....	32
Tabela 6 - Efeitos fisiológicos e toxicológicos das aminas biogénicas.....	45
Tabela 7 - Teores de aminas biogénicas em enchidos (produto acabado).....	49
Tabela 8 - Efeito das culturas de arranque na redução dos teores (%) de aminas biogénicas em enchidos.....	54
Tabela 9 - Ingredientes dos paios de porco preto, do Alentejo.....	64
Tabela 10 - Ingredientes dos painhos da Beira Baixa.....	64
Tabela 11 - Etapas do processo produtivo dos paios de porco preto, do Alentejo, e respetiva descrição.....	64
Tabela 12 - Etapas do processo produtivo dos painhos da Beira Baixa e respetiva descrição...	65
Tabela 13 - Características gerais dos paios de porco preto, do Alentejo, e dos painhos da Beira Baixa.....	66
Tabela 14 - Identificação e origem das estirpes inoculadas.....	67
Tabela 15 - Parâmetros microbiológicos determinados em cada amostra.....	78
Tabela 16 - Aminas biogénicas determinadas em cada amostra.....	80
Tabela 17 - Condições do ensaio para análise da textura.....	82
Tabela 18 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.	85
Tabela 19 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	85
Tabela 20 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Staphylococcus</i>	86
Tabela 21 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.....	90

Tabela 22 - Análise de variância para os parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	91
Tabela 23 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Staphylococcus</i>	92
Tabela 24 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.	100
Tabela 25 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.	101
Tabela 26 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Staphylococcus</i>	102
Tabela 27 - Percentagem de redução dos teores de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo e os inoculados.....	106
Tabela 28 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.	108
Tabela 29 - Análise de variância para os parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.	108
Tabela 30 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Staphylococcus</i>	109
Tabela 31 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.....	111
Tabela 32 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.....	111
Tabela 33 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Staphylococcus</i>	112
Tabela 34 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.....	114
Tabela 35 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.....	115
Tabela 36 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Staphylococcus</i>	116
Tabela 37 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.	120
Tabela 38 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	120

Tabela 39 - Valores médios e desvios padrão para os resultados do pH e a da aw obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Lactobacillus</i>	121
Tabela 40 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.....	125
Tabela 41 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	125
Tabela 42 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Lactobacillus</i>	127
Tabela 43 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.....	134
Tabela 44 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	135
Tabela 45 - Valores médios e desvios padrão de aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Lactobacillus</i>	136
Tabela 46 - Percentagens de redução dos teores de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo com dextrose e os inoculados.....	140
Tabela 47 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.....	141
Tabela 48 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.....	142
Tabela 49 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Lactobacillus</i>	142
Tabela 50 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.....	143
Tabela 51 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.....	144
Tabela 52 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Lactobacillus</i>	145
Tabela 53 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.....	147
Tabela 54 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.....	148
Tabela 55 - Valores médios e desvios padrão para os resultados dos parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com <i>Lactobacillus</i>	148

Tabela 56 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.	152
Tabela 57 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	153
Tabela 58 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	153
Tabela 59 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.....	156
Tabela 60 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	157
Tabela 61 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.....	158
Tabela 62 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.	164
Tabela 63 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.	165
Tabela 64 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	166
Tabela 65 - Percentagem de redução dos teores de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo e os inoculados.....	168
Tabela 66 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.	170
Tabela 67 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.	170
Tabela 68 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	171
Tabela 69 - Análise de variância para os resultados dos reológicos, considerando o fator lote.	172
Tabela 70 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.....	173
Tabela 71 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	173
Tabela 72 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.....	175

Tabela 73 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando com o fator modalidade.....	176
Tabela 74 - Valores médios e desvios padrão para os resultados dos parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	176
Tabela 75 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.	179
Tabela 76 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	180
Tabela 77 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	180
Tabela 78 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.....	183
Tabela 79 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	184
Tabela 80 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.....	185
Tabela 81 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.	189
Tabela 82 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.	190
Tabela 83 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	191
Tabela 84 - Percentagem de redução de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo e os inoculados.....	195
Tabela 85 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.	196
Tabela 86 - Análise de variância para os parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.	197
Tabela 87 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	197
Tabela 88 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.....	199
Tabela 89 - Análise de variância para resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.	199

Tabela 90 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	200
Tabela 91 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.....	201
Tabela 92 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.....	202
Tabela 93 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos dos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.	203
Tabela 94 - Análise de variância para os resultados do pH e a_w , considerando o fator lote. ..	206
Tabela 95 - Análise de variância para os resultados do pH e a a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	206
Tabela 96 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Staphylococcus</i>	207
Tabela 97 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.....	210
Tabela 98 - Análise de variância para os parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	211
Tabela 99 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Staphylococcus</i>	212
Tabela 100 - Análise de variância para os resultados das amins biogénicas, considerando o fator lote.	217
Tabela 101 - Análise de variância para os resultados das amins biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.	218
Tabela 102 - Valores médios e desvios padrão para amins biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Staphylococcus</i>	220
Tabela 103 - Percentagem de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os painhos controlo e os inoculados.	224
Tabela 104 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.	225
Tabela 105 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.	226
Tabela 106 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Staphylococcus</i>	226

Tabela 107 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.....	228
Tabela 108 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.....	228
Tabela 109 - Valores médios e desvios padrão para a análise do perfil de textura obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Staphylococcus</i>	229
Tabela 110 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.....	230
Tabela 111 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.....	231
Tabela 112 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Staphylococcus</i>	232
Tabela 113 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.	234
Tabela 114 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	234
Tabela 115 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Lactobacillus</i>	235
Tabela 116 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.....	238
Tabela 117 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.....	238
Tabela 118 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Lactobacillus</i>	239
Tabela 119 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.	243
Tabela 120 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.	244
Tabela 121 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Lactobacillus</i>	245
Tabela 122 - Percentagens de redução dos teores de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os painhos controlo e os inoculados.	247
Tabela 123 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.	248

Tabela 124 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.	249
Tabela 125 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Lactobacillus</i>	249
Tabela 126 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.	250
Tabela 127 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.	251
Tabela 128 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Lactobacillus</i>	251
Tabela 129 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.	252
Tabela 130 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.	253
Tabela 131 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com <i>Lactobacillus</i>	254
Tabela 132 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.	257
Tabela 133 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.	258
Tabela 134 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.	258
Tabela 135 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.	261
Tabela 136 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.	262
Tabela 137 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.	263
Tabela 138 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.	268
Tabela 139 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.	269
Tabela 140 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.	270

Tabela 141 - Percentagem de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os painhos controlo e os inoculados.	273
Tabela 142 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.	274
Tabela 143 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.	275
Tabela 144 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.	276
Tabela 145 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.....	277
Tabela 146 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.....	278
Tabela 147 - Valores médios e desvios padrão para a análise do perfil de textura obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.....	278
Tabela 148 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.....	279
Tabela 149 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.....	280
Tabela 150 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.	281

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Principais modificações bioquímicas que ocorrem durante o processo de cura de enchidos cárneos fermentados.....	10
Figura 2 - Usos e ingredientes funcionais obtidos a partir das bactérias lácticas.	31
Figura 3 - Estruturas químicas e mecanismos de formação das aminas biogénicas.	40
Figura 4 - Curva típica obtida no teste TPA e respetivos parâmetros de textura.....	60
Figura 5 - Plano de amostragem dos ensaios de inoculação com culturas puras e do ensaio de inoculação em paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas mistas na concentração 10^6 células/grama de massa.	74
Figura 6 - Plano de amostragem executado no ensaio de inoculação dos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.	74
Figura 7 - Plano de amostragem efetuado no ensaio de inoculação dos paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas mistas na concentração 10^8 células/grama de massa.....	75

ABREVIATURAS

ALOA - Agar *Listeria de Ottaviani & Agosti*

ANOVA - Análise de variância

ECN - Estafilococos coagulase negativa

FDA - *Food and Drug Administration*

FSAI - *Food Safety Authority of Ireland*

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

ICMSF - *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

ISO - *International Organization for Standardization*

MRS - *Man, Rogosa & Sharp*

MSA - *Mannitol Salt Agar*

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

QPS - *Qualified Presumption of Safety*

RBCA - *Rose Bengal Chloramphenicol Agar*

TPA - *Texture Profile Analysis*

TGE - *Tryptone Glucose Extract*

VRBG - *Violet Red Bile Glucose*

1. INTRODUÇÃO

A carne de suíno e os enchidos são e têm sido elementos característicos da gastronomia portuguesa. Uma das razões para o sucesso dos suínos poderá estar relacionada com o facto de todas as peças deste animal, em fresco e/ou transformadas, serem utilizadas para alimentação humana (o focinho, orelhas, chispes, rabos, peças nobres, entre outros).

Os produtos com maior expressão na salsicharia tradicional portuguesa são os enchidos de carne (chouriços, linguiças, paios e salpicões), os enchidos de sangue (morcelas e chouriças), o paio do lombo (ensacado de carne) e os presuntos curados.

Em Portugal e no mundo os produtos cárneos transformados apresentam uma grande variedade de formas, sabores e texturas, resultado da diversidade das matérias-primas, ingredientes, processos de fabrico utilizados e das regiões onde são produzidos. O que é transversal é o facto da transformação dos produtos cárneos - onde se incluem os enchidos cárneos fermentados - aumentar o tempo de vida útil das matérias-primas que lhe dão origem, assim como o seu valor económico.

As alterações dos hábitos dos clientes e/ou consumidores, o aumento da exigência por parte dos mesmos, a diversificação da oferta e o aumento da concorrência, obriga a que o investimento em novas tecnologias seja um objetivo estratégico da maioria das indústrias alimentares. Num setor tão competitivo, é clara a importância que se deve dar ao conhecimento tecnológico e do mercado, bem como à mobilização de meios tecnológicos para aceder à informação relevante, não esquecendo a valorização e aproveitamento do capital intelectual.

A qualidade diferenciadora dos paios produzidos a partir de porco da raça Alentejana e também de porco preto deve-se, fundamentalmente, às características das matérias-primas cárneas e das gorduras utilizadas, aliadas ao processo produtivo. As características adipogénicas particulares da raça Alentejana e do cruzamento das raças Alentejana e Duroc (porco preto), com elevado teor de gordura intramuscular monoinsaturada, contribui para o desenvolvimento de atributos sensoriais ímpares. No painho da Beira Baixa destaca-se o processo produtivo, onde prevalecem as técnicas tradicionais, de realçar a fumaça tradicional com madeiras rijas não resinosas, especificamente a madeira de azinheira - azinho. No entanto, por vezes surgem problemas no que respeita à homogeneidade das características deste tipo de enchidos, como tal, tudo o que se possa fazer para contribuir para a padronização destes produtos poderá fomentar os hábitos de consumo e garantir a repetibilidade da sua compra. A utilização de culturas de arranque, com base na microbiota autóctone, poderá contribuir para a melhoria da

segurança dos produtos através do controlo de microrganismos patogénicos, pela competição entre os diferentes grupos microbianos e pela produção de metabolitos (ácidos orgânicos e bacteriocinas, entre outros). Poderá ainda, aumentar o tempo de vida útil dos produtos pela inibição de microrganismos deteriorantes, reduzir a produção de amins biogénicas - conhecidas por serem alergénios e terem propriedades carcinogénicas, entre outras -, diversificar os produtos, através da alteração das características das matérias-primas, a fim de se obterem novas propriedades sensoriais e acelerar o processo produtivo. Tudo isto são pormenores tecnológicos que poderão resultar num impacto económico desejável para os produtores, contribuindo para a modernização e para a valorização dos produtos e para o aumento da sua competitividade.

De acordo com o Decreto-Lei n.º 95/2014, de 24 de junho, a referência porco preto só pode ser utilizada nos animais ou nos produtos deles derivados que cumpram um dos seguintes requisitos:

“a) Animais de raça pura, porcos de raça alentejana, registados no Livro Genealógico Português de Suínos (LGPS) - secção raça alentejana, conforme o anexo II do Decreto-Lei n.º 79/2011, de 20 de junho, alterado pelo Decreto-Lei n.º 260/2012, de 12 de dezembro, inscritos no livro de nascimentos e filhos de progenitores inscritos no livro de adultos”;

“b) Animais resultantes de cruzamento de raças, suínos inscritos ou registados no livro de nascimentos de cruzados de alentejano, obtidos a partir do cruzamento de porcas puras e registadas no livro genealógico da raça «alentejana» com varrascos da raça «Duroc» em linha pura (100 %), ou cruzados de alentejano (50% ou 75%), inscritos no livro de cruzados, certificados como válidos pelas entidades gestoras do Livro Genealógico Português de Suínos. Contudo, a denominação de venda associada à referência «porco preto» pode ser utilizada ainda em animais, ou nos produtos deles derivados, que sejam provenientes de «Cerdo Ibérico», desde que seja cumprido, com as necessárias adaptações, o disposto em a) e b)”.

Ao longo deste trabalho abordar-se-á um tema que se julga atual para a indústria dos enchidos tradicionais portugueses. De entre estes, elegeu-se o paio por ser um dos produtos de salsicharia mais fabricados em todo o país. A escolha recaiu sobre o paio de porco preto, do Alentejo, e o painho da Beira Baixa produzido a partir de porco branco, por serem produtos representativos da salsicharia tradicional portuguesa e obtidos com diferentes matérias-primas e processos tecnológicos. Pretende-se aliar a tradicionalidade e genuinidade dos enchidos referidos, às culturas de arranque, ou seja, conciliar o conhecimento tecnológico, a inovação científica, a informação relevante e os produtos tradicionais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enchidos

2.1.1. Definição

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, os enchidos são definidos como “produtos transformados resultantes da transformação da carne ou da ulterior transformação desses produtos transformados, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca”.

Os enchidos cárneos fermentados incluem-se no grupo de alimentos prontos para consumo, definidos pelo Regulamento (CE) N.º 2073/2005, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de novembro de 2005, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, como “alimentos destinados pelo produtor ou fabricante ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra transformação, eficazes para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos perigosos”.

Posto isto, facilmente podemos constatar que, legalmente, os enchidos são considerados produtos estáveis e com reduzido risco sanitário. Em nossa opinião esta posição baseia-se fundamentalmente em cinco fatores: **a)** a redução do valor do pH, principalmente, pela fermentação microbiana dos hidratos de carbono; **b)** a diminuição do valor da atividade da água (a_w) devido aos sais adicionados às massas e à desidratação progressiva durante o processo produtivo; **c)** a adição de nitratos e nitritos, sobejamente conhecidos por disporem de propriedades que previnem e/ou eliminam microrganismos patogénicos e deteriorantes; **d)** a adição de especiarias com atividade antimicrobiana e **e)** quando se recorre à fumagem, a atividade bacteriostática e bactericida do fumo.

Em Portugal existe uma grande tradição na produção de enchidos, todavia, há um abuso claro na designação tradicional, que o Regulamento N.º 1151/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de novembro, relativo aos regimes de qualidade dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios, designa como “a utilização no mercado nacional comprovada por um período que permite a transmissão entre gerações; este período deve ser de, pelo menos, 30 anos”.

A referência a porco preto também é utilizada no mercado nacional de forma indiscriminada na carne fresca, nos preparados de carne e nos produtos à base de carne, não correspondendo, na maior parte dos casos, às características subjacentes àquela expressão. Do mesmo modo, no sector da

restauração, constata-se igualmente a utilização, por vezes abusiva, da referência porco preto (Decreto-Lei 95/2014).

2.1.2. Breve perspetiva histórica

Apesar de existirem indícios que mostram a utilização do fogo há cerca de 700 000 anos (Goren-Inbar *et al.*, 2004), a sua utilização frequente e dominada ocorreu no Paleolítico Superior (40 000 a 12 000 anos a.C.), a vida do Homem primitivo transformou-se. A conservação da carne passou a ser conseguida por meio de carbonização superficial ou por fumagem que possibilitava desidratar e conservar a carne. Aquela descoberta permitia caçar nas estações de abundância para consumo *a posteriori*, quando a caça não fosse possível.

Esta necessidade de conservar a carne terá estado na origem da salsicharia. Práticas como a cura ou a fumagem da carne resultaram da necessidade de prolongar a duração da conservação daquele alimento e não de um imperativo do gosto ou paladar (Elias, 2004).

A carne era um alimento muito apreciado pelo Homem. Os gregos primitivos, heróis de Homero, ofereciam nos banquetes, entre outros alimentos, carne assada; já os primitivos espartanos distribuíam em banquetes públicos, a cada cidadão, uma ração de *physkai* (sopanegra) correspondente a uma mistura de carne de porco assada, vinho e pão de cevada, podendo este ser considerado como o primitivo antepassado da morcela tal como referenciado por Egaña (1948).

Antes da chegada dos romanos à Península Ibérica já se produziam grandes quantidades de suínos. Os ibéricos, naquela altura, já comercializavam azeite, vinho, enchidos e presunto. O suíno foi tão valioso que, na época de Augusto e de Agripa, as moedas romanas criadas tinham a forma de um presunto. Também apareceram figuras de suínos em medalhas consulares, usadas como o emblema de uma legião militar. Na época romana, a matança do suíno, num primeiro momento era efetuada pelo *coquus* (escravo de prestígio), mas depois passou a ser realizada apenas por cozinheiros específicos chamados *vicarius supra cenas* (Sabor Artesano, 2011).

A partir do século XII, a península Ibérica começou a alargar as suas fronteiras, permitindo que existisse uma maior divulgação de costumes, o que promoveu a criação de suínos, que por sua vez fez disparar a produção de enchidos, passando naquela altura a serem consumidos por toda a sociedade (Sabor Artesano, 2011).

Ainda hoje os suínos são produzidos domesticamente de Norte a Sul do país, com maior incidência nalgumas regiões, com Trás-os-Montes, Beiras, Ribatejo, Alentejo e Algarve.

Nas regiões do interior de Portugal, até há poucas décadas atrás (talvez não mais de cinco) não havia eletricidade em muitas casas de habitação. Nestas condições, a salga das carnes e do toucinho e o

fabrico de enchidos no período do Inverno, aproveitando as baixas temperaturas para maior garantia da salubridade dos produtos, eram práticas fundamentais para garantir uma fonte de proteína e gordura de origem animal durante o resto do ano (Elias, 2004). Nesta região parca de recursos, os enchidos, o toucinho e o presunto representavam, nesta época, uma fonte de alimentação fundamental.

Ocorriam frequentemente trocas deste tipo de produtos entre as pessoas, os mais pobres chegavam a efetuar trocas com os mais abastados, davam presuntos e enchidos e recebiam toucinho. Esta troca permitia-lhes obter grandes quantidades de toucinho porque os enchidos e o presunto eram – e são – mais valiosos, no entanto, esse toucinho permitiria alimentar as famílias durante mais tempo e ao mesmo tempo temperar os géneros alimentícios.

Os enchidos tradicionais portugueses são produtos únicos que têm normalmente origem em zonas geográficas que são, em regra, associadas à respetiva designação comercial, apresentam uma grande variedade comercial, ao nível dos sabores, texturas, formas e dimensões, resultado da diversidade das matérias-primas, ingredientes, processos de fabrico utilizados e condições edafoclimáticas da região onde são produzidos.

2.1.3. Produção de enchidos em Portugal

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE, 2017), em 2015, das 361 660 toneladas de carne de suíno refrigeradas, cerca de 62 769 resultaram na produção de enchidos. O que representa 17,36 % e um valor de vendas de 175 776 milhões de euros.

Se observarmos os resultados publicados pelo INE desde o ano 2000, concluímos que houve um forte incremento da produção de enchidos, a produção dos mesmos mais do que triplicou, tendo-se verificado o pico em 2012 (80 886 toneladas). Porém, verificou-se um decréscimo entre 2012 e 2015, julgamos que a conjuntura económico-financeira e, por ventura, a procura por géneros alimentícios, teoricamente, mais saudáveis tenham contribuído para redução da produção.

2.1.4. Etapas gerais do processo de fabrico

Vignolo *et al.* (2010) relataram descrições de técnicas de fermentação e cura de produtos cárneos há mais de 2500 anos na China, podendo dizer-se que estes métodos de conservação são dos mais antigos. Puolanne & Petäjä-Kanninen (2015) corroboram o referido por Vignolo *et al.* (2010), mas apontam, para além da China, a área do Mediterrâneo como sendo uma das de onde provem mais informação relevante sobre a utilização das técnicas mencionadas.

No que concerne à produção de enchidos de uma forma geral, e dos paios de porco preto, do Alentejo, em particular, consideram-se seis etapas: seleção das matérias-primas, miga, preparação da massa,

maturação da massa, enchimento, atadura e cura (câmaras de cura com T°C e HR% controladas) (Gomes, 2016; Elias, 2004; Zanardi *et al.*, 2004). Obviamente que poderão existir ligeiras alterações. Por exemplo, alguns fabricantes colocam os enchidos antes de entrarem na câmara de cura umas horas em fumeiros tradicionais com lume pouco intenso. O objetivo daquela etapa prende-se com a promoção de uma desidratação inicial mais eficaz, simultaneamente os enchidos sofrem ligeiras modificações ao nível sensorial, causadas pelo fumo.

Nalguns casos, como o dos painhos da Beira Baixa, a cura ocorre pelo processo de fumagem, que decorre em fumeiros tradicionais com recurso a madeiras rijas não resinosas, geralmente azinho ou sobre. As etapas que antecedem a fumagem são iguais ou muito semelhantes às dos paios de porco preto, do Alentejo.

A fumagem tradicional favorece a conservação dos alimentos e modifica de forma positiva as características sensoriais como o aroma, o sabor, a cor e a textura. Numerosos compostos do fumo, entre eles o formaldeído e sobretudo os compostos fenólicos, possuem uma ação bacteriostática e bactericida (Pittia *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2004; Girard, 1991), ainda que compostos com um grupo aldeído adicional sejam antimicrobianos mais eficazes que os fenóis (Sikorski & Kołakowski, 2015). Sikorski & Kołakowski (2010) acrescentam os ácidos carboxílicos a este tipo de compostos. Estrada-Muñoz *et al.* (1998) referem que, além do referido, determinados compostos fenólicos do fumo exercem um efeito antioxidante sobre os lípidos, ação que também pode ocorrer com a utilização de fumo líquido. Sikorski & Kołakowski (2010) referem que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos estão identificadas há mais de 50 anos. Os mesmos autores referem que, para as mesmas concentrações, alguns compostos fenólicos têm maior poder antioxidante do que alguns antioxidantes de síntese, como o hidroxianisol butilado (E-320) e o hidroxitolueno butilado (E-321).

Importa referir que esta ação conservante do fumo deve-se à ação combinada de diversos fatores, entre eles a concentração salina dos produtos, duração do processo/etapa de fumagem, aumento da temperatura no fumeiro, redução do valor da a_w , entre outros.

A cor conferida pela fumagem ocorre, principalmente, pela sedimentação de substâncias corantes, principalmente compostos fenólicos, os quais sofrem escurecimento por polimerização ou oxidação. Contudo, a principal causa da coloração escura por ação do fumo reside nas reações de pardeamento não enzimático ou reações de *Maillard*. Estas implicam a reação de um grupo amina livre das proteínas ou de outros compostos azotados com os grupos carbonilos dos açúcares redutores, originando compostos escuros, as melanoidinas (Sikorski & Sinkiewicz 2015; Sikorski & Kołakowski 2010; Möhler, 1980).

A ação do fumo sobre a textura é resultado da modificação por desnaturação ou coagulação das fibras musculares da carne ou da tripa, devidas ao formol e aos vapores creosotados. Produzindo o formaldeído uma reticulação irreversível no colagénio das tripas. O referido influencia a solubilidade do colagénio, dando aos enchidos maior resistência à medida que as temperaturas aumentam (Sousa & Ribeiro, 1983; Möhler, 1980).

Porém, apesar de todos os desenvolvimentos tecnológicos, a fumagem tradicional é efetuada de uma forma um pouco “descontrolada”, como tal, formam-se diversos compostos que poderão ter impacto na saúde dos consumidores e no meio ambiente. De acordo com Sikorski & Sinkiewicz (2015), Emmerson (2011) e Sikorski & Kołakowski (2010), as principais famílias de compostos detetados no fumo são compostos fenólicos, carbonilos, ácidos carboxílicos, furanos, lactonas, álcoois, ésteres e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAPs).

Os produtos que nos merecem maior preocupação são os HAPs pela sua possível ação carcinogénica (Emmerson, 2011; Lorenzo *et al.*, 2011; Roseiro *et al.*, 2011; Palma, 2008). No entanto, Sikorski & Kołakowski (2010) indicam, para além dos HAPs, os *N*-compostos nitrosos e a possibilidade de formação de amins aromáticas heterocíclicas (AAHs), como compostos potencialmente perigosos.

De acordo com Lorenzo (2011), HAPs são compostos orgânicos formados por poluentes ambientais provenientes de inúmeros processos naturais e atividades humanas.

2.2. Evolução dos perfis físico, bioquímico e microbiológico durante a produção de enchidos

Os produtos cárneos apresentam uma grande variedade de formas, tamanhos, aromas, sabores e texturas. Resultam da interação entre as matérias-primas, restantes ingredientes e aditivos, métodos de produção, região onde são produzidos e microbiota autóctone. No entanto, esta multiplicidade de enchidos, durante o processo produtivo, está sujeita a inúmeras modificações/reações físicas, bioquímicas, microbiológicas e sensoriais que são transversais a todos os produtos. Resumidamente, referimo-nos à descida do pH, alterações da microbiota inicial, redução de nitratos a nitritos e posteriormente a óxido nitroso, formação da nitrosomioglobina, solubilização e gelificação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, proteólise, lipólise, oxidação lipídica e desidratação, com consequente redução do valor da a_w .

A estabilidade dos enchidos cárneos fermentados deve-se, principalmente, à inibição dos microrganismos putrefativos, resultante da combinação do pH ácido, da reduzida a_w (consequência da adição de sais de cura, da produção de substâncias de baixo peso molecular com atividade osmótica e também devido à desidratação) e, nos casos em que se submetem os produtos à fumagem,

dos agentes antimicrobianos presentes no fumo (Kumar *et al.*, 2017; Vignolo *et al.* 2010; Toldrá, 2008; Elias, 2004).

2.2.1. Perfil físico

Relativamente ao perfil físico, a principal alteração que decorre durante o processo de fabrico de enchidos cárneos fermentados é a perda de peso ao longo do tempo. Resultando, principalmente, da eliminação da água integrante das matérias-primas e da adicionada às massas de carne. A perda de gordura por gotejamento também deve ser tida em conta, apesar de ser insignificante, isto se o processo de cura - incluindo ou não a fumagem - decorrer da forma mais adequada. Jay (2002) refere que nos primeiros dias de maturação a água presente no produto tende a ficar mais próxima da superfície e então evapora. Esta perda de água resultará naturalmente no abaixamento do valor da a_w , que tem como consequência a alteração e redução da microbiota dos enchidos.

A percentagem de perda de peso e a velocidade com que a mesma decorre influenciam fortemente a qualidade e segurança dos produtos. Estes parâmetros são influenciados, principalmente, pelos valores de temperatura e humidade relativa (HR) utilizados durante o processo de fabrico. A desidratação deve ser paulatina, caso não ocorra desta forma poderão surgir problemas na ligação das massas e na retração do volume do enchido, ficando com aspeto enrugado, para além de ocorrer uma desidratação periférica excessiva, que terá um efeito impermeável no que diz respeito à desidratação das camadas internas. A desidratação inadequada destas zonas poderá conduzir à multiplicação de microrganismos indesejáveis, alterações da textura e contribuir, negativamente, para o aspeto sensorial dos produtos.

Como é facilmente compreensível, o calibre do enchido influencia a velocidade a que ocorre a desidratação. Enchidos com menor diâmetro desidratarão mais no mesmo tempo e nas mesmas condições de cura que enchidos de calibres superiores. Por outro lado, não podemos descurar a influência da dimensão dos pedaços de carne e gordura, que à partida quanto maiores forem mais difícil será a sua desidratação.

No que respeita às massas, estas deverão ter uma composição equilibrada entre as frações muscular e lipídica (80% - 20% ou 70% - 30%, respetivamente). Um baixo teor em gordura reflete-se, por exemplo, na qualidade sensorial dos enchidos, que se tornam secos e quebradiços, prejudicando o seu aspeto, textura e *flavour*, para além de estarem sujeitos a quebras de peso excessivas, com impacto financeiro para o produtor. Massas com percentagem elevada de gordura têm baixo poder de retenção de água e/ou difícil ligação das massas.

Um parâmetro que pode influenciar o descrito nos parágrafos anteriores é o pH que, como é sabido, influencia a capacidade de retenção de água (CRA) da carne. Sem aprofundar esta temática podemos

falar da carne do tipo PSE e/ou DFD, ou até, de uma forma mais simples, do efeito do NaCl no pH das formulações. De acordo com Alvarez (1994) a velocidade de desidratação será tanto maior quanto mais baixo for o pH, até valores de 4,5-5,0, na ausência de sal, e de 4,0 na presença das concentrações habitualmente utilizadas. Girard (1991) refere que a adição de sal em carne fresca, nas doses habituais, diminui o pH em aproximadamente 0,2 unidades colocando-o em valores próximos de 5,0. Por isto, nas condições habituais de produção de produtos cárneos (pH 5,5 - 6,0), a diferença entre o pH das proteínas e do meio aumentará, o que se traduz num aumento da CRA. Andrés & Ruiz (2001) corroboram os autores anteriores referindo o efeito *Donnan* (equilíbrio entre cargas positivas e negativas). Os mesmos autores referem que qualquer fator que tenha como consequência uma redução ou um aumento do espaço entre os miofilamentos das fibras musculares formados fundamentalmente por actina e miosina provocará, respetivamente, uma diminuição ou um aumento do seu ponto isoelétrico. Como consequência, ocorrerá um incremento do número de cargas negativas das proteínas e por fenómenos de repulsão, um aumento do espaço entre as proteínas, por conseguinte um aumento da CRA.

2.2.2. Perfil bioquímico

Os principais fenómenos bioquímicos que afetam os componentes dos enchidos cárneos fermentados durante a maturação são a fermentação dos hidratos de carbono, a ação dos nitritos, quando usados nas formulações, e as degradações que afetam as proteínas (proteólise) e os lípidos (lipólise e oxidação lipídica).

Paramithiotis *et al.* (2010) referem que os principais fenómenos bioquímicos ocorrem durante a cura dos enchidos e afetam a qualidade e segurança dos mesmos, como se pode verificar na Figura 1.

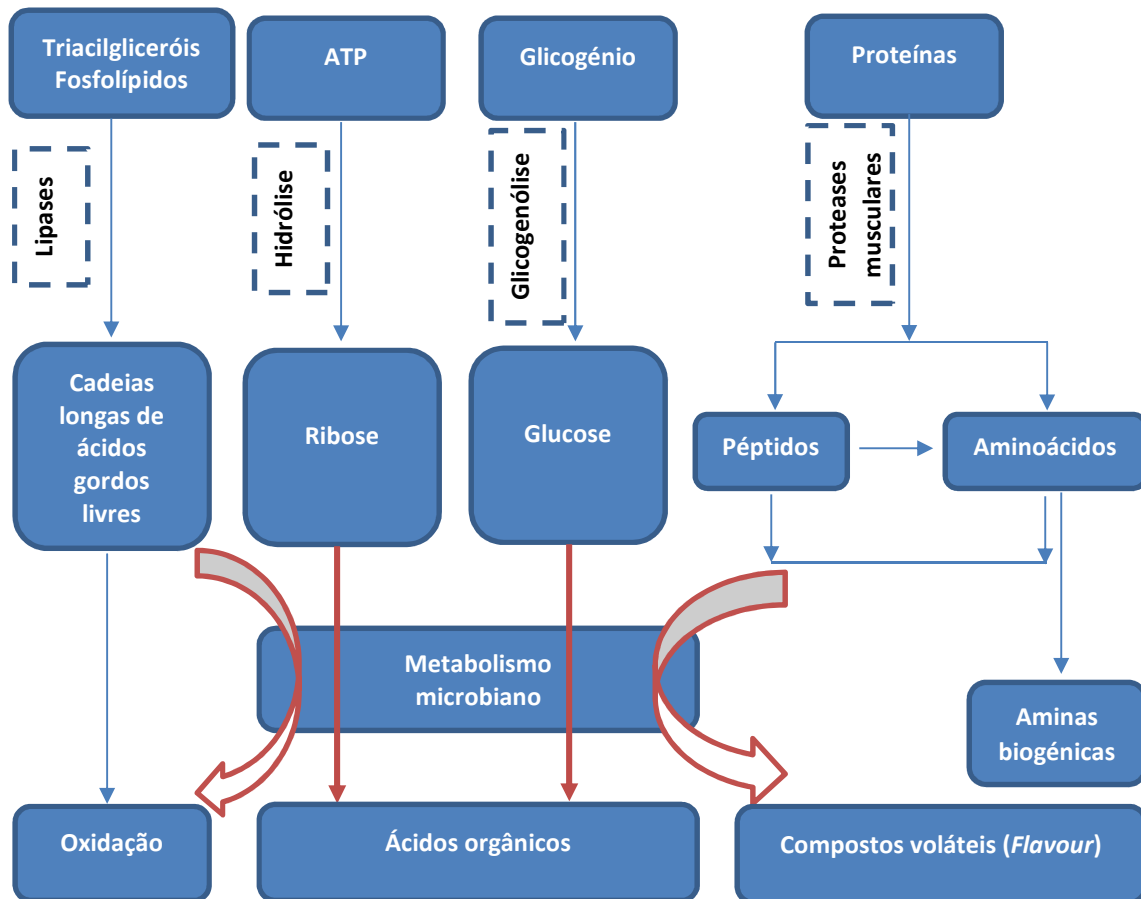


Figura 1 - Principais modificações bioquímicas que ocorrem durante o processo de cura de enchidos cárneos fermentados (Paramithiotis *et al.*, 2010).

2.2.2.1. Glicólise em enchidos

De acordo com Paramithiotis *et al.* (2010); Toldrá (2008) e Arnau *et al.* (2007) os hidratos de carbono, como por exemplo a dextrose, funcionam como fornecedores de carbono e energia para a microbiota autóctone e/ou culturas de arranque adicionadas às massas dos enchidos cárneos fermentados. A fermentação dos hidratos de carbono é produzida com maior intensidade nos primeiros dias de maturação e deve-se fundamentalmente às bactérias lácticas, originando, principalmente, ácido láctico. Como consequência ocorre uma redução no valor do pH, tendo este decréscimo um efeito múltiplo na qualidade dos produtos. Contribui para inibir o desenvolvimento de microrganismos patogénicos e deteriorantes, favorece a libertação de água através da coagulação proteica, bem como a ação hidrolítica da catepsina D e da enzima lipase ácido lisossomal. Trontel *et al.* (2011) referem que este ácido é representado em dois isómeros, o D(-) ácido láctico e L(+) ácido láctico. Para Taskila & Ojamo (2013) a relação entre estes isómeros influencia as suas aplicações, que podem variar da produção de géneros alimentícios à produção de polímeros biodegradáveis. A produção de ambos os isómeros é comum entre as bactérias lácticas com carácter homofermentativo, como as pertencentes ao género *Lactobacillus*. A produção acentuada de um ou de outro isómero depende de uma reação específica

de lactato-desidrogenases NAD dependentes, a presença ou não destas enzimas é que dita qual dos isómeros será produzido (Goffin *et al.*, 2005; Connolly & Lonnerdal, 2004).

A produção de D(-) ácido láctico por algumas estirpes de *Lactobacillus* pode ser influenciada pela presença de uma enzima produzida pela própria bactéria, esta enzima induz a conversão de L(+) em D(-) ácido láctico, até que haja um equilíbrio entre ambos (Narayana *et al.*, 2004).

De acordo com Paramithiotis *et al.* (2010), Toldrá (2008) e Arnau *et al.* (2007) a intensidade do abaixamento do pH depende das estirpes de bactérias lácticas envolvidas no processo, do tipo e quantidade de hidratos de carbono adicionados às massas – caso o sejam –, das temperaturas de fermentação (normalmente mais elevadas nos EUA que na Europa) e de outros parâmetros a ter em conta como a percentagem de NaCl adicionado, tempo e condições de cura, entre outros. A inoculação de bactérias lácticas heterofermentativas resulta na produção de outros compostos, como acetoína, etanol, ácido fórmico e diacetilo, que têm efeitos benéficos na qualidade sensorial dos produtos. Montel *et al.* (1998) referem que, por exemplo, um dos efeitos dos compostos referidos nas linhas anteriores será o incremento do aroma amanteigado aos enchidos.

A geração de compostos voláteis, obtidos durante a fermentação de hidratos de carbono, depende das estirpes inoculadas. A degradação de açúcares é uma importante fonte de di e tricarbonilos que podem reagir, subsequentemente, com aminoácidos, devido a reações de *Strecker* (Toldrá & Flores, 2007).

2.2.2.2. Proteólise

De acordo com Toldrá & Reig (2015) e Toldrá & Flores (1998), a proteólise é um processo bastante complexo nos quais participam, basicamente, dois grandes grupos de enzimas: a) as endopeptidases (μ -calpaína (I), m-calpaína (II), catepsinas B, D, H, e L e o proteassoma) e b) as exopeptidases (tripeptidilpeptidases I e II e dipeptidilpeptidases I, II, III e IV, carboxipeptidases e alanil-, arginil-, metionil-, leucil- e piroglutamil-aminopeptidases). As endopeptidases são responsáveis, principalmente, pela degradação das proteínas miofibrilares e em menor grau pelas sarcoplasmáticas, gerando fragmentos proteicos e peptídicos que servirão de substrato às exopeptidases. Estas hidrolisam as cadeias peptídicas a partir das extremidades. Toldrá & Flores (1998) referem que as peptidases são as responsáveis pela geração de pequenos péptidos, enquanto as aminopeptidases e as carboxipeptidases libertam aminoácidos livres. Toldrá & Reig (2015) e Rojas & Cáceres (2001) referem que estes compostos servem de base ao desenvolvimento de novas reações químicas, importantes no desenvolvimento do *flavour* dos enchidos. Os autores referem-se à reação de *Maillard* e/ou à degradação de *Strecker*.

2.2.2.2.1. Proteólise em enchidos

A carne é composta basicamente por água (72%-76%), proteínas (15%-22%), lípidos (1,5%-4,0%) e vestígio de hidratos de carbono (<1%) (Toldrá & Reig, 2015). Como tal, pensamos que o conhecimento e a perceção das alterações físico-químicas que lhes são características, e respetivas consequências, deverão ser tidas em conta.

As proteínas da carne são os principais componentes funcionais e estruturais dos produtos cárneos transformados e, por isso, determinam as características de tenrura, consistência, textura e aspeto destes produtos. As proteínas miofibrilares constituem cerca de 50-55% do total das proteínas musculares sendo as principais responsáveis pelas características texturais dos produtos cárneos. Salienta-se especialmente a miosina, que para ser solubilizada necessita de uma força iónica mínima de 0,6M (Ziegler & Acton, 1984).

Toldrá (2011, 2007) refere que a proteólise dos enchidos fermentados resulta da ação combinada de enzimas musculares (proteases cárneas) e microbianas (proteases microbianas), assim como da tecnologia utilizada para o fabrico do enchido. Relativamente à ação microbiana esta poderá ser desenvolvida por microbiota autóctone e/ou adicionada (Toldrá, 2011, 2008; Elias, 2004). Toldrá (2007) refere que o contributo de cada um destes grupos de enzimas depende do tipo de carne e do tipo de cultura de arranque inoculada. Estas transformações levam à degradação das proteínas a péptidos e posteriormente a aminoácidos livres.

Estas modificações determinam as características sensoriais dos enchidos, designadamente, a textura, o aroma e o sabor típicos dos produtos acabados.

Geralmente as enzimas microbianas parecem ter um efeito objetivo sobre a rutura de oligopéptidos e péptidos de pequenas dimensões, enquanto que apenas as proteases endógenas parecem atuar nas primeiras fases da degradação proteica (Molly *et al.*, 1997; Verplaetse, 1994).

Toldrá (2006a) refere que as reações proteolíticas progridem, sequencialmente, iniciando-se com a quebra das principais proteínas miofibrilares pelas catepsinas e calpaínas (endopeptidases), resultando na formação de polipeptídeos de tamanhos intermédios, que subsequentemente são degradados em pequenos péptidos pela ação das exopeptidases. Toldrá *et al.* (1997) referem que as aminopeptidases, di e tripeptidilpeptidases, geram, respetivamente, aminoácidos e pequenos peptídeos.

Toldrá & Reig (2015), Sanz *et al.* (2002) e Toldrá (1998) referem que as catepsinas B, D, H e L são proteases (endopeptidases) lisossómicas de tamanho pequeno, que têm a sua atividade inibida por altas concentrações de sal e favorecidas por pH ácido. Molly *et al.* (1997) referem que a catepsina D

é a que mais contribui para a atividade proteolítica em enchidos, devido à sua estabilidade e atividade em pH ácido. Outras catepsinas como B e L têm uma ação menos efetiva sobre as proteínas cárneas. Fatores como a temperatura, o pH, a concentração de sal e a duração dos processos são de extrema importância na extensão da proteólise. Valores elevados de azoto não proteico foram reportados por Flores *et al.* (1997) em enchidos fermentados com valores de pH inferiores a 4,7. Toldrá (2007) refere que a geração de pequenos péptidos pode ser inibida pela concentração salina que inibe as peptidases musculares, apesar de se poderem alcançar valores elevados de azoto não proteico, até 20% do conteúdo do azoto total. Alguns aminoácidos são gerados pelas enzimas musculares e microbianas e têm sido correlacionados com descritores sensoriais como o sabor picante, doce, amargo, entre outros. Toldrá (2006b) refere que o metabolismo microbiano da leucina, valina, e isoleucina são responsáveis pela produção de aldeídos de cadeia ramificada e produtos secundários, como ácidos, álcoois e ésteres. Demeyer *et al.* (2000) referem que este metabolismo se pode encontrar nos géneros *Staphylococcus* e *Kocuria*, *Debaryomyces hansenii* e de forma menos eficaz no género *Lactobacillus*. No decurso do processo de fermentação dos enchidos, como consequência do aumento da temperatura, da presença de NaCl e da diminuição do pH, ocorre a insolubilização das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, que continua durante o processo de cura (López, 1997). Ainda que o pH não continue a descer com o decurso da cura, podendo mesmo aumentar ligeiramente (Lücke, 1998), e a temperatura possa diminuir (por vezes para valores de 8°C - 15°C), a desidratação continua pelo efeito da baixa humidade relativa ambiental. Esta conjuntura faz com que a interação proteína-água seja menor, o que dificulta a solubilização proteica (Kenney & Hunt, 1990). Como consequência desta perda de água, aumenta a concentração salina dos enchidos que, devido à sua elevada força iónica, contribui para a desnaturação proteica da carne, o que se traduz em alterações estruturais profundas (Knight & Parsons, 1988).

No concerne ao azoto não proteico, no princípio da cura dos enchidos os péptidos representam a principal fração, enquanto os aminoácidos livres predominam no produto acabado (Toldrá, 2011, 2008).

2.2.2.2. Transformação dos aminoácidos

Os aminoácidos desempenham um papel importante na formação do sabor dos enchidos e também no aroma pela geração de aldeídos de cadeia ramificada e seus produtos secundários como ácidos, álcoois, ésteres e através do metabolismo microbiano da leucina, valina e isoleucina. No entanto, por vezes, estes poderão ter efeitos indesejáveis nas características sensoriais dos enchidos (Toldrá, 2008). A degradação dos aminoácidos livres ocorre mediante reações de desaminação oxidativa, descarboxilação e transaminação (Toldrá, 2007). Molinard & Spinnler (1996) referem que a

degradação de tirosina e triptofano levam à formação de fenol e indol e compostos como escatol (3-metilindol), responsável por originar aromas desagradáveis nos produtos cárneos. Toldrá & Reig (2015) apontam as aminas biogénicas como outro produto da descarboxilação microbiana dos aminoácidos. Para a formação de aminas são necessários aminoácidos precursores disponíveis, a presença de microrganismos, ou de enzimas capazes de descarboxilar aminoácidos e, finalmente, condições favoráveis para a multiplicação destes microrganismos ou para a atuação das enzimas descarboxilantes. Toldrá & Flores (2007) referem que estas podem afetar negativamente o *flavour* e a segurança dos enchidos. Os mesmos autores indicam que a desaminação oxidativa e não oxidativa de aminoácidos pode produzir cetoácidos que se podem transformar, por descarboxilação, em aldeídos, álcoois e ácidos de considerável importância, como o 2 - e 3-metilbutanol, o 2 - e 3 - metilbutanal e o 2 - e 3-metilpentanóico. Stahnke (1994), referem que os 2 - e 3-metilbutanal transmitem aroma a queijo, para além de poderem transformar-se nos ésteres correspondentes, que produzem aromas frutados. O metional transmite um aroma a batata cozida, o 2-acetilpirrolina a pipocas e carne assada e o ácido 3-metilbutanóico a meias suadas.

Sem aprofundar muito a temática associada à reação de *Maillard* e degradação de *Strecker*, é de referir que as mesmas têm elevada influência no *flavour* dos enchidos, tal como referiram Flores & Olivares (2015); Toldrá & Flores (2007) e Ordoñez *et al.* (1999). Rojas & Cáceres (2001) indicam que a reação de *Maillard* ou de escurecimento não enzimático ocorre entre aminoácidos e grupos redutores, como açúcares e outros compostos carbonílicos. Já Ordoñez *et al.* (1999) referem que a degradação de *Strecker* consiste na desaminação oxidativa e descarboxilação de um aminoácido na presença de um composto dicarbonilo, e finalmente a geração de um aldeído, o composto dicarbonilo surge a partir de degradações de açúcar ou das reações de *Maillard*.

2.2.2.3. Lipólise

De acordo com Toldrá (2006a) a lipólise resulta de um conjunto de reações enzimáticas que pressupõem a hidrólise dos lípidos musculares ou do tecido adiposo, separando os ácidos gordos das moléculas de glicerol dos triacilgliceróis (lipases) e hidrolisando as ligações éster dos fosfolípidos (fosfolipases). Estévez *et al.* (2009) indicam que o resultado final da ação de ambos os grupos de enzimas consiste na geração de inúmeros ácidos gordos livres, estes podem ser saturados, mono ou polinsaturados e posteriormente estão sujeitos a processos de oxidação química ou enzimática, contribuindo para o aroma dos produtos.

2.2.2.3.1. Lipólise em enchidos

Os lípidos constituem uma importante fração de praticamente todos os géneros alimentícios. Posto isto, o conhecimento e a perceção das alterações físico-químicas que lhes são características, e respetivas consequências, deverão ser tidas em conta (Richards, 2006).

A utilização de gordura de suíno na produção de enchidos cárneos fermentados é essencial para conferir as características organolépticas a que os consumidores estão habituados. Os lípidos, juntamente com a carne, constituem os principais ingredientes dos enchidos. Para Elias (2004) a composição em ácidos gordos da massa cárnea inicial, em especial a relação entre ácidos gordos saturados e insaturados, desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do aroma e sabor dos enchidos. Os lípidos do tecido muscular são constituídos, essencialmente, por triacilgliceróis e fosfolípidos e, em menor número, por matérias insaponificáveis, como o colesterol (Toldrá & Reig, 2015; Richards, 2006).

A gordura utilizada na produção de enchidos caracteriza-se por ser 50% monoinsaturada (principalmente ácido oleico) e 15-20% polinsaturada (principalmente ácido linoleico), cabendo os restantes 30-35% aos ácidos gordos saturados (principalmente ácido esteárico) (Skibsted *et al.*, 1998).

Os triacilgliceróis e os fosfolípidos são os substratos naturais das lipases (ácida lisosomal e neutra) e fosfolipases musculares (A1, A2, C e D) (Rojas & Cáceres, 2001), que vão exercer um efeito hidrolítico libertando ácidos gordos das moléculas de triacilgliceróis e fosfolípidos, respetivamente (Toldrá, 2006a; Rojas & Cáceres, 2001).

A lipólise consiste na degradação enzimática de tri, di e monoacilgliceróis e fosfolípidos, com a conseqüente formação de ácidos gordos livres, tendo este processo uma forte influência na formação do *flavour* dos enchidos (Toldrá, 2008). Rojas & Cáceres (2001) corroboram o referido e indicam que a lipase ácida microssomal é a lipase mais importante do músculo, hidrolisando tri, di e monoacilgliceróis, tendo um pH ótimo de atuação compreendido entre os 4,5 e 5,5.

O primeiro passo na degradação dos lípidos é a hidrólise dos triacilgliceróis por enzimas microbianas (*Staphylococcaceae*, *Kocuria*, bolores e leveduras) e lipases endógenas (musculares e do tecido adiposo) (Lachowiz, 2012). Molly *et al.* (1997, 1996) referem que 60%-80% desta atividade é realizada pelas lipases musculares, cabendo a restante percentagem às enzimas microbianas. Sorensen & Samuelsen (1996) indicam que lipases produzidas por *Staphylococcus xylosus* e *Debaryomyces hansenni* hidrolizaram gordura de suíno durante as etapas iniciais na produção de enchidos fermentados, ou seja, quando o pH se encontrava mais elevado.

2.2.2.3.2. Oxidação lipídica em enchidos

De forma simultânea e/ou consecutiva às reações enzimáticas (lipólise), ocorre um conjunto de reações químicas (auto-oxidação) tanto primárias (formação de peróxidos lipídicos) como secundárias (formação de compostos aromáticos voláteis) porque os compostos primários são bastante reativos, sendo essa a razão para se obterem os compostos secundários. Importa referir que estes últimos compostos têm forte influência na formação do *flavour* dos enchidos (Rojas & Cáceres, 2001; Toldrá *et al.*, 2001).

Como referido em 2.2.2.3.1., a maioria da gordura de suíno utilizada na produção de enchidos cárneos fermentados é insaturada. Toldrá (2011, 2008) e Richards (2006) referem que estes ácidos gordos, contendo ligações duplas, caracterizam-se por serem suscetíveis à oxidação. Richards (2006) e Toldrá *et al.* (2001) indicam que estes processos oxidativos podem ser influenciados por catalisadores externos como a luz, calor, teor de humidade e/ou catiões metálicos ou enzimas oxidativas endógenas do músculo, como as peroxidases e as ciclo-oxigenases.

A concentração de ácidos gordos livres depende da atividade hidrolítica das lipases, dos processos metabólicos dos microrganismos e das reações oxidativas. A lipólise avançada envolve a libertação de ácidos gordos livres que sofreram processos oxidativos enzimáticos e não enzimáticos, originando carbonilos e outros compostos de baixo peso molecular (álcoois, hidrocarbonetos alifáticos, aldeídos, cetonas e ésteres, sendo os últimos produzidos na ausência de nitrito adicionado), sendo estes os principais precursores do *flavour* dos produtos acabados (Toldrá, 2011; Paramithiotis *et al.*, 2010; Richards, 2006; Toldrá, 1998). A hidrólise enzimática acelera a peroxidação dos lípidos. Devido ao elevado conteúdo de gordura e à baixa a_w a oxidação lipídica é o fator que mais deprecia a qualidade dos enchidos, podendo originar aromas e sabores oxidados (ranço) e perdas de pigmentos e vitaminas, podendo a adição de antioxidantes comerciais ou naturais reduzir estes efeitos (Paramithiotis *et al.*, 2010; Richards, 2006).

2.2.2.4. Formação do *flavour* em enchidos

O *flavour* inclui o sabor, o aroma, as sensações táteis e outras propriedades sensoriais (Flores & Olivares, 2015).

Toldrá (1998) refere que a formação do *flavour* em produtos cárneos resulta de processos bastante complexos. O mesmo autor refere que alguns poderão não estar devidamente compreendidos, devido ao número de reações envolvidas.

Toldrá (2008) e Toldrá & Flores (2007) referem que a formação do *flavour* em enchidos fermentados depende de fatores como o tipo de produto, os ingredientes e aditivos utilizados e as condições em

que decorre o processo produtivo (a inoculação de culturas de arranque, quando ocorre, tem uma influência considerável).

Flores & Olivares (2015); Toldrá & Flores (2007) e Toldrá (1998), referem que a ação das enzimas e/ou as reações químicas e bioquímicas são as principais envolvidas no desenvolvimento do *flavour*. Entre elas a degradação dos hidratos de carbono, a proteólise, reações de degradação dos aminoácidos (descarboxilação, desaminação e transaminação), reações de *Maillard*, degradação de *Strecker*, lipólise e a oxidação lipídica.

A maioria dos autores aponta os microrganismos pertencentes aos ECN e ao género *Kocuria* como os principais potenciadores do *flavour* de produtos cárneos em geral e enchidos cárneos fermentados em particular (Toldrá, 2015; Cocconcelli & Fontana, 2010; Toldrá & Flores, 2007; Hammes & Hertel, 1998), não esquecendo o efeito das leveduras - principalmente a espécie *Debaryomyces hansenii* - e dos bolores - principalmente o género *Penicillium* (Cocconcelli & Fontana, 2010; Hammes & Hertel, 1998). Até as bactérias lácticas através da produção dos ácidos láctico e acético, este em menor quantidade, etanol e acetona, estão envolvidos no metabolismo de péptidos e aminoácidos, tendo a sua “cota” na formação do *flavour* de enchidos cárneos fermentados (Cocconcelli & Fontana, 2008).

2.2.3. Perfil microbiológico

Antes de se abordar a evolução da microbiota durante o processo produtivo dos enchidos, julga-se ser importante referir que alguns autores, como Gossner *et al.* (2012); Kuhn (2011) e Talon *et al.* (2007a) apresentaram casos de toxinfecções alimentares associadas a produtos cárneos fermentados.

Agentes etiológicos como *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes* levantam problemas aos produtores, como tal, há já quem pasteurize os enchidos por forma a salvaguardar a segurança dos mesmos. Todavia, esse processo acarreta perdas ao nível sensorial e poderá, em nossa opinião, descaracterizar os produtos. Desse modo, a inoculação de culturas de arranque autóctones poderá auxiliar no controlo da microbiota indesejável e potencialmente presente em enchidos.

O tecido muscular dos animais são é estéril. É durante as operações inerentes à obtenção de carcaças que ocorre a inevitável, embora controlável, contaminação que tem fontes de procedência variadas, como o ambiente, peles, cerdas, conteúdo intestinal, facas, serras e os colaboradores, afetando sobretudo a superfície mas também o interior das massas musculares, através da disseminação pela circulação sanguínea, quando a sangria é mal executada ou em consequência da evisceração errada e/ou tardia (Garriga & Aymerich, 2015; Guerrero, 2006; *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*, 2005).

A carne constitui um meio nutritivo muito favorável ao desenvolvimento microbiano, consequência do elevado teor em água, pH próximo da neutralidade e da sua composição rica em nutrientes, principalmente proteína (Lawrie, 2005). Garriga & Aymerich (2015) corroboram o autor mencionado e apresentam valores para a a_w (0,96-0,97) e pH (5,6-6,0) que reforçam as causas para a carne ser um meio favorável à multiplicação microbiana. A relação existente entre hidratos de carbono e compostos azotados é muito baixa; como consequência, mesmo com a presença de microbiota ácido-láctica, o pH não decresce consideravelmente. Neste contexto, a multiplicação dos microrganismos na carne é levado a cabo, fundamentalmente, às custas dos seus componentes solúveis: hidratos de carbono, ácido láctico e aminoácidos.

As massas utilizadas para a produção de enchidos têm uma microbiota proveniente, essencialmente, das matérias-primas e das tripas, isto após a etapa de enchimento.

Os microrganismos que se encontram na massa inicial dos enchidos desempenham um papel fundamental na sua qualidade. Alguns daqueles microrganismos intervêm no desenvolvimento das características sensoriais e no estabelecimento da salubridade dos enchidos, mediante diferentes reações. Uma conduzida por bactérias lácticas: fermentação de açúcares e acidificação da massa, outras conduzidas por *Staphylococcaceae* e *Micrococcaceae*: redução de nitratos e nitritos e ocorrência de fenómenos proteolíticos e lipolíticos. Em alguns tipos de enchidos também são úteis os bolores e as leveduras, que proporcionam proteção em relação à luz, ao oxigénio e à desidratação excessiva, podendo mesmo participar em reações que determinam a qualidade organolética do produto final (Ordóñez *et al.*, 1999).

Os parâmetros ecológicos, tanto ambientais (temperatura, HR, entre outros) como os do produto (a_w , pH, matérias-primas, entre outros), alcançados durante o processo produtivo dos enchidos determinam a seleção de determinada microbiota, conseguindo-se deste modo a estabilidade dos produtos e as características sensoriais, habituais, dos mesmos (Guerrero, 2006; Jovita *et al.*, 2001).

Ramos (1990) refere que as bactérias mais resistentes a valores de pH ácido são as Gram-positivo, concretamente *Lactobacillus* que têm um pH mínimo de multiplicação que oscila entre 3,8 e 4,4. Porém, Jay (2000) indica o valor de 3,16 como valor mínimo de referência. Segundo o mesmo autor, o limite mínimo de multiplicação para *Staphylococcus aureus* é de 4,0 e as espécies do género *Salmonella* spp. (Gram-negativo) não se desenvolvem a valores de pH inferiores a 4,05. Já microrganismos do género *Clostridium* têm dificuldades em multiplicar-se com valores de pH inferiores a 4,6. Do exposto se infere que os valores de pH habituais na carne de suíno não representam um obstáculo efetivo para a multiplicação dos principais microrganismos patogénicos nem de outros, responsáveis por alterações nos produtos acabados.

Ordóñez *et al.* (1999) referem que a carga microbiana inicial das massas de carne destinadas ao fabrico de enchidos – sem adição de culturas de arranque – se situa entre 10^5 a 10^6 ufc/g e é composta por microrganismos semelhantes aos que se podem encontrar em carne fresca: bactérias lácticas, *Staphylococcaceae*, *Micrococcaceae*, enterobactérias, pseudomonas, entre outros. Depois do enchimento das tripas ocorre uma modificação das condições ambientais, comparativamente com o ambiente em que decorreu o processo de maturação das massas. Posto isto, Ravyts *et al.* (2012, 2010) e Babić *et al.* (2011) inferem que devido ao consumo do oxigénio, abaixamento da a_w , adição dos agentes de cura (NaCl, nitratos, nitritos e açúcares) e especiarias, aumento da acidez e fumagem (quando existe) rapidamente as bactérias lácticas se multiplicam e “dominam” o ambiente microbiano dos produtos, seguidos por *Staphylococcaceae*, *Micrococcaceae*, bolores e leveduras. Os mesmos autores, corroborados por Hames & Hertel (1998), referem que apesar da multiplicação precoce de *Staphylococcaceae* e *Micrococcaceae*, estas sofrem um declínio causado pelo desenvolvimento as bactérias lácticas, que tornam o meio mais ácido.

Paramithiotis *et al.* (2010) referem que no final da cura de enchidos – dependendo da carga microbiana inicial das matérias-primas e das condições do processo produtivo – a microbiota, geralmente, consiste em 10^7 a 10^9 ufc/g de bactérias lácticas, 10^4 a 10^6 ufc/g *Staphylococcaceae*, *Micrococcaceae* e enterococos e 10^2 a 10^4 ufc/g de bolores e leveduras. Drosinos *et al.* (2005) apresentam valores de bolores e leveduras de 10^2 a 10^4 ufc/g. Vignolo *et al.* (2010) e Ammor & Mayo (2007), referem os microrganismos mais encontrados são primeiramente as bactérias lácticas, seguidos por ECN, os quais constituem a segunda maior população na microbiota de produtos cárneos fermentados, normalmente apresentam concentrações de 10^6 a 10^8 log ufc/g em produtos processados a nível industrial, destes, os mais frequentes são estirpes como *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus*, *S. equorum* e *Kocuria* spp.

Bactérias da família *Staphylococcaceae* auxiliam a fermentação do produto e são essenciais para a estabilidade da cor do produto acabado, pois são capazes de realizar a redução de nitratos a nitritos e favorecer a formação de nitrosomioglobina (Paramithiotis *et al.*, 2010; Mauriello *et al.*, 2004). Entretanto, estes microrganismos não se multiplicam facilmente em meios que contenham pH muito ácido, ao contrário de *Lactobacillus* (Cocconcelli & Fontana, 2010; Toldrá, 2008; Jovita *et al.* 2001).

Microrganismos do género *Enterococcus* também podem ser encontrados em produtos cárneos fermentados, a sua alta tolerância a meios salinos e ampla faixa de multiplicação em diferentes temperaturas permite que estes microrganismos se desenvolvam durante o processo de maturação do produto (Lebert *et al.*, 2007a).

Guerrero (2006) e Ordóñez *et al.* (1999) referem que a circunstância as bactérias lácticas, *Staphylococcaceae* e *Micrococcaceae* (*Kocuria*) serem os principais grupos microbianos presentes nos enchidos cárneos fermentados está associada ao facto dos valores do pH baixarem de 5,8-6,2 nas massas para valores de 5,0 ou menos, no produto acabado. Simultaneamente a a_w reduz-se a valores inferiores a 0,90.

2.3. Culturas de arranque

De acordo com a bibliografia são inequívocos os benefícios da utilização de culturas de arranque para a melhoria da qualidade e segurança dos produtos de salsicharia (Kumar *et al.*, 2017; Laranjo *et al.* 2017b).

Culturas de arranque são culturas microbiológicas de organismos conhecidos, podendo ser puras ou mistas, inoculadas em concentrações definidas e que contribuem para as características específicas do substrato (Kumar *et al.*, 2017; Laranjo *et al.*, 2017b).

Hammes & Hertel (1998) definem culturas de arranque como preparações que contêm formas viáveis (vivas ou em estado latente) de microrganismos que se desenvolvem no substrato de fermentação e com uma atividade metabólica desejada. Geralmente, mas não necessariamente, os microrganismos crescem (multiplicam-se) neste substrato.

Para García de Fernando *et al.* (1992) as culturas de arranque para enchidos são microrganismos viáveis que, ao multiplicar-se, melhoram a conservabilidade, salubridade microbiológica e potenciam a sua aceitabilidade, mantendo ou melhorando a sua qualidade nutritiva.

Importa referir que apesar de atualmente alguns enchidos serem produzidos industrialmente com recurso a culturas de arranque, ainda há muitas regiões do mundo onde aqueles produtos são obtidos através de métodos tradicionais sem adição deste tipo de cultura. Neste caso, os microrganismos fermentadores necessários são originários da própria carne e do ambiente fabril e constituem a denominada "microbiota nativa ou autóctone" que tem capacidade para influenciar as características organoléticas e a segurança dos produtos.

O início da utilização de culturas de arranque na produção de alimentos terá resultado da adição de parte do produto final à matéria-prima destinada ao fabrico de alimentos com características idênticas, em inglês podem aplicar-se as designações de *back-slopping* ou *back-inoculation*. As condições ambientais encarregar-se-iam de seleccionar a microbiota capaz de crescer nos diferentes substratos a transformar (Kumar *et al.*, 2017).

De acordo como Ricke *et al.* (2007) o uso de culturas de arranque em produtos como os enchidos é relativamente recente, comparado com o uso deste tipo de cultura em produtos como a cerveja e os produtos láteos.

As culturas de arranque foram utilizadas pela primeira vez em produtos lácteos fermentados e queijos diversos (Roquefort, Stilton, Gorgonzola, Camembert e Brie). Desde então, tem-se estendido a sua aplicação ao pão e outros produtos de padaria, cerveja, vinho, espumantes, ácidos orgânicos, como o acético, cítrico, glucónico e tartárico, produtos à base de frutas e hortícolas, sumos e azeitonas, assim como produtos cárneos e derivados dos ovos (Fischer *et al.*, 1994). As culturas de arranque começaram a ser usadas no início do século XX e a partir da última década do mesmo século usam-se, principalmente, bactérias lácticas, *Staphylococcaceae* e em menor escala *Micrococcaceae*, bolores e leveduras. Nos Estados Unidos da América os géneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* eram objeto de interesse para a tecnologia das carnes, na Europa a investigação foi dirigida com maior intensidade para o uso de estirpes da família *Micrococcaceae* como culturas de arranque (Hammes & Hertel, 1998).

Estirpes tanto do género *Micrococcus* como do género *Staphylococcus*, no início pela sua capacidade de produzir catalase e nitrato-redutase, foram paulatinamente assumindo importância no fabrico de enchidos e de outros produtos de salchicharia (Carrascosa, 1989). Posteriormente, para a seleção destes microrganismos foram valorizadas outras propriedades, como a redução de nitritos, a capacidade de acidificar o meio e as capacidades proteolítica e lipolítica (Lücke & Hechelmann, 1987; Liepe, 1985). Atualmente têm-se em conta todas as propriedades mencionadas no presente parágrafo, mais o facto das estirpes a inocular não disporem de resistência a antibióticos e não serem produtoras de aminas biogénicas (Kumar *et al.*, 2017; Laranjo *et al.*, 2017b).

Fischer *et al.* (1994) referem que a utilização de culturas de arranque em produtos cárneos teve um franco aumento durante a década de 70 do século XX. Buckenhüskes (1994) indica que no último terço do século passado uma nova geração de culturas de arranque, composta por estirpes isoladas a partir da carne, como *L. sakei* e estafilococos coagulase negativa (ECN) passaram a ser inoculadas, recorrendo a testes fenotípicos que indicassem a relevância tecnológica das estirpes. Cocconcelli & Fontana (2010) referem que esta geração de culturas de arranque é a utilizada atualmente pela indústria dos produtos cárneos, dando primazia à utilização de culturas microbianas autóctones.

É de realçar que a qualidade e segurança das matérias-primas, associadas ao processo produtivo, serão os fatores primordiais na definição das características do produto acabado. A utilização de culturas de arranque, apesar de contribuir para um controlo mais efetivo sobre o desenvolvimento microbiano no produto, não substitui as boas práticas industriais, como as condições higio-sanitárias

adequadas, manipuladores com formação contínua e a utilização de matérias-primas com cargas microbianas reduzidas de microrganismos indesejáveis, entre outros fatores.

Na União Europeia, os microrganismos com benefícios tecnológicos são considerados ingredientes e devem satisfazer os requisitos constantes do Regulamento CE n.º 178/2002, de 28 de janeiro, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority-EFSA*) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Consequentemente, a responsabilidade pela utilização segura destes microrganismos em alimentos deverá ser assegurada pelos produtores dos mesmos.

Uma grande variedade de bactérias e fungos é utilizada na produção de alimentos e alimentos para animais, alguns deles têm uma longa história de uso seguro, enquanto outros são menos estudados e podem representar um perigo biológico para os consumidores (EFSA, 2013).

Aspetos relacionados com a segurança das culturas de arranque são de extrema importância, como tal, a EFSA há já alguns anos introduziu o conceito de *Qualified Presumption of Safety (QPS)*, homólogo do sistema *Generally Recognized As Safe (GRAS)* dos EUA, que têm como objetivo, entre muitos outros, garantir que a utilização de culturas de arranque nos alimentos e alimentos para animais é “pré-avaliada”, contribuindo desta forma para que os mesmos não criem resistência a antibióticos e/ou não contribuam para a formação de toxinas ou aminas biogénicas no produto acabado.

O Regulamento CE n.º 1169/2011, de 25 de outubro, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, refere a necessidade de estarem devidamente identificados todos os ingredientes, por ordem decrescente, nos rótulos. Por conseguinte, visto os microrganismos com benefícios tecnológicos serem considerados ingredientes, deverão constar no rótulo dos géneros alimentícios.

No entanto, deve ter-se a certeza que a segurança alimentar não funciona como um travão à inovação.

Na produção de enchidos, os microrganismos estarão sujeitos a um ambiente muito hostil, como condições de anaerobiose, conteúdos de sal elevados, utilização de nitratos e nitritos, temperaturas de refrigeração e pH e a_w reduzidos.

A maioria dos autores defende a utilização de culturas de arranque selecionadas face às comerciais, ou seja, aplicadas ao fim a que se destinam, daí existir a designação de culturas autóctones que, teoricamente, estarão mais adaptadas às condições do ambiente fabril, tecnologia aplicada, formulações, entre outros. Desta forma, terão capacidade competitiva face aos grupos deteriorantes e/ou patogénicos (Babić *et al.*, 2011; Casquete *et al.*, 2011a; Cocconcelli & Fontana, 2010; Talon *et al.*,

2008). Simultaneamente, aquelas culturas contribuirão para a formação do *flavour* característico/específico/regional dos enchidos (Talon *et al.*, 2007). Leroy *et al.* (2006) referem que as culturas de arranque produzidos no Norte da Europa não se adaptam bem e nem sempre conseguem competir com a microbiota que coloniza as unidades fabris e, conseqüentemente, os produtos industriais do Sul da Europa, resultando em perdas das características sensoriais.

Mais uma vez, o aumento da literacia alimentar por parte dos consumidores, os incentivos, as recomendações e orientações de diversas instituições nacionais e internacionais, conduzem a um desafio lançado à indústria alimentar em geral, que é o de reduzir as concentrações dos aditivos alimentares, podendo as culturas de arranque contribuir para esta ação. Pois a fermentação dos produtos cárneos é uma tecnologia que, se for corretamente efetuada e, eventualmente otimizada, poderá responder aos critérios indicados para tornar os produtos mais seguros. O seu contributo para a conservação dos produtos cárneos pode permitir reduzir as quantidades de aditivos com função conservante. Para além de se equacionar a possibilidade de obtenção de uma “vantagem” probiótica, uma vez que, habitualmente, os produtos cárneos fermentados são consumidos crus, logo a microbiota viável que estes incorporam é ingerida pelo consumidor.

2.3.1. Principais culturas de arranque inoculadas em enchidos

Hammes & Hertel (1998) forneceram argumentos relativamente aos aspetos que devem ser incluídos na definição da qualidade microbiológica das preparações a inocular como culturas de arranque: **i)** “identidade” conhecida dos microrganismos ao nível taxonómico; **ii)** Estabilidade das propriedades fisiológicas desejadas; **iii)** Pureza biológica (ausência de contaminação que interfira com as propriedades desejáveis da preparação) e **iv)** Segurança sanitária (livre de qualquer contaminação que interfira com a saúde do consumidor). Robinson (2014) acrescentou outros requisitos: **i)** ser de fácil manipulação, armazenamento e transporte; **ii)** ser efetivo ao longo do período de fermentação do produto; **iii)** apresentar algum grau de resistência a fatores inibitórios presentes no produto fresco e **iv)** ter capacidade para se multiplicar simultaneamente com outras culturas de arranque. Kumar *et al.* (2017) referem que a cultura de arranque deve ser típica (autóctone) do enchido a inocular, por forma a contribuir para as características sensoriais esperadas pelo consumidor daquele produto.

Para Cocconcelli & Fontana (2015); Simion *et al.* (2014); Casquete *et al.* (2012); Talon & Leroy (2011); Cocconcelli & Fontana (2010); Gücükoğlu & Küplülü (2010); Lauková *et al.* (2011) e Vignolo *et al.* (2010) as bactérias lácticas (principalmente as dos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*) e ECN são as culturas utilizadas, mais frequentemente, na produção de enchidos cárneos fermentados. Cocconcelli & Fontana (2015) e Cocconcelli & Fontana (2010) acrescentam as *Micrococcaceae* (*Kocuria*) e para Cocconcelli & Fontana (2008) e Toldrá (2008) além dos grupos referidos, com menor frequência

também se usam: bolores e leveduras. De acordo com os mesmos autores, o referido no parágrafo anterior aplica-se para as culturas comerciais e para as culturas autóctones utilizadas por todo o mundo.

Importa referir que é nos cocos Gram-positivo que se incluem os ECN e *Kocuria*.

Na Tabela 1 apresentam-se as espécies mais frequentemente utilizadas como culturas de arranque na produção de enchidos cárneos fermentados.

Tabela 1 - Espécies mais frequentemente utilizadas como culturas de arranque para a produção de enchidos cárneos fermentados.

Grupo microbiano	Espécie microbiana
Bactérias lácticas	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>P. acidilactici</i> e <i>P. pentasaceus</i>
Estafilococos Coagulase Negativa (ECN)	<i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. equorum</i>
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria kristinae</i> , <i>K. varians</i> , <i>Micrococcus auranticus</i> , <i>M. conglomeratus</i> e <i>M. varians</i>
Bolores	<i>Penicillium nalgiovensis</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. candidum</i> , <i>P. camembertii</i> , <i>P. roquefortii</i> , <i>P. canescens</i> , <i>P. simplicissimum</i> , <i>P. micznski</i> , <i>P. olsonii</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. janthinellum</i> e <i>P. cyclopium</i>
Leveduras	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>D. kloecckerii</i> , <i>D. cantarellii</i> , <i>D. pfaffii</i> e <i>Candida famata</i>

Adaptado de: Cocconcelli & Fontana (2015); Babić *et al.* (2011); Talon & Leroy (2011); Cocconcelli & Fontana (2010); Carrascosa (2001); Hames & Hertel (1998).

Anba-Mondoloni *et al.* (2015) e Cocconcelli & Fontana (2015) referem que, no que respeita às bactérias lácticas, as espécies *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* e *L. plantarum* são as mais frequentemente utilizadas na Europa e *Pediococcus pentosaceus* e *P. acidilactici* são as mais frequentemente utilizadas na América do Norte. No que respeita a ECN, tanto na Europa como na América do Norte, *Staphylococcus xylosus* e *S. carnosus* são os mais conhecidos pelos contributos verificados no desenvolvimento e estabilidade da cor, aroma e sabor.

2.3.2. Contributo das culturas de arranque para a melhoria da qualidade e segurança dos enchidos

A utilização de culturas de arranque em enchidos visa fundamentalmente assegurar e melhorar: **a qualidade higio-sanitária**, mediante a inibição de microrganismos patogénicos e de microrganismos de alteração; **a qualidade sensorial**, contribuindo para a estabilização da cor, o desenvolvimento de aromas e sabores característicos e o estabelecimento de alterações desejáveis na textura; **a qualidade tecnológica**, melhorando a velocidade e a homogeneidade da perda de água e contribuir para a

padronização dos produtos acabados; **a qualidade nutricional**, através do efeito probiótico de alguns microrganismos.

As características sensoriais dos enchidos prontos a consumir resultam de uma interação complexa dos processos físico-químicos, bioquímicos e microbianos no desenrolar do processo produtivo, ao longo do qual se vão formando e modificando compostos responsáveis pela textura e aparência geral dos produtos. As degradações envolvendo os lípidos (lipólise e oxidação lipídica) e as proteínas (proteólise) são os principais fenómenos que afetam as características sensoriais dos produtos cárneos; com menor impacto aparecem a fermentação dos hidratos de carbono e a ação dos agentes nitrificantes, quando usados nas formulações (Laranjo *et al.*, 2017a; Møller *et al.*, 2015; Ravyts *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2010).

Na Tabela 2 apresentam-se os contributos genéricos as bactérias lácticas, ECN, *Micrococcaceae* (*Kocuriae*), bolores e leveduras usados como culturas de arranque para a manutenção e melhoria da qualidade e segurança dos enchidos.

Tabela 2 - Contributos das bactérias lácticas, ECN, *Micrococcaceae*, bolores e leveduras usados como culturas de arranque para a manutenção e melhoria da qualidade dos enchidos.

Grupo microbiano	Atividade metabólica	Benefícios no decorrer da fermentação
Bactérias lácticas²	Acidificação do meio	Sabor ácido e picante; inibição de microrganismos patogénicos e deteriorantes; textura; aceleração do processo produtivo e formação da cor.
	Atividade proteolítica	<i>Flavour</i> (compostos não voláteis)
	Atividade antimicrobiana (bacteriocinas)	Inibição de microrganismos patogénicos e deteriorantes; extensão do período de vida útil
	Atividade antioxidante	Estabilidade da cor
Estafilococos Coagulase Negativa (ECN)²	Atividade nitrato-redutase	Redução do teor de nitratos no produto e fixação da cor típica
	Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada e ácidos gordos livres	<i>Flavour</i> (Compostos voláteis)
<i>Micrococcaceae</i>¹	Atividade nitrato-redutase	Redução do teor de nitratos no produto e fixação da cor típica
Bolores e leveduras^{2,3}	Atividade antioxidante	Previne a oxidação dos lípidos (rancificação) Estabilização da cor
	Atividade proteolítica	Sabor
Leveduras⁴	Atividade lipolítica	<i>Flavour</i> (Compostos voláteis)

¹Cocconcelli & Fontana (2010); ²Vignolo *et al.* (2010); ³Bolumar *et al.* (2005); ⁴Selgas *et al.* (2003)

Na Tabela 3 apresenta-se a composição de algumas culturas de arranque comerciais usadas em produtos cárneos fermentados, as suas propriedades tecnológicas e funcionais, bem como os benefícios identificados ao longo da fermentação.

Tabela 3 - Composição de algumas culturas de arranque comerciais usadas em produtos cárneos fermentados.

Espécies microbianas	Propriedades tecnológicas e funcionais para a carne fermentada	Benefícios no decorrer da fermentação
<i>Lactobacillus curvatus</i> + <i>Staphylococcus carnosus</i> ²	Acidificação acelerada do meio, contributo para o desenvolvimento do aroma, bem como a estabilização da cor. O pH final pode ser ajustado através das percentagens de açúcares adicionados	Redução e inibição microbiana resultantes do abaixamento do pH Firmeza Aroma
<i>Pediococcus acidilactici</i> + <i>Pediococcus pentosaceus</i> ²	Acidificação acelerada do meio, contributo para o desenvolvimento do aroma, bem como a estabilização da cor. O pH final pode ser ajustado através das percentagens de açúcares adicionados	Redução e inibição microbiana resultantes do abaixamento do pH Firmeza Aroma
<i>Staphylococcus xylosum</i> + <i>Pediococcus pentosaceus</i> ²	Acidificação acelerada do meio. <i>S. xylosum</i> contribui para a fixação da cor e desenvolvimento do aroma.	Redução e inibição microbiana resultante do abaixamento do pH Firmeza
<i>Pediococcus acidilactici</i> + <i>Lactobacillus curvatus</i> + <i>Staphylococcus xylosum</i> ²	Acidificação acelerada do meio, contributo para o desenvolvimento do aroma, bem como a estabilização da cor. A produção de bacteriocinas por parte do <i>P. acidilactici</i> e <i>L. curvatus</i> contribui para a eliminação de <i>L. monocytogenes</i>	Inibição de microrganismos patogénicos e deteriorantes; extensão do período de vida útil (pH e bacteriocinas) Firmeza Aroma
<i>Lactobacillus sakei</i> + <i>Staphylococcus carnosus</i> ²	Ligeira acidificação do meio, contributo para o desenvolvimento do aroma, bem como a estabilização da cor	Redução e inibição microbiana resultantes do abaixamento do pH Firmeza Aroma
<i>Pediococcus pentosaceus</i> + <i>Staphylococcus carnosus</i> ²	Ligeira acidificação do meio, contributo para o desenvolvimento do aroma, bem como a estabilização da cor	Redução e inibição microbiana resultantes do abaixamento do pH Firmeza
<i>Lactobacillus pentosus</i> + <i>Staphylococcus carnosus</i> ²	Ligeira acidificação do meio e contributo para o desenvolvimento do aroma	Cor Aroma Redução e inibição microbiana resultantes do abaixamento do pH
<i>Lactobacillus sakei</i> + <i>Staphylococcus xylosum</i> + <i>S. carnosus</i> ²	Atividade proteolítica e lipolítica Catabolismo de aminoácidos Atividade nitrato-redutase Atividade antioxidante: catalase e superóxido desmutase	Cor Aroma Redução e inibição microbiana resultantes do abaixamento do pH
<i>Staphylococcus equorum</i> ²	Atividade nitrato-redutase contributo para o desenvolvimento do <i>flavour</i>	Cor Aroma Redução e inibição microbiana resultantes do abaixamento do pH

Tabela 3 (continuação) - Composição de algumas culturas de arranque comerciais usadas em produtos cárneos fermentados.

Espécies microbianas	Propriedades tecnológicas e funcionais para a carne fermentada	Benefícios no decorrer da fermentação
<i>Kocuria varians</i> ²	Atividade nitrato-redutase	Cor Redução e inibição microbiana resultantes do abaixamento do pH
<i>Micrococcus varians</i> ^{1,3}	Atividade nitrato-redutase	Flavour e aroma
<i>Debaromyces hansenii</i> ^{1,3}	Atividade proteolítica, lipolítica e antioxidante	Flavour, aroma e previne a rancificação
<i>Candida famata</i> + <i>Penicillium nalgiovensis</i> + <i>P. camamabertii</i> ^{1,3}	Atividade proteolítica, lipolítica e antioxidante	Flavour, aroma e previne a rancificação

¹ Lauková *et al.* (2011); ² Cocconcelli & Fontana (2010); ³ Vignolo *et al.* (2010).

Tjener *et al.* (2004) escreveram que tipicamente se inoculam 10^6 a 10^7 células/g de massa de estafilococos em enchidos, e que estes valores resultam de experiências um pouco na base da tentativa e erro até se perceberem as vantagens e desvantagens do diferencial de concentrações. Os mesmos autores consideraram 10^5 células/g de massa, 10^6 células/g de massa e 5×10^7 células/g de massa como níveis baixos, intermédios e elevados, respetivamente, de inoculação.

Com a Tabela 4 pretende-se mostrar de uma forma sumária alguns estudos de inoculação em diferentes produtos, incluindo tipo e concentração das culturas de arranque.

Tabela 4 - Estudos de inoculação em diferentes produtos, incluindo tipo e concentração das culturas de arranque.

Produto	Referência	Cultura de arranque	Concentração inoculada (células/g de massa)*
Enchidos fermentados chineses	Xie <i>et al.</i> (2015)	<i>L. plantarum</i> + <i>S. xylosum</i>	10^5
Paio do Alentejo	Elias <i>et al.</i> (2014)	<i>L. sakei</i> + <i>S. xylosum</i>	10^5
Enchidos espanhóis	Latorre-Moratalla <i>et al.</i> (2014)	<i>L. sakei</i> CTC494 e <i>L. curvatus</i> CTC273	10^6
Enchidos fermentados romenos	Simion <i>et al.</i> (2014)	<i>L. sakei</i> CECT5764 + <i>S. equorum</i> SA25 + <i>L. acidophilus</i> CECT903	<i>L. sakei</i> CECT5764 e <i>S. equorum</i> SA25 (10^7) e <i>L. acidophilus</i> CECT903 (10^8)
Chouriço e Salsichão espanhóis	Casquete <i>et al.</i> (2012)	<i>P. acidilactici</i> MC184 + <i>S. vitulus</i> RS34 <i>P. acidilactici</i> MS198 + <i>S. vitulus</i> RS34 e <i>P. acidilactici</i> MS200 + <i>S. vitulus</i> RS34	5×10^7

Tabela 4 (continuação) - Estudos de inoculação em diferentes produtos, incluindo tipo e concentração das culturas de arranque.

Produto	Referência	Cultura de arranque	Concentração inoculada (células/g de massa)*
Salsichão espanhol	Casquete <i>et al.</i> (2011b)	<i>P. acidilactici</i> MC184 + <i>S. vitulus</i> RS34 <i>P. acidilactici</i> MS198 + <i>S. vitulus</i> RS34 e <i>P. acidilactici</i> MS200 + <i>S. vitulus</i> RS34	5 x 10 ⁷
<i>Fuet e llonganissa</i>	Latorre-Moratalla <i>et al.</i> (2012a)	<i>L. curvatus</i> CTC273	10 ⁶
Enchidos fermentados belgas	Janssens <i>et al.</i> (2012)	<i>S. carnosus</i> M72	10 ⁶
Enchidos fermentados gregos	Baka <i>et al.</i> (2011)	<i>L. sakei</i> 4413; <i>L. sakei</i> 8426; <i>L. plantarum</i> 7423 e <i>L. curvatus</i> 8427	2-5 x 10 ⁷
Enchidos fermentados italianos (Basilicata)	Bonomo <i>et al.</i> (2011)	<i>L. sakei</i> DBPZ0062 + <i>S. equorum</i> DBPZ0241	10 ⁶
Enchido de porco ibérico	Ruiz-Moyano (2011)	<i>L. fermentum</i> HL57 e <i>P. acidilactici</i> SP979	5 x 10 ⁷
Enchidos fermentados franceses	Talon <i>et al.</i> (2008)	<i>L. sakei</i> F08F202 + <i>S. equorum</i> F08Bf15 + <i>S. succinus</i> F08Bf19	10 ⁶
Enchidos fermentados italianos (Vallo di Diano)	Casaburi <i>et al.</i> (2007)	<i>S. xylosus</i> CVS11 e FVS21 e <i>L. curvatus</i> AVL3	10 ⁷

*Valores aproximados

Tendo como base o descrito na Tabela 4, verifica-se que as concentrações mais frequentemente inoculadas pelos autores foram 10⁶ e 10⁷ células/g de massa.

Todavia, numa revisão efetuada por Oliveira *et al.* (2018) os autores apontam um intervalo de concentrações um pouco mais amplo (10⁵ células/g de massa - 10⁹ células/g de massa).

2.3.2.1. Bactérias lácticas

O termo bactérias lácticas foi usado como sinónimo de *milk-souring organism* (Salminen & Wriqth, 1998). De acordo com o Abuja (1993) o termo "*Bacterium acidi lactici*" foi proposto por Weigmamn em 1899, contudo, as primeiras referências a este tipo de bactérias são devidas a Hueppe (1884), que descreveu uma parte da microbiota responsável pela acidificação do leite e de produtos lácteos, tendo-a designado por "*Milchsauerbacillus*". Stiles & Holzapfel (1997) referem que o conceito de bactérias lácticas foi desenvolvido no início do século XX, precedido por desenvolvimentos científicos e técnicos ocorridos na segunda metade do século XIX. O facto de os autores perceberem precocemente a influência positiva daquele grupo microbiano nos alimentos, já em 1857, levou Pasteur a desenvolver estudos envolvendo o mesmo, seguidos pelos de Lister em 1873, ano em que

este autor conseguiu isolar a primeira cultura pura destas bactérias, designada, na altura, de *Bacterium lactis* (provavelmente *Lactococcus lactis*). Os mesmos autores referem que o uso de culturas de arranque foi quase simultâneo, tendo decorrido em 1890, em Copenhaga (Dinamarca) por Storch, e em Kiel (Alemanha), por Weigmann.

No entanto, foi Beijerinck em 1901 que descreveu pela primeira vez este grupo bacteriano (Orla-Jensen, 1919).

Genericamente, por bactérias lácticas entende-se o grupo de microrganismos cuja principal característica é a produção de ácido láctico a partir de hidratos de carbono fermentescíveis (Florou-Paneri *et al.* 2013; Cocconcelli & Fontana, 2010; Stiles & Holzapfel, 1997). De acordo com Florou-Paneri *et al.* (2013), as bactérias lácticas encontram-se nos mais variados *habitats*, entre eles leite e produtos lácteos, carne e produtos cárneos, animais marinhos e terrestres, produtos vegetais, trato gastrointestinal e urinário de pessoas e animais.

As bactérias lácticas caracterizam-se principalmente por serem Gram-positivo, catalase negativas, não esporuladas, imóveis, anaeróbias facultativas ou microaerófilas, ácido-tolerantes, não redutoras de nitrato e produtoras de ácido láctico, produto final da fermentação dos hidratos de carbono. No entanto, Cocconcelli & Fontana (2008) referem que os *Lactobacillus* têm capacidade para eliminar nitritos nos produtos cárneos fermentados como consequência tanto da produção de ácido láctico como da produção de enzimas nitrito-redutoras, para além de apresentarem alguma atividade ao nível da catalase (*L. sakei* e *L. plantarum*). Os géneros mais importantes de bactérias lácticas são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus* e *Bifidobacterium* (Hutkins, 2006; Klein *et al.*, 1998; Stiles & Holzapfel, 1997).

No que respeita ao tipo de fermentação as bactérias lácticas podem dividir-se em três grupos:

i) homofermentativas obrigatórias: realizam a fermentação da glucose via glicólise, gerando duas moléculas de ácido láctico e duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) para cada molécula de açúcar. Não têm capacidade metabólica para assimilar pentoses ou gluconato (Kang *et al.*, 2013; Corsetti & Settanni, 2007);

ii) heterofermentativas obrigatórias: para além do ácido láctico ainda produzem CO₂, ácido acético e/ou etanol, dependendo da presença ou ausência de recetores de eletrões. Aquele processo de fermentação, conhecido como 6-fosfogluconato/fosfocetolase (6-PG/PK), é mais rápido comparado com o homofermentativo, mas é produzida 50 % menos energia, ou seja, a partir de uma molécula de glucose produz-se uma molécula de ATP (Kang *et al.*, 2013; Wright & Axelsson 2011);

iii) heterofermentativas facultativas: realizam fermentação de forma semelhante ao grupo homofermentativo, porém, algumas espécies produzem outros ácidos em condições limitantes de glicose. As pentoses são catabolizadas em ácido láctico e acético via 6-fosfogluconato/fosfocetolase (6-PG/PK) (Wright & Axelsson 2011).

Bactérias lácticas como *Lactobacillus plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus* possuem caráter heterofermentativo facultativo (Conconcelli & Fontana, 2008).

A EFSA (2007) refere que algumas espécies de bactérias lácticas se incluem no grupo de microrganismos com interesse tecnológico e terapêutico pelo que exibem o selo de (QPS). A *Food and Drugs Administration* (FDA) considera que podem ser GRAS. No entanto, Ammor & Mayo (2007) referem que existem estudos a demonstrar a resistência a alguns antibióticos por parte de espécies de *Lactobacillus*, e por isso é que apenas algumas espécies estão incluídas no grupo de microrganismos reconhecidos como QPS ou GRAS.

De acordo com Babić *et al.* (2011) e Ammor & Mayo (2007), no Sul da Europa, a espécie mais frequentemente isolada a partir de enchidos cárneos fermentados é *L. sakei*, não obstante de frequentemente se isolarem *L. plantarum* e *L. curvatus*, pelo que estas são habitualmente selecionadas para posterior utilização como cultura de arranque, sendo exemplos de espécies classificados como QPS e GRAS. Já bactérias como *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* são microrganismos de eleição nos Estados Unidos da América (EUA) para culturas de arranque utilizadas em enchidos cárneos fermentados. Toldrá (2008) refere que esta situação se deve ao facto de na Europa se usarem temperaturas de cura, normalmente, inferiores a 30°C e nos EUA entre os 30°C e os 35°C, e indica *L. plantarum* e *Pediococcus acidilacti* como as espécies mais frequentemente utilizadas nos EUA.

As bactérias lácticas são utilizadas frequentemente na indústria alimentar, na área da química e também na medicina. Na Figura 2 apresentam-se os usos e ingredientes funcionais obtidos a partir das bactérias lácticas.

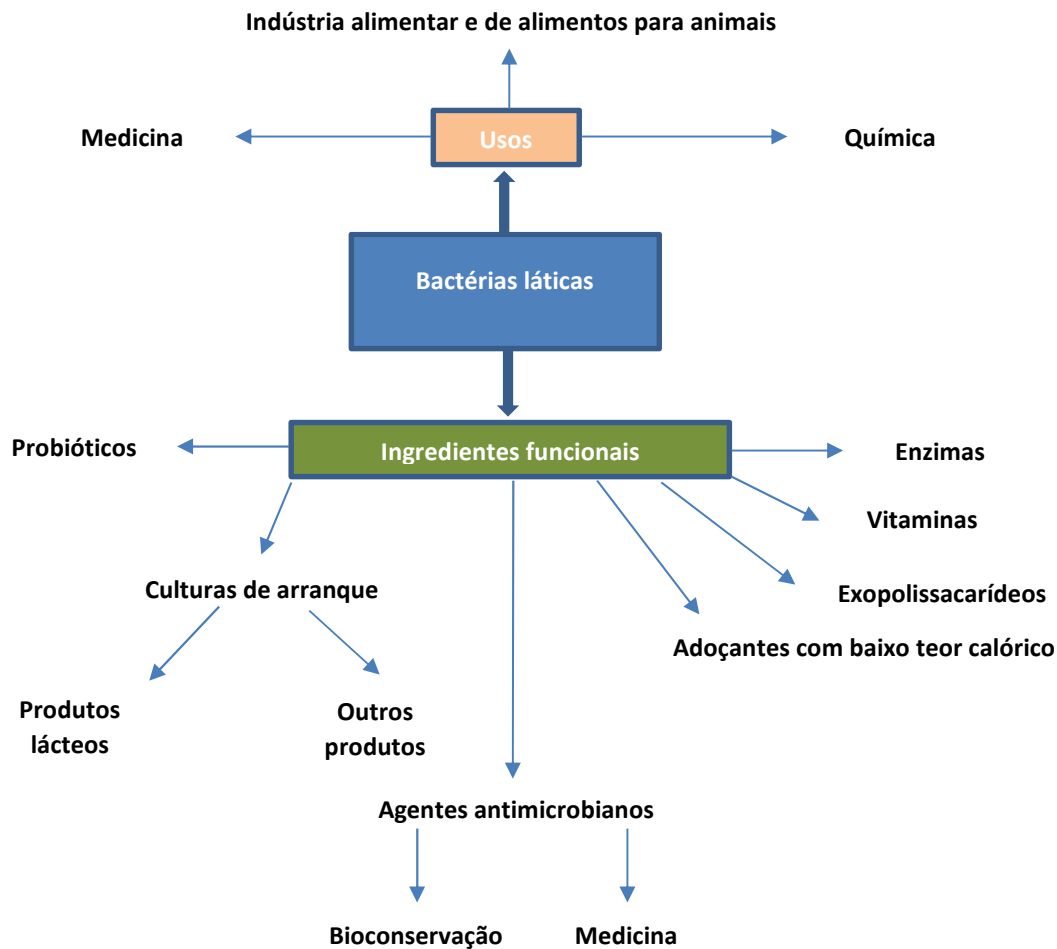


Figura 2 - Usos e ingredientes funcionais obtidos a partir das bactérias lácticas (Florou-Paneri *et al.*, 2013).

As bactérias lácticas desempenham várias funções benéficas durante o processo produtivo dos enchidos cárneos fermentados, fundamentalmente, mas também nos enchidos em geral. Contudo, e atendendo ao facto das bactérias lácticas serem dos microrganismos mais competitivos durante o processo produtivo, é-lhes atribuído o conceito de serem bioconservadoras/bioprotetoras, pois em conjunto com fatores intrínsecos do alimento, como o pH, a temperatura e a a_w , conseguem estabelecer diferentes condições que proporcionam obstáculos para os microrganismos patogénicos e de deterioração, tornando o alimento mais seguro mesmo sem a utilização de técnicas de conservação como atmosferas modificadas, tratamentos de alta pressão, conservantes químicos ou outros (Kröckel, 2013; Vignolo *et al.* 2010; Lücke, 2000). Estas capacidades contribuem efetivamente para o fator de qualidade higio-sanitário, mas as bactérias lácticas apresentam outros contributos para a melhoria da qualidade e segurança dos enchidos e que são resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Contribuição das bactérias lácticas usadas como culturas de arranque para a manutenção e melhoria da qualidade e segurança dos enchidos.

Fator de qualidade	Efeito	Característica	Atividade metabólica
Higio-sanitário	Bioprotetor	Inibição de microrganismos patogênicos e deteriorantes	Fermentação láctica (ácidos orgânicos, CO ₂) Produção de bacteriocinas Produção de peróxidos
Nutricional	Probiótico	Melhoria da saúde do consumidor	Presença ou multiplicação de microrganismos
	Fermentativo	Melhoria da digestibilidade e eliminação de nitritos	Proteólise Lipólise Fermentação láctica
Sensorial	Fermentativo	Firmeza ao corte Aroma e sabor Fixação da cor	Fermentação láctica "Pseudocatalase" Fermentação láctica Proteólise Lipólise
Tecnológico	Fermentativo	Redução do tempo de cura	Fermentação láctica

Cocconcelli & Fontana (2010); Paramithiotis *et al.* (2010); Vignolo *et al.* (2010); Arnau *et al.* (2007); Carascosa (2001).

Flores *et al.* (2015) e Toldrá & Flores (1998) referem que as bactérias lácticas utilizadas como culturas de arranque para produtos cárneos incidem favoravelmente sobre a qualidade sensorial. O ácido láctico, por si só, além de criar condições de acidez que favorecem as reações de formação da cor, confere um sabor característico aos produtos e contribui para a coagulação das proteínas da carne. Ravyts *et al.* (2012) e Toldrá (2008), para além do ácido láctico, falam em diacetilo, acetaldeído, acetoína, etanol, ácidos acético, propiónico e butírico, mas em concentrações menores, pois se tal não acontecer poderão comprometer os atributos sensoriais dos enchidos. Por exemplo, a formação de diacetilo e acetoína conferem aromas a manteiga e iogurte nos enchidos. Stahnke (1994) refere que o ácido propiónico proporciona aos enchidos aromas como noz e o ácido butírico a suor dos pés ou a vômito. Já Flores & Olivares (2015) mencionam que o acetaldeído e o etanol podem originar nos enchidos aromas a erva e a fermento, respetivamente.

Como consequência da acidez, é produzida uma certa desnaturação e insolubilização das proteínas que acelera e melhora a aquisição de uma textura adequada, conferindo ao produto uma maior e melhor firmeza, estabilidade e coesão ao corte. A aproximação do pH ao ponto isoelétrico das proteínas (5,1-5,3), leva a menor retenção de água, sendo libertada com maior facilidade, melhorando deste modo a qualidade tecnológica dos produtos e, indiretamente, a sua qualidade higio-sanitária, pela concomitante redução da *a_w* (Girard, 1991). Desta forma, conseguem-se encurtar os processos

produtivos, reduzir os custos de produção e aumentar a competitividade no mercado atual. O facto das culturas de arranque (*Lactobacillus*) disporem de capacidade para produzir bacteriocinas contribui para a segurança alimentar, que poderia ser comprometida com o encurtar dos processos produtivos, caso os mesmos ocorram (Kumar *et al.*, 2017; Ravyts *et al.*, 2012).

2.3.2.2. *Staphylococcaceae* e *Micrococcaceae*

As *Micrococcaceae* são frequentemente mencionadas como fazendo parte de culturas de arranque para aplicar em produto cárneos fermentados. No entanto, na maioria dos casos os autores estão a referir-se ao género *Staphylococcus* (que pertence à família *Staphylococcaceae*). Originalmente este género bacteriano era agrupado com outros cocos Gram-positivo, como os *Micrococcus*, porque os dois géneros coabitam os mesmos *habitats*. Contudo, diversos estudos taxonómicos mostraram o contrário, pois filogeneticamente estes géneros são distintos. O género *Staphylococcus* pertence à subdivisão *Clostridium* das bactérias Gram-positivo, enquanto o género *Micrococcus* faz parte das *Actinomycetales*. *Kocuria varians* (formalmente classificada como *Micrococcus varians*) é membro da família das *Micrococcaceae* e é usada como cultura de arranque, principalmente, devido à sua atividade nitrato redutase (Coconcelli & Fontana, 2010, 2008).

Os ECN pertencem à classe Bacilli, inseridas na família *Staphylococcaceae*, englobando cinco géneros, *Staphylococcus*, *Jeitigalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomicoccus* e *Salinicoccus* (Prax *et al.*, 2013).

A capacidade de produzir coagulase por sua vez divide os estafilococos em dois grupos: Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) e ECN. Estes últimos incluem as espécies *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. lentus*, entre outros (Coconcelli & Fontana, 2010).

As bactérias do género *Staphylococcus* crescem na presença de 10% de cloreto de sódio e a temperaturas compreendidas entre 6°C e 40°C (De Vos *et al.*, 2009), mas o intervalo de temperatura ótimo para a sua multiplicação é entre 30°C e 37°C (Klooss & Bannermer, 1994). As suas colónias são geralmente opacas, podendo ser de cor branca, amarelada, creme ou alaranjadas.

De acordo com LPSN (2018) estão descritas 52 espécies pertencentes ao género *Staphylococcus*.

De acordo com Babić *et al.* (2011) e Coconcelli & Fontana (2010, 2008) as espécies mais frequentemente isoladas de enchidos cárneos fermentados são *Staphylococcus xylosus*, *S. equorum*, *S. succinus* e *S. saprophyticus*, predominando a espécie *S. xylosus*. Janssens *et al.* (2012) indicam que as espécies que predominam são *S. xylosus*, *S. saprophyticus* e *S. equorum*. Ravyts *et al.* (2012) apontam *S. xylosus* e *S. saprophyticus* e com menor frequência *S. equorum* e *S. succinus*. Porém, Landeta *et al.* (2011); Leroy *et al.* (2009); Blaiotta *et al.* (2004) e Mauriello *et al.* (2004) alertam para o

facto de algumas vezes a prevalência de *S. equorum* poder ter sido subestimada em favor de *S. xylosus*, devido a dificuldades na diferenciação das espécies ao nível da sequência do gene 16S rRNA e erros de identificação usando métodos de discriminação fenotípica.

As estirpes mais frequentemente isoladas poderão não ser as mais frequentemente inoculadas, uma vez que as estirpes a inocular deverão ser as que apresentem maior aptidão. Por maior aptidão, entenda-se superior tolerância a temperaturas de refrigeração, concentrações mais elevadas de NaCl, pH reduzidos, fumo, disporem de atividade nitrato redutase, entre outros, e não apresentarem efeitos negativos para a saúde dos consumidores.

As *Micrococcaceae* são cocos Gram-positivo, catalase positivos, não móveis ou móveis, aparecendo estes com menor frequência, aeróbios e anaeróbios facultativos, halotolerantes e com uma temperatura ótima de multiplicação entre os 25°C e 30°C, sendo que algumas são capazes de crescer a temperaturas próximas de 10°C (Cocconcelli & Fontana, 2010, 2008; Jovita *et al.*, 2001).

Dastager *et al.* (2010) referem que a família *Micrococcaceae* engloba treze géneros, porém, os mais relevantes para o presente estudo serão *Kocuria* e *Micrococcus*.

De acordo com Babíc *et al.* (2011); Cocconcelli & Fontana (2010, 2008); Toldrá (2008); Selgas & Garcia, (2007) e Mauriello *et al.* (2004), *Kocuria* é o principal género pertencente à família *Micrococcaceae* utilizado em culturas de arranque para a inoculação em produtos cárneos. Os mesmos autores referem que os microrganismos do género *Kocuria* participam no desenvolvimento e estabilização da cor vermelha pela atividade nitrato redutase, que auxilia na formação de nitrosomioglobina. Podem contribuir para a formação do aroma por apresentarem enzimas proteolíticas e lipolíticas, formando péptidos, aminoácidos e ácidos gordos, além de prevenirem a oxidação lipídica devido à sua atividade catalítica.

Flores *et al.* (2015) referem que a ECN têm sido atribuídas faculdades na redução de nitrato e degradação do peróxido de hidrogénio, com vantagens ao nível da qualidade e estabilidade da cor dos produtos, assim como de compostos azotados e lipídicos, com interações ao nível do *flavour* dos mesmos (Laranjo *et al.*, 2017b; Ravyts *et al.*, 2012). Cocconcelli & Fontana (2015) e Simonová *et al.* (2006) referem que ECN têm capacidade para libertar enzimas, lipases e proteases, capazes de formar compostos de baixo peso molecular como péptidos, aminoácidos, aldeídos, amins e ácidos gordos de cadeia curta que influenciam a textura e o desenvolvimento dos compostos responsáveis pelo aroma.

2.3.2.3. Leveduras

As leveduras são caracterizadas pela sua elevada halotolerância, podendo crescer em meios com valores de a_w de 0,87, pelo seu metabolismo aeróbio ou ligeiramente fermentativo e por serem ácido-resistentes (multiplicam-se facilmente com valores de pH entre 4 e 7) (Selgas & Garcia, 2015; 2007). Flores *et al.* (2015); Corral *et al.* (2015) e Selgas & Garcia (2007) referem que as leveduras se encontram naturalmente em carnes frescas e em enchidos fermentados. Rantsiou *et al.* (2005) referem que a presença das mesmas é comum em carnes frescas (10^2 - 10^4 ufc/g), mas dependendo do processo produtivo podem estar presentes ao longo do mesmo e no produto acabado em concentrações que variam de <1 ufc/g a 10^5 ufc/g.

Relativamente aos enchidos fermentados, e atendendo às condições adversas em que decorre o processo produtivo, as leveduras conseguem multiplicar-se por tolerarem os baixos valores de a_w , pH, temperatura e concentrações elevadas de NaCl. Os autores citados no parágrafo anterior referem que *D. hansenii* tolera bem as condições mencionadas. Mendonça *et al.* (2013) corroboram os autores referidos e indicam que o facto das leveduras se encontrarem em elevado número nos enchidos fermentados poderá sugerir que desempenham um papel importante durante o processo produtivo. Os autores referidos e Durá *et al.* (2004a) sugerem que as leveduras têm um efeito bioprotetor, porque poderão inibir, por exclusão competitiva, o desenvolvimento de microrganismos patogénicos e de alteração.

Flores *et al.* (2015); Corral *et al.* (2015); Mendonça *et al.* (2013); Cano-García *et al.* (2013); Toldrá (2008); Selgas & Garcia (2007) e Simoncini *et al.* (2007) referem que a espécie *D. hansenii* é a que se encontra normalmente em maior número nos enchidos cárneos fermentados, sem qualquer tipo de inoculação (espontaneamente). Romano *et al.* (2006) e Samelis & Sofos (2003), além do género *Debaryomyces* identificaram géneros como *Yarrowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*. Encinas *et al.* (2000) identificaram espécies de *Trichosporon* em carne fresca, *Candida zeylonoides* e *Yarrowia lipolytica* nas etapas iniciais do processo produtivo de enchidos e *D. hansenii* no produto acabado.

As espécies de leveduras mais frequentemente utilizadas como culturas de arranque pertencem ao género *Debaryomyces*: *D. hansenii*, *D. kloeckerii*, *D. cantarellii* e *D. pfaffii* (Lücke, 1998; Fischer, 1994). Por sua vez, Hammes & Hertel (1998) referem que as espécies de leveduras mais utilizadas como culturas de arranque em produtos cárneos são: *D. hansenii* e *Candida famata*. Cano-Garcia *et al.* (2014); Purriños *et al.* (2013); Lauková (2011); Andrade *et al.* (2010) e Selgas & Garcia (2007) indicam *Debaryomyces hansenii* como a espécie mais frequentemente inoculada em enchidos fermentados e apontam um incremento de ésteres e compostos ácidos no produto acabado, aquando da sua

inoculação. Andrade *et al.* (2010) detetaram o aumento de ésteres, álcoois ramificados, aldeídos e alguns compostos voláteis derivados da oxidação lipídica em “salchichón” espanhol. Chaves-López *et al.* (2011); Bolumar *et al.* (2005) e Durá *et al.* (2004a) referem que *D. hansenii* tem elevada atividade proteolítica, capaz de gerar compostos voláteis a partir de aminoácidos de cadeia ramificada, contribuindo deste modo para intensificar o aroma dos enchidos (Corral *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2015; Durá *et al.*, 2004b) e também apresentam atividade lipolítica, mas menos intensa (Vignollo *et al.*, 2015). Flores *et al.* (2015) também referem que a influência das leveduras no aroma dos enchidos decorre da sua capacidade para degradar ácidos orgânicos, principalmente láctico e acético.

Quando as leveduras têm capacidade proteolítica e capacidade de metabolizar o lactato ocorre uma ligeira subida do pH, podendo tornar os enchidos mais adocicados (Toldrá, 2008). E esta ação poderá ser benéfica ou prejudicial, dependendo do valor do pH do produto acabado. Durá *et al.* (2002) referem que a atividade deaminase que *Debaromyces hansenii* tem sobre determinados aminoácidos livres, originando amónia, também poderá conduzir ao aumento do valor de pH.

Leveduras, principalmente *D. hansenii*, podem ser adicionadas à superfície dos enchidos, sozinhas ou em combinação com bolores, formando uma camada protetora que favorece a formação da cor e dificulta a ocorrência de fenómenos de autooxidação prematuros das gorduras devido à produção de catalase. Esta aplicação pode ser feita por imersão ou por pulverização (Galvalisi *et al.*, 2012; Selgas & Garcia, 2007).

2.3.2.4. Bolores

Sunesen & Stahnke (2003) referem que na Europa se utilizam bolores na produção de produtos cárneos e queijos. Leister (1986) refere que a utilização destes microrganismos na produção de enchidos cárneos fermentados remonta a 1730, em Itália, e em 1835 dois talhantes provenientes do país referido introduziram esta técnica na Hungria.

A maioria dos bolores são aeróbios estritos, geralmente multiplicam-se mais rapidamente a temperaturas compreendidas entre 25°C e 30°C, toleram valores de pH entre 2,0 e 9,0, valores de a_w entre 0,61 e 0,99 e concentrações elevadas de NaCl, pelo que são seres mesófilos, ácido resistentes e halotolerantes (Jay, 2005, 1996). A aplicação de bolores como culturas de arranque deverá ser evitada em enchidos fumados, uma vez que os compostos antimicrobianos do fumo impedem a sua multiplicação, ou dificultam-no fortemente (Carrascosa, 2001).

Os bolores têm elevada capacidade para se adaptarem e multiplicarem em diversos substratos, entre os quais se encontram os alimentos (Filtenborg *et al.*, 1996). As condições ambientais às quais os enchidos cárneos fermentados estão sujeitos são bastante favoráveis à multiplicação de bolores à

superfície dos mesmos (Montanha *et al.*, 2018; Lozano-Ojalvo *et al.*, 2015; Bernáldez *et al.*, 2013), principalmente pelos baixos valores de pH e a_w e teores consideráveis de sal.

Berni (2015) e Filtenborg *et al.* (1996) indicam os géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Eurotium* como os predominantes em produtos cárneos.

Em produtos cárneos curados e queijos é frequente ocorrer a multiplicação de fungos à superfície durante o processo de cura, estes podem ter efeitos desejáveis e contribuir, em grande parte, para a formação do sabor, aroma, textura do produto acabado e estabilização da cor (Spotti *et al.*, 2008, Martin *et al.*, 2006, 2005). Para além do referido, os bolores, normalmente em associação com as leveduras, podem criar uma camada branca (flor) que funciona como proteção à ação da luz e do oxigénio e minimiza a ocorrência de uma desidratação excessiva, evitando a formação de crosta superficial. Concomitantemente, inibem o desenvolvimento de bactérias e bolores indesejáveis, estes últimos com capacidade para produzir toxinas (Berni, 2015; Spotti *et al.*, 2008; Fischer, 1994), e devido à capacidade para metabolizarem peróxidos protegem a gordura da oxidação, prevenindo a rancificação (Berni, 2015). Toldrá (2008) refere que na “flor” as espécies mais frequentemente identificadas são *Penicillium nalgiovensis* e *P. chrysogenum* e que aquelas contribuem para a formação do *flavour* devido à sua atividade lipolítica e proteolítica.

A inoculação de bolores realiza-se mediante técnicas de imersão ou pulverização; em ambos os casos utilizam-se suspensões de esporos (Berni, 2015; Bruna *et al.*, 2003; López, 1997; Fischer, 1994). Por se tratarem de microrganismos aeróbios, os bolores destinam-se a ser inoculados nas superfícies de enchidos ou de pernas para fabrico de presunto (Carrascosa, 2001). A multiplicação de bolores - e leveduras em menor número - na superfície dos enchidos cárneos fermentados, de uma forma geral, é espontâneo (Hames & Hertel, 1998).

Para vários autores a utilização de bolores como culturas de arranque na indústria de transformação das carnes deve-se fundamentalmente à possibilidade que estes têm de eliminar estirpes de bolores pertencentes à microbiota ambiental da fábrica e produtoras de micotoxinas (Bernaldéz *et al.*, 2013; Ludmann *et al.*, 2010; Spotti *et al.*, 2008).

O facto das recentes descobertas indicarem a sobrevivência de algumas espécies de bolores, capazes de produzir micotoxinas, na superfície de enchidos, sublinha a importância de se selecionarem como culturas de arranque estirpes que tenham capacidade para competirem com estas, tentando, desta forma, contribuir para a segurança sanitária dos produtos acabados. Os mesmos autores apontam algumas estirpes de *Penicillium nalgiovensis* e *P. chrysogenum* com capacidade para desempenhar aquelas funções (Spotti *et al.*, 2008; Filtenborg *et al.*, 1996; Fischer, 1994).

Berni (2015), Hierro *et al.* (2005) e Bruna *et al.* (2003) referem que a espécie *P. camemberti* também foi usada em enchidos cárneos fermentados, devido à sua capacidade para incrementar as características sensoriais dos mesmos. Contudo, desde o isolamento de ácido ciclopiazónico a partir desta espécie a sua utilização como cultura de arranque foi comprometida, devido à toxicidade daquele ácido.

2.4. Aminas biogénicas

A literacia alimentar dos consumidores leva a que os mesmos sejam cada vez mais exigentes, tornando-se imperativa a ação das entidades nacionais e internacionais no que respeita ao controlo efetivo dos perigos biológicos, físicos, químicos e até nutricionais que, em determinadas concentrações, podem pôr em causa a saúde dos consumidores.

2.4.1. Classificação das aminas biogénicas

As aminas biogénicas são compostos orgânicos azotados que se caracterizam por apresentarem um grupo amino e serem de origem biológica. São bases orgânicas de baixo peso molecular que possuem atividade biológica e que podem ser formadas como resultado da atividade metabólica normal nos animais, plantas e microrganismos, sendo geralmente produzidas pela descarboxilação de aminoácidos livres ou por aminação ou transaminação de aldeídos e cetonas (Stadnik & Dolatowski, 2010; Vidal-Carou *et al.*, 2009).

As aminas biogénicas mais frequentemente encontradas nos alimentos, em função da sua estrutura química, podem ser agrupadas em monoaminas aromáticas [tiramina (TYR) e β -feniletilamina (PHE)], aminas aromáticas heterocíclicas [histamina (HIS) e triptamina (TRP)], diaminas alifáticas [putrescina (PUT) e cadaverina (CAD)] e poliaminas alifáticas [espermidina (SPD), espermina (SPM) e agmatina] (Vidal-Carou *et al.*, 2015; Saaid *et al.*, 2009; Vidal-Carou *et al.*, 2009; Suzzi & Gardini, 2003; Shalaby *et al.*, 1996).

Prester (2016) e Eerola *et al.* (1998) classificam tiramina, histamina, triptamina e β -feniletilamina como aminas biogénicas com propriedades vasoativas.

Singh *et al.* (2012); Latorre-Moratalla *et al.* (2010b) e Miguélez-Arrizado *et al.* (2006) referem que, de uma forma geral, a tiramina, a putrescina, a cadaverina e a histamina são as aminas mais frequentemente detetadas em enchidos cárneos fermentados, produzidos de forma industrial ou artesanal. Por sua vez, Vidal-Carou *et al.* (2015) e EFSA (2011) referem que a tiramina é a amina biogénica mais abundante em enchidos fermentados. Contudo, Vidal-Carou *et al.* (2015) ressaltam que a presença de putrescina e cadaverina é bastante frequente, sendo, no entanto, mais variáveis que a tiramina. No âmbito dos enchidos nacionais, Roseiro *et al.* (2010) e Roseiro *et al.* (2006)

verificaram a prevalência de putrescina e cadaverina em Chouriço Grosso de Estremoz e Borba, IGP, e Painhos de Portalegre, respetivamente. Gomes (2016) e Claro (2009), em variados tipos de enchidos portugueses, de uma forma geral, quantificaram putrescina em concentrações mais pronunciadas.

2.4.2. Formação das aminas biogénicas

Dentro das reações de formação das aminas biogénicas, a descarboxilação de aminoácidos livres em diversos processos metabólicos é a mais frequentemente citada. Ocorre devido à presença de microrganismos com capacidade de produzir enzimas com atividade descarboxilase, a remoção do grupo carboxilo alfa de um aminoácido produz a sua amina correspondente (Silva *et al.*, 2013; Ladero *et al.*, 2010; Claro, 2009). A formação primária de determinadas aminas biogénicas resulta da reação de descarboxilação e através de reações secundárias são formadas as restantes aminas biogénicas (Mariné *et al.*, 1995).

As enzimas descarboxilases responsáveis pela síntese destas aminas biogénicas em alimentos são principalmente de origem bacteriana e frequentemente induzidas por determinadas condições ambientais, como por exemplo pH ácido desfavorável à multiplicação microbiana (Vidal-Carou *et al.*, 2015; Claro, 2009; Mariné *et al.*, 1995). Como tal, o controlo microbiano durante todo o processamento é de extrema importância, de forma a minimizar a formação de aminas biogénicas, salvaguardando ao máximo a segurança alimentar.

De acordo com Vidal-Carou *et al.* (2009), as aminas biogénicas podem ser de origem exógena ou endógena, ou biogénica e natural, respetivamente. Contudo, por vezes, não há uma clara divisão entre estas duas categorias. No primeiro caso, as aminas biogénicas resultam do metabolismo microbiano, através da descarboxilação de aminoácidos precursores, como já foi referido. Dentro deste grupo encontram-se a tiramina, a β -feniletilamina, a histamina, a triptamina, a cadaverina, a putrescina e a agmatina, as quais resultam da descarboxilação da tirosina, da fenilalanina, da histidina, do triptofano, da lisina, da ornitina e da arginina, respetivamente (ver Figura 3 abaixo apresentada).

Por outro lado, as poliaminas naturais têm origem endógena, resultando de processos metabólicos intracelulares, e estão presentes nos alimentos em concentrações não tóxicas, sendo essenciais para diversos organismos vivos. Geralmente, considera-se que as poliaminas alifáticas, espermina e espermidina, são as aminas mais representativas desta categoria (Vidal-Carou *et al.*, 2015; Claro, 2009).

2.4.3. Fatores que influenciam a formação de aminas biogénicas

Na Figura 3 esquematizam-se as estruturas químicas e os mecanismos de formação das aminas biogénicas.

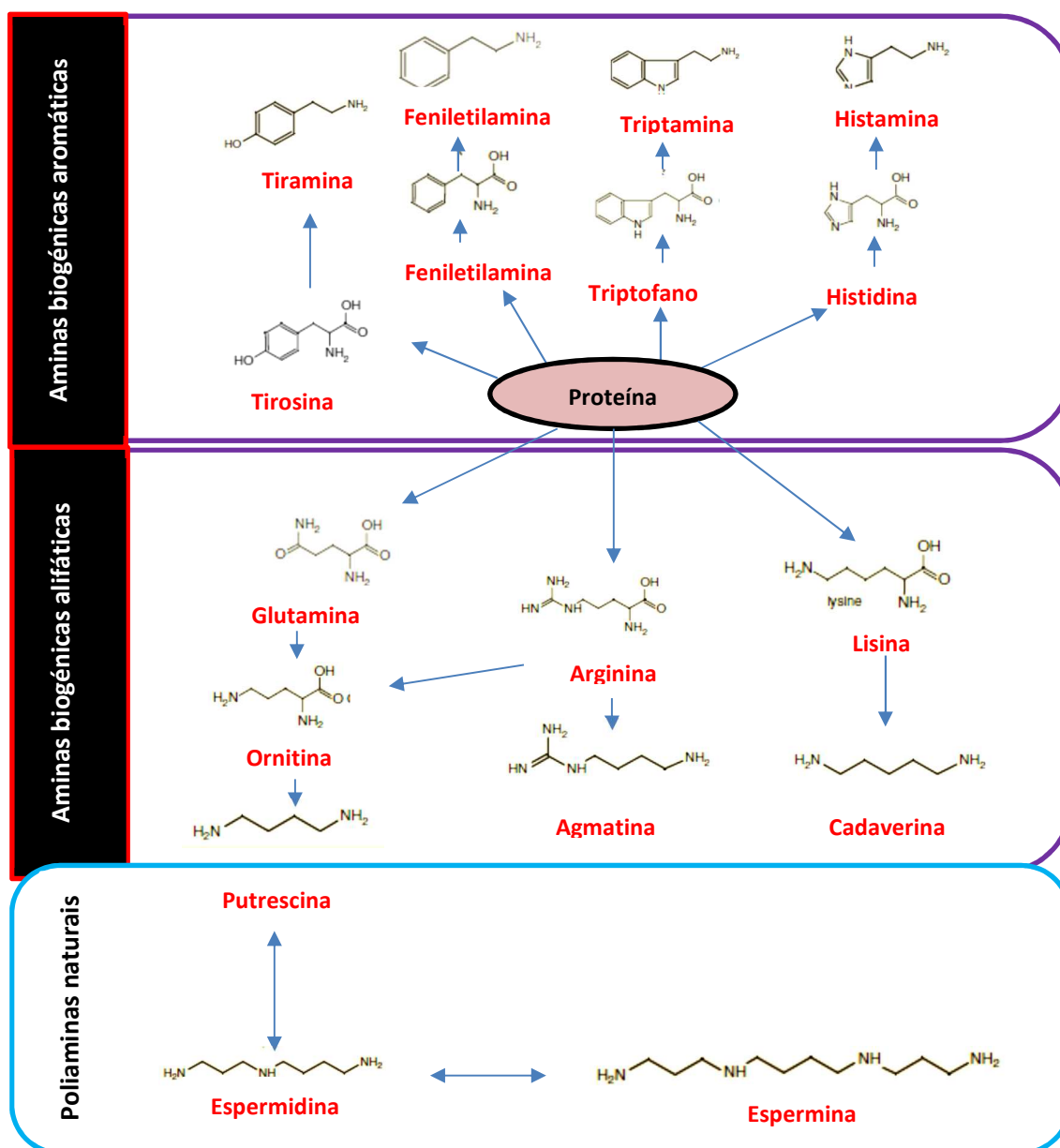


Figura 3 - Estruturas químicas e mecanismos de formação das aminas biogénicas (Vidal-Carou *et al.*, 2015).

Os fatores necessários para a formação de aminas biogénicas nos alimentos estão assegurados pela disponibilidade de aminoácidos livres que servirão de substrato para a formação daqueles compostos, pela presença de microrganismos descarboxilase positivos e por condicionantes que permitam a multiplicação microbiana e a síntese e atividade das descarboxilases (Lorenzo *et al.*, 2017), como por exemplo a disponibilidade de açúcares fermentáveis, a temperatura de armazenamento, humidade relativa (HR), o pH, concentração de NaCl, o potencial redox, a utilização de aditivos (sulfito de sódio e nitrito de sódio), entre outros (EFSA, 2011 e Claro, 2009). Laranjo *et al.* (2016), Latorre-Moratalla *et al.* (2012b) e Claro (2009) referem que o diâmetro dos produtos cárneos tem influência na formação

das aminas biogénicas, verificando-se menor concentração de sal e a_w superior em produtos com maior diâmetro, conseqüentemente, maior diâmetro pode levar ao aumento dos teores de aminas biogénicas, causado pelos processos mais prolongados para que se atinjam valores de a_w que garantam a segurança sanitária dos enchidos, conseqüentemente os produtos de maior calibre estão sujeitos a processos fermentativos e proteolíticos mais extensos.

Os géneros alimentícios fermentados, em geral, e os enchidos cárneos fermentados em particular, dispõem das condições ótimas para a acumulação de aminas biogénicas. Como foi referido no primeiro parágrafo deste ponto, a multiplicação de microrganismos (descarboxilase positivos) e os fenómenos proteolíticos, que ocorrem durante o processo produtivo, conduzem à formação de aminoácidos livres (Jairath *et al.* 2015; Vidal-Carou *et al.*, 2015), suscetíveis de resultarem em aminas biogénicas.

Outro parâmetro que muitas vezes é relacionado com os teores de aminas biogénicas nos produtos é o pH. Vidal-Carou *et al.* (2015) e EFSA (2011) referem que o pH reduzido inibe o desenvolvimento da microbiota envolvida na aminogénese, porém, favorece, simultaneamente, a atividade das enzimas descarboxilases por forma a neutralizar as condições desfavoráveis que surgem em meio ácido. Autores como González-Fernández *et al.* (1997) e Maijala & Eerola (1993) reportaram valores diretamente proporcionais para os parâmetros em análise, enquanto Maijala *et al.* (1995) reportaram o inverso. Santos (1996) refere que valores de pH compreendidos entre 4 e 5,5 são ótimos para que ocorra descarboxilação. O pH poderá sofrer alterações causadas pela adição de açúcares, todavia, segundo González-Fernández *et al.* (2003) os teores de aminas biogénicas também poderão sofrer alterações, pelo simples facto de ocorrer uma alteração da população microbiana. Em condições normais a adição de açúcar fermentescível favorecerá a multiplicação das bactérias lácticas que são conhecidas pela capacidade de competir como microrganismos indesejáveis com capacidade descarboxilase positiva (Vidal-Carou *et al.*, 2015). Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero (2004) apontaram os 3% como o valor de glucose adicionada a partir do qual ocorre uma redução pronunciada de enzimas descarboxilases e consideram valores compreendidos entre 0,5% e 2% como sendo os ótimos para a formação das referidas enzimas.

O potencial redox do meio também influencia os teores de aminas biogénicas, a redução do mesmo favorece a formação de histamina e a atividade descarboxilativa da histidina parece ser inativada ou destruída na presença de oxigénio (Karovičová & Kohajdová, 2005).

Latorre-Moratalla *et al.* (2012b) referem que elevadas concentrações de aminas biogénicas em alimentos têm sido usadas como um “índice” da atividade microbiana indesejável, resultante de práticas de higiene, fabrico e/ou armazenagem inadequadas. Posto isto, a higiene e segurança das

matérias-primas e restantes ingredientes utilizados nas formulações e a seleção de estirpes, quando inoculadas às massas de enchidos, são fatores cruciais para reduzir a produção daqueles compostos (Latorre-Moratalla *et al.*, 2012a). Os mesmos autores identificaram concentrações superiores de aminas biogénicas em enchidos fatiados, face a enchidos inteiros.

Outro fator que pode afetar a formação de aminas biogénicas é a fumagem. Gomes (2016) registou maiores concentrações de aminas biogénicas em produtos secados com recurso a câmara de cura, contrariamente a Roseiro *et al.* (2010) que quantificaram maiores níveis destes compostos quando o processo decorreu em fumeiros tradicionais, por oposição aos processados levados a cabo exclusivamente em câmara de cura. Elias e Carrascosa (2010) associaram maiores teores de azoto básico volátil total e proteólise a processos de fumagem mais intensos. Já Martuscelli *et al.* (2009), registaram maiores níveis de aminoácidos livres e aminas biogénicas nos produtos “não fumados” ou “moderadamente fumados”, comparativamente aos que foram sujeitos a um regime de fumagem intensa. A ação da fumagem pode desempenhar, por isso, um papel importante no que se refere ao controlo da microbiota contaminante (com capacidade descarboxilativa) como resultado do efeito antimicrobiano do fumo (Djinovic *et al.*, 2008).

A propósito da ação da temperatura sobre a formação de aminas biogénicas, Maijala *et al.* (1995) constataram que, para aminas biogénicas, aquela relação nem sempre é linear. Aqueles autores verificaram que na presença de bactérias lácticas descarboxilase-negativas, usadas como culturas de arranque, os produtos processados a temperatura mais elevada continham níveis de aminas inferiores. Karovičová & Kohajdová (2005) apontam valores compreendidos entre os 20°C e os 37°C como ótimos para atividade aminogénica, diminuído a temperatura para valores inferiores a 20°C está-se a minorar a dita atividade. A putrescina e a cadaverina, por ação das temperaturas elevadas, por exemplo, na fumagem de enchidos, podem ciclizar e serem convertidas em pirrolina e piperidina, respetivamente, resultando na formação de *N*-nitrosaminas (Drabik-Markiewicz *et al.*, 2011).

Vidal-Carou & Latorre-Moratalla (2014) reforçam que a utilização de culturas de arranque sem capacidade aminogénica contribuíram de forma efetiva para a redução de aminas biogénicas, nos últimos anos, em enchidos fermentados.

As boas práticas recomendam o armazenamento dos produtos acabados a temperaturas de refrigeração, todavia, Kameník *et al.* (2012) referem que desde que as boas práticas de fabrico e higiene sejam cumpridas em todas as fases do processo não existe risco para o consumidor se os enchidos forem mantidos a temperaturas até 15 °C, ou seja, os teores de aminas biogénicas não sofrerão incrementos significativos.

Autores como Bover-Cid *et al.* (1999) apontam as especiarias como tendo capacidade para se tornarem veículos para microrganismos potencialmente aminogénicos ou, eventualmente, para enzimas aminoácido-descarboxilase em enchidos, especialmente pimenta e alho em pó (Latorre-Moratalla *et al.*, 2007). Nesta última especiaria foram detetados altos níveis de tiramina e níveis mais baixos de feniletilamina, mas a sua contribuição para o conteúdo total de aminas biogénicas não é significativa, porque é adicionado às formulações em pequenas percentagens (Simion *et al.* 2014).

2.4.4. Microrganismos produtores de aminas biogénicas em géneros alimentícios

A utilização de microrganismos com fins tecnológicos tem sido usada ao longo dos tempos. Contudo, alguns microrganismos têm uma longa história de utilização enquanto outros são menos conhecidos, podendo representar um potencial perigo para os consumidores.

Aspetos relacionados com a segurança alimentar, como a produção de enterotoxinas e de aminas biogénicas, bem como a capacidade de degradar aminas biogénicas, devem ser fatores a considerar na seleção de estirpes de cocos Gram-positivo, coagulase negativa, adequadas para serem utilizadas como culturas de arranque.

De acordo com EFSA (2011) a produção de putrescina e cadaverina está particularmente associada a *Enterobacteriaceae* e a tiramina a *Enterococcus*.

Lactobacillus buchneri, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. hilgardii*, *Carnobacterium piscicola* e *C. divergens* têm sido identificadas como microrganismos descarboxilase positivos e conseqüentemente produtores de aminas biogénicas (Suzzi & Gardini, 2003). Bover-Cid & Holzapfel (1999) referem que os géneros *Enterococcus*, *Carnobacterium* e alguns géneros de *Lactobacillus*, particularmente *L. buchneri*, *L. brevis* e *L. curvatus* são os géneros com maior capacidade para produzir tiramina em alimentos fermentados, como é o caso dos enchidos cárneos fermentados.

Vidal-Carou *et al.* (2007) referem que feniletilamina e triptamina são as aminas que aparecem em menores concentrações em enchidos fermentados e a sua acumulação parece estar condicionada por teores elevados de tiramina associados a determinados LAB ou ECN.

Singh *et al.* (2012) referem que a utilização de *L. sakei* é mais adequada para reduzir a produção de aminas biogénicas em produtos cárneos que *L. curvatus*.

Linares *et al.* (2011); Talon & Leroy (2011) e Latorre-Moratalla *et al.* (2010a) apontam estirpes de *L. sakei* e *L. plantarum* como tendo baixa capacidade descarboxilase positiva, conseqüentemente menores produtoras de aminas biogénicas.

2.4.5. Aminas biogénicas nos géneros alimentícios e as suas implicações para a saúde humana

A FAO/WHO (2013) alerta para o facto do pescado e seus derivados serem a principal causa de toxinfecções alimentares originadas por histamina.

De acordo com a EFSA (2011), na Europa, dos 58 casos notificados em 2011 (com um total de 262 intoxicações), 56 surgiram após o consumo de pescado ou dos seus derivados.

Shalaby (1996) refere que a presença de aminas biogénicas nos alimentos, como a cadaverina, putrescina, espermidina, histamina, agmatina, tiramina e fenetilamina, têm consequências para a saúde dos consumidores, porque a sua ingestão pode originar alergias. Suzzi & Gardini (2003) referem que a ingestão deste tipo de aminas - referidas por Shalaby (1996) - pode originar problemas gástricos, intestinais, alterações do sistema nervoso e aumento da pressão arterial.

Atendendo à conhecida toxicidade de tiramina e histamina, Linares *et al.* (2016) estudaram *in vitro* a citotoxicidade das aminas mencionadas em células intestinais humanas. Os autores concluíram que tiramina (301,8 mg/kg) apresentou maior capacidade para induzir citotoxicidade do que histamina (440,6 mg/kg) nas células intestinais. Curiosamente, os *endpoints* observados foram diferentes: tiramina causou necroses e histamina induziu a apoptose. Já del Rio *et al.* (2017), também num estudo realizado *in vitro*, concluíram que as aminas em discussão podem interagir exercendo efeito sinérgico em células intestinais humanas em concentrações acima de 219,49 mg/kg de tiramina e 1445 mg/kg de histamina.

EFSA (2011) refere que as aminas alifáticas são geralmente menos tóxicas, apesar de poderem potenciar a toxicidade de outras aminas, principalmente a histamina. Sun *et al.* (2016); EFSA (2011) e Hotchkiss *et al.* (1997) referem que, por exemplo, putrescina e cadaverina podem contribuir para a formação de nitrosaminas. As nitrosaminas têm atividade carcinogénica para o Homem. De acordo com Vidal-Carou (2015) as nitrosaminas podem formar-se através da reação dos nitritos com aminas secundárias (R_2NH).

Santos (1996) refere que a reação de agentes nitrosos com aminas primárias produz espécies alcalinizantes de vida curta, que reagem com outros componentes da matriz dos alimentos para gerar produtos isentos de atividade tóxica, mesmo em concentrações elevadas. No entanto, as aminas primárias, como a cadaverina e a putrescina, podem converter-se em secundárias, não só pela ação do calor, mas também à temperatura ambiente durante a maturação e armazenamento dos enchidos (Eerola *et al.*, 1997). Shalaby (1996) refere que a putrescina e a cadaverina são convertidas em pirrolidina e piperidina, respetivamente, a partir das quais se formam *N* - nitrosopirrolidina (NPYR) e *N* - nitrosopiperidina.

A gravidade dos sintomas clínicos ocasionados pelas aminas biogénicas depende de fatores como a quantidade e variedade ingeridas, a suscetibilidade individual e o nível de atividade de desintoxicação do intestino (Ladero *et al.*, 2010).

Na Tabela 6 são apresentados os efeitos fisiológicos e toxicológicos das principais aminas exógenas presentes em enchidos cárneos fermentados: histamina, tiramina, β -feniletilamina, triptamina, putrescina e cadaverina.

Tabela 6 - Efeitos fisiológicos e toxicológicos das aminas biogénicas.

Amina Biogénica	Efeito fisiológico	Efeito toxicológico
Histamina¹	Neurotransmissor, secreção de ácido gástrico, crescimento e diferenciação celular, regulação do ritmo circadiano, temperatura corporal, ingestão de alimentos, aprendizagem e memória, resposta imune e reações alérgicas	Dores de cabeça, suores, secreção nasal, rubor facial, tonturas, erupções cutâneas, prurido, edema (pálpebras), urticária, dificuldade em engolir, diarreia, desconforto respiratório, broncospasmo, aumento do débito cardíaco, taquicardia e distúrbios da pressão arterial
Tiramina¹	Neurotransmissor, vasoconstrição periférica, aumento do débito cardíaco, aumentar a respiração, elevar a glicemia e liberação de noradrenalina	Aumento da pressão arterial por vasoconstrição periférica, aumento do débito e da força cardíaca, ação hiperglicémica, dores de cabeça, enxaquecas, distúrbios neurológicos, náuseas, vômitos e doenças respiratórias
β-feniletilamina²	Libertação de noradrenalina	Aumento da pressão arterial, vasoconstrição periférica e derrames
Triptamina^{1,2}	Neurotransmissor	Aumento da pressão arterial e vasoconstrição
Putrescina¹	Regulação intestinal, estabilização das membranas celulares, crescimento e diferenciação celular	Hipotensão, taquicardia e propriedades carcinogénica
Cadaverina²	-----	Potenciar o efeito de outras aminas, hipotensão, bradicardia e parestesia das extremidades

¹Ladero *et al.* (2010); ²Shalaby (1996)

2.4.6. Limites para a presença de aminas biogénicas em géneros alimentícios e principais métodos utilizados na determinação de aminas biogénicas em enchidos

Importa referir que de acordo com a legislação vigente histamina é a única amina biogénica com regulamentação jurídica estabelecida na Europa para algumas espécies de peixes e produtos derivados, não existindo legislação para os produtos cárneos. O Regulamento (CE) N.º 1441/2007, da Comissão de 5 de dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) N.º 2073/2005, da Comissão de

15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, adota as normas sanitárias relativas à produção e colocação no mercado dos produtos da pesca e estabelece o valor máximo permitido de histamina (mg/kg). Este regulamento, para os produtos da pesca de espécies associadas a um elevado teor de histidina (particularmente as famílias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* e *Scombrosidae*) indica que o teor médio de histamina por cada lote de peixes ($n = 9$) não poderá ultrapassar 100 mg/kg, podendo duas das nove amostras apresentar teores entre 100 e 200 mg/kg, mas nenhuma amostra poderá exceder os 200 mg/kg. Os resultados só serão considerados satisfatórios quando se cumprirem estas três condições. Para os produtos da pesca que tenham sido submetidos a um tratamento de maturação enzimática em salmoura e fabricados a partir das espécies anteriormente referidas o teor médio de histamina por cada lote de peixes ($n = 9$) não poderá ultrapassar 200 mg/kg, podendo duas das nove amostras apresentar teores entre 200 e 400 mg/kg, mas nenhuma amostra poderá exceder os 400 mg/kg. Os resultados só serão considerados satisfatórios quando se cumprirem estas três condições.

Não há um consenso sobre a dose mínima de histamina que pode provocar efeitos toxicológicos nos consumidores. EFSA (2011) refere que dos casos notificados - 58 - a concentração variava de 5 a 5000 mg/kg. A mesma entidade refere que esta variabilidade só tem explicação devido à presença de amins provenientes de outros géneros alimentícios ou deficiências na metabolização desta amina. Com base nos resultados obtidos, esta entidade recomenda a ingestão máxima desta amina de 25-50 mg por refeição. FAO/WHO (2013) fixa o valor de 50 mg como máximo.

Porém, vários autores desenvolveram metodologias que pretendem associar os níveis de amins biogénicas à qualidade e frescura dos produtos. Mietz e Karmas (1977) foram pioneiros no desenvolvimento de uma metodologia denominada de *Biogenic Amine Index* (BAI) que em português significa “Índice de Amins Biogénicas”. Basicamente os autores desenvolveram uma equação matemática que procurava relacionar as concentrações de histamina, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina com a qualidade e frescura de peixe e produtos da pesca.

$$\text{A equação é a seguinte: } \text{BAI} = \frac{[\text{Hist}] + [\text{Put}] + [\text{Cad}]}{1 + [\text{Esp}] + [\text{Espd}]}$$

Hist - histamina

Put - putrescina

Cad - cadaverina

Esp - espermina

Espd - espermidina

Valores de BAI > 10 indicavam produtos impróprios para consumo. Por outro lado, BAI entre 1 e 10 representada alguma deterioração do produto e BAI < 1 era sinónimo de produtos de elevada qualidade.

Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero (2004) referem que a utilidade das aminas biogénicas como índice de qualidade dependerá da natureza do produto. Os resultados tendem a ser mais satisfatórios em carnes frescas e produtos tratados termicamente do que em produtos fermentados, ou seja, nestes últimos parecem ser de uso muito limitado. Vidal-Carou *et al.* (2009) corroboram o referido, uma vez que a formação de aminas biogénicas não está direta e exclusivamente associada à qualidade das matérias-primas utilizadas mas, como mencionado em parágrafos supracitados, relacionada com a ação dos microrganismos que levam a cabo a fermentação dos produtos, entre outros fatores.

Outros autores apresentaram metodologias para produtos da pesca, mas também para produtos cárneos que se baseavam na concentração de uma (Vinci & Antonelli, 2002) ou várias aminas biogénicas (Veciana-Nogués *et al.*, 1997). Jørgensen *et al.* (2000) calculavam o BAI com recurso à combinação da concentração de várias aminas biogénicas e outros parâmetros como o pH.

Stadnik & Dolatowski (2010) indicam que, tendo em conta o aumento considerável de tiramina durante o armazenamento da carne e dos produtos cárneos, a mesma deverá entrar nos cálculos do BAI. Wortberg & Woller (1982) referem que o somatório de tiramina, cadaverina, putrescina e histamina não deverá ultrapassar 500 mg/kg na produção de enchidos da região de Bolonha.

Hernández-Jover *et al.* (1996) indicam um valor de BAI inferior a 5 mg/kg como o mais aceitável para carne fresca. Se o índice apresentar concentrações entre 20 a 50 mg/kg ou superior a 50 mg/kg corresponderá a carne de qualidade reduzida e deteriorada, respetivamente.

Nout (1994) propôs 50 a 100 mg/kg para histamina e 100 a 800 mg/kg para a tiramina como valores aceitáveis para produtos fermentados.

Tasić *et al.* (2012) citam vários autores e apontam valores superiores a 1000 mg/kg como perigosos para a saúde dos consumidores e sugerem teores para algumas aminas que evidenciam o cumprimento das boas práticas de higiene e fabrico: 100 a 800 mg/kg para tiramina, 50 a 100 mg/kg para histamina, < 30 mg/kg para β -feniletilamina e valores menores que 200 mg/kg para o somatório das aminas vasoativas (histamina, tiramina, triptamina e β -feniletilamina) como sendo uma forma de avaliar as boas práticas de higiene e fabrico. Lee & Lee (2015) também apontaram 1000 mg/kg como limite para o teor total de aminas biogénicas, acima daquele valor são consideradas perigosas para a saúde dos consumidores.

Nuñez *et al.* (2016) referem que, para adultos saudáveis, alimentos que contenham mais de 500 mg/kg de histamina e 1000 mg/kg de tiramina são considerados tóxicos ou suscetíveis de pôr em causa a saúde do consumidor.

A metodologia utilizada pela maioria dos autores para a determinação de aminas biogénicas foi a *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), em português cromatografia líquida de alta eficiência (Laranjo *et al.*, 2016; Domínguez *et al.*, 2016; Simion *et al.*, 2014; Latorre-Moratalla *et al.*, 2014; Latorre-Moratalla *et al.*, 2012; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010; Roseiro *et al.*, 2010). Contudo, Önal *et al.* (2013) referem que apesar do HPLC ser mais comumente utilizado nos centros de investigação mundiais, *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC), em português cromatografia líquida de ultraeficiência, é uma técnica que acenta nos mesmos princípios que o HPLC, mas é mais rápida, mais sensível e de maior resolução. A justificação para estes equipamentos serem menos utilizados prende-se, principalmente, com os custos elevados da sua aquisição.

2.4.7. Teores de aminas biogénicas em enchidos

Na Tabela 7 apresentam-se resultados referentes aos teores de aminas biogénicas em enchidos, obtidos em diversos países, diferentes produtos e por vários autores.

Tabela 7 - Teores de aminas biogénicas em enchidos (produto acabado).

Aminas (mg/kg de enchido)												
País	Referência	Produto	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina	Vasoativas	Total
Portugal	Laranjo <i>et al.</i> (2017a)	Chouriço Preto (6% NaCl)	ND	38,62 $\pm 4,55^2$	265,36 $\pm 16,03^2$	ND	ND	ND	7,24 $\pm 1,58^2$	0,31 $\pm 0,00^2$	19,31 $\pm 21,64^2$	291,41 $\pm 30,58^2$
Portugal	Laranjo <i>et al.</i> (2017a)	Paio Preto (6% NaCl)	30,68 $\pm 2,28^2$	12,43 $\pm 1,35^2$	81,01 $\pm 24,33^2$	47,61 $\pm 10,95^2$	ND	123,53 $\pm 7,76^2$	6,48 $\pm 1,36^2$	34,18 $\pm 3,39^2$	164,15 $\pm 9,57^2$	332,13 $\pm 15,67^2$
Portugal	Laranjo <i>et al.</i> (2016)	Catalão (6% NaCl)	117,22 $\pm 29,04^2$	ND	4,43 $\pm 2,44$	103,36 $\pm 10,81^2$	5,86 $\pm 1,06^2$	43,31 $\pm 12,47^2$	53,22 $\pm 36,33^2$	50,62 $\pm 3,50^2$	166,39 $\pm 22,80^2$	378,01 $\pm 59,01^2$
Portugal	Laranjo <i>et al.</i> (2016)	Salsichão (6% NaCl)	119,87 $\pm 7,05^2$	ND	ND	83,34 $\pm 41,62^2$	9,04 $\pm 0,59^2$	122,62 $\pm 9,39^2$	6,39 $\pm 1,35^2$	48,90 $\pm 2,43^2$	251,52 $\pm 51,86^2$	390,14 $\pm 125,06^2$
Portugal	Gomes (2016)	Chouriço de Carne de Trás-os-Montes	4,52 ¹	2,86 ¹	103,03 ¹	160,63 ¹	11,18 ¹	133,24 ¹	8,00 ¹	48,85 ¹	151,81 ¹	472,31 ¹
Portugal	Gomes (2016)	Salpicão de Trás-os-Montes	10,69 ¹	9,93 ¹	125,57 ¹	99,60 ¹	70,10 ¹	226,95	8,19 ¹	54,01 ¹	317,67 ¹	605,04 ¹
Portugal	Gomes (2016)	Chouriço de Carne do Alentejo	38,69 ¹	4,90 ¹	529,47 ¹	355,34 ¹	163,10 ¹	285,97 ¹	9,97 ¹	56,88	492,67 ¹	317,67 ¹
Portugal	Gomes (2016)	Painho do Alentejo	57,27 ¹	15,12 ¹	998,38 ¹	908,81 ¹	277,91 ¹	385,53 ¹	9,62 ¹	57,32 ¹	735,83 ¹	2709,96 ¹
Roménia	Simion <i>et al.</i> (2014)	Enchidos cárneos fermentados	48,28 $\pm 1,66^2$	85,20 $\pm 4,07^2$	49,94 $\pm 7,81^2$	90,65 $\pm 3,56^2$	21,45 $\pm 2,15^2$	141,35 $\pm 15,15^2$	6,51 $\pm 0,00^2$	30,68 $\pm 7,12^2$	296,18 ¹	474,88 $\pm 22,74^2$
Espanha	Bover-Cid <i>et al.</i> (2014)	Enchidos cárneos fermentados	ND	ND	94,05 $\pm 24,41^2$	40,55 $\pm 13,52^2$	32,15 $\pm 14,22^2$	180,95 $\pm 25,34^2$	ND	ND	213,10 ¹	253,65 ¹

Tabela 7 (continuação) – Teores de aminas biogénicas em enchidos (produto acabado).

País	Referência	Produto	Aminas (mg/kg de enchido)									Total
			Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina	Vasoativas	
Sérvia	Tasić <i>et al.</i> (2012)	Enchidos cárneos fermentados (amostra A1)	14,7 $\pm 0,68^2$	51,6 $\pm 2,58^2$	5,54 $\pm 0,00$	ND	ND	ND	ND	41,5 $\pm 2,09^2$	66,30 ¹	113,34 ¹
Grécia	Papavergou <i>et al.</i> (2012)	Enchidos cárneos fermentados	7,34 $\pm 11,85^2$	5,12 $\pm 7,44^2$	118,49 $\pm 116,41$	43,34 $\pm 127,53^2$	81,49 $\pm 139,37^2$	199,20 $\pm 132,26^2$	2,86 $\pm 1,34^2$	26,20 $\pm 4,76^2$	293,15 ¹	484,04 ¹
Grécia	Papavergou (2011)	Enchidos cárneos fermentados	14,27 $\pm 17,61^2$	6,71 $\pm 3,98^2$	187,86 $\pm 144,94^2$	94,19 $\pm 213,62^2$	89,07 $\pm 101,55^2$	164,95 $\pm 98,08^2$	6,71 $\pm 3,98^2$	36,63 $\pm 10,30^2$	275,00 ¹	600,39 ¹
Portugal	Roseiro <i>et al.</i> (2010)	Chouriço Grosso de Estremoz e Borba (IGP)	5,6 ¹	33,2 ¹	751,6 ¹	710,6 ¹	14,4 ¹	359,3 ¹	4,9 ¹	82,4 ¹	412,50 ¹	1962,1 ¹
Portugal	Claro (2009)	Chouriço de Carne (Barrancos)	53,68 ¹	ND	514,17 ¹	69,75 ¹	ND	208,07 ¹	38,21 ¹	23,62 ¹	261,75 ¹	1169,25
Portugal	Claro (2009)	Chouriço de Carne (Alentejo)	152,24 ¹	ND	ND	25,96	ND	97,34 ¹	59,23 ¹	31,44 ¹	249,58 ¹	366,21
Portugal	Claro (2009)	Chouriço de Carne (Beja)	157,57 ¹	50,40 ¹	527,38 ¹	527,03 ¹	591,70 ¹	360,27 ¹	51,95 ¹	27,08 ¹	1159,94	2293,38
Portugal	Claro (2009)	Chouriço de Portalegre (IGP)	378,99 ¹	ND	265,64 ¹	228,78 ¹	ND	275,60 ¹	71,41 ¹	22,86 ¹	654,59	1243,28
Portugal	Claro (2009)	Linguiça Transmontana	NQ	65,25 ¹	76,57 ¹	97,68 ¹	ND	102,09 ¹	ND	9,56	-----	-----
Portugal	Claro (2009)	Chouriço de porco preto	NQ	86,12 ¹	141,71 ¹	25,40 ¹	33,66 ¹	68,18 ¹	ND	18,37 ¹	-----	-----

Tabela 7 (continuação) - Teores de aminas biogénicas em enchidos (produto acabado).

Aminas (mg/kg de enchido)												
País	Referência	Produto	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina	Vasoativas	Total
Portugal	Claro (2009)	Chouriço de Carne	NQ	240,19 ¹	228,97 ¹	100,05 ¹	ND	94,74 ¹	87,25 ¹	18,45 ¹	-----	-----
Portugal	Claro (2009)	Chouriço aldeão	NQ	196,65 ¹	26,70 ¹	87,00 ¹	195,33 ¹	93,84 ¹	76,05 ¹	21,42 ¹	-----	-----
Itália	Favaro <i>et al.</i> (2007)	Sopressa (enchido cárneo fermentado típico da Itália)	NQ	NQ	231,00 ¹	66,00 ¹	ND	214,00 ¹	2,00 ¹	17,00 ¹	-----	-----
Itália	Favaro <i>et al.</i> (2007)	Enchidos cárneos fermentados	NQ	NQ	144,00 ¹	81,00 ¹	57,00 ¹	273,00 ¹	2 ¹	18 ¹	-----	-----
Portugal	Roseiro <i>et al.</i> (2006)	Painho de Portalegre	15,10 ¹	24,30 ¹	779,40 ¹	1253,90 ¹	9,50 ¹	311,20 ¹	5,70 ¹	23,10 ¹	360, 10	2171,5

¹ Média

² Média \pm Desvio padrão

ND - Não detetado

NQ - Não quantificado

O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina.

2.4.8. Efeito das culturas de arranque na produção de amins biogénicas em enchidos

Nos últimos 30 anos, os estudos envolvendo as amins biogénicas em produtos cárneos tinham como principal objetivo aferir o estado higiénico das carnes. Porém, o paradigma alterou-se e atualmente a questão da segurança alimentar - efeitos toxicológicos - associada às amins biogénicas é fulcral. Desta forma, todos os esforços serão benéficos para se conseguirem reduzir os teores daqueles compostos (Latorre-Moratalla *et al.*, 2010b).

Os produtos fermentados em geral, e os cárneos fermentados em particular, constituem um dos principais grupos de alimentos onde as amins biogénicas têm sido identificadas (Latorre-Moratalla *et al.*, 2008; Suzzi & Gardini, 2003). Latorre-Moratalla *et al.* (2010b) referem que atualmente a indústria e os produtores que fabricam enchidos tradicionais estão focados em reduzir ao máximo a presença de amins biogénicas em enchidos, como tal, o reforço das boas práticas de higiene desde a receção das matérias-primas até à expedição dos produtos acabados é fulcral. No entanto, este reforço poderá não ser suficiente, logo, a utilização de culturas de arranque poderá fornecer um contributo importante para se atingir este “objetivo comum”. Vidal-Carou & Latorre-Moratalla (2014) referem que nos últimos anos a utilização de culturas de arranque sem capacidade aminogénica contribuíram de forma efetiva para a redução dos teores de amins biogénicas em enchidos fermentados.

De acordo com o descrito nos pontos 2.4.2. e 2.4.3. podemos facilmente constatar que na seleção de culturas de arranque a inocular na formulação dos enchidos, devemos dar particular atenção à capacidade dos microrganismos produzirem enzimas com atividade descarboxilase positiva, evitando o uso de microrganismos com esta característica. Por outro lado, as culturas a inocular deverão, preferencialmente, ser autóctones ou indígenas, ou como é uso designá-las na linguagem de indústria “flora da casa”, ou seja, os microrganismos fermentadores são originários da carne, gordura ou do ambiente fabril onde pretendemos efetuar as inoculações, pois estes estão adaptados ao ambiente fabril o que lhes permite competir com a restante microbiota. Além disso, as condições em que decorre o processo produtivo - tempos, temperaturas, concentrações de NaCl, o pH e recurso a fumagem tradicional, ou não - também são fundamentais.

Baka *et al.* (2011) e Gücükoğlu & Küplülü (2010) verificaram a capacidade que as culturas de arranque têm para reduzir a formação de amins biogénicas. O mesmo se passou com Bover-Cid *et al.* (2001b), no estanto, estes referem que de uma forma geral as culturas de arranque que contêm apenas culturas puras de *Staphylococcus* têm menor capacidade para reduzir a produção de amins biogénicas que as culturas mistas, contendo *Lactobacillus* (em particular,

culturas que contenham espécies como *L. sakei* ou *L. plantarum*) e outro género microbiano (Baka *et al.*, 2011; Tosukhowong *et al.*, 2011).

Latorre-Moratalla *et al.* (2010b) referem que a utilização de culturas mistas promove uma redução superior de amins biogénicas, quando comparada com a utilização de estirpes isoladas. Os mesmos autores verificaram que, quando adicionaram *S. equorum* em enchidos, os teores de cadaverina reduziram-se em 45%, reduzindo-se em 75% quando inocularam *L. sakei*. No entanto, quando conjugaram as duas estirpes referidas, conseguiram reduzir a cadaverina em 89%.

Gücüköglü & Küplülü (2010) e Ayan *et al.* (1999) inocularam culturas comerciais e conseguiram reduzir os teores de amins biogénicas, todavia, autores como Casquete *et al.* (2011a) e Latorre-Moratalla *et al.* (2010) obtiveram reduções mais pronunciadas quando usaram culturas autóctones.

Na Tabela 8 apresentam-se mais alguns exemplos recolhidos da literatura, onde se pode verificar a capacidade das culturas de arranque para reduzirem a produção de amins biogénicas. Apresentam-se valores (%) para tiramina, putrescina, cadaverina e histamina por serem as mais frequentemente encontradas em enchidos cárneos fermentados.

Tabela 8 - Efeito das culturas de arranque na redução dos teores (%) de amins biogénicas em enchidos.

Produto	Referência	Cultura de arranque	Redução de amins biogénicas (%) em comparação com amostras não inoculadas (produtos acabados)			
			TI	PU	CA	HI
Enchidos espanhóis produzidos com carne de cavalo e gordura de porco	Domínguez <i>et al.</i> (2016)*	<i>S. carnosus</i> + <i>S. xylosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	ND	ND	2,7	8
		<i>D. ansenii</i> + <i>S. xylosus</i>	ND	ND	3,5	ND
		<i>P. pentosaceus</i> + <i>S. xylosus</i>	ND	20	15	ND
Enchidos fermentados chineses com um processo tecnológico semelhante ao do Sul da Europa	Wang <i>et al.</i> (2015)	T-SPX: <i>P. pentosaceus</i> + <i>S. xylosus</i> (10 ⁶ ufc/g)	NQ	NQ	NQ	6
		SM-194: <i>P. pentosaceus</i> + <i>L. sakei</i> + <i>S. xylosus</i> + <i>S. carnosus</i> + <i>D. hansenula</i> (10 ⁶ ufc/g)	NQ	NQ	NQ	60
		SM-181: <i>L. sakei</i> + <i>S. xylosus</i> (10 ⁶ ufc/g)	NQ	NQ	NQ	94
Enchidos fermentados romenos	Simion <i>et al.</i> (2014)	<i>L. sakei</i> CECT5764 (10 ⁷ ufc/g) + <i>S. equorum</i> SA25 (10 ⁷ ufc/g)	56	8	48	18
		<i>L. sakei</i> CECT5764 (10 ⁷ ufc/g) + <i>Staphylococcus equorum</i> SA25 (10 ⁷ ufc/g) + <i>L. acidophilus</i> CECT903 (10 ⁸ ufc/g)	59	47	59	29
Enchidos fermentados gregos	Baka <i>et al.</i> (2011)	<i>L. sakei</i> 4413 (2-5x10 ⁷ ufc/g)	13	72	60	ND
		<i>L. sakei</i> 8426 (2-5x10 ⁷ ufc/g)	ND	ND	25	ND
		<i>L. plantarum</i> 7423 (2-5x10 ⁷ ufc/g)	ND	ND	26	ND
		<i>L. curvatus</i> 8427 (2-5x10 ⁷ ufc/g)	9	29	ND	ND
Salsichão espanhol	Casquete <i>et al.</i> (2011b)	<i>P. acidilactici</i> MS200 + <i>S. vitulus</i> RS34 (Fermentação: 3 dias/4°C/70% HR; Cura: 90 dias/7-12 °C/70% HR) (5x10 ⁷ ufc/g)	38	ND	77	74
		<i>P. acidilactici</i> MS200 + <i>S. vitulus</i> RS34 (Fermentação: 3 dias/8 °C/75% HR; Cura: 65 dias /12 °C/70% HR) (5x10 ⁷ ufc/g)	70	89	64	82
		<i>P. acidilactici</i> MS198 + <i>S. vitulus</i> RS34 (Fermentação: 3 dias /4°C/70%HR; Cura: 90 dias /7-12 °C/70% HR) (5x10 ⁷ ufc/g)	17	ND	65	21
		<i>P. acidilactici</i> MS198 + <i>S. vitulus</i> RS34 (Fermentação: 3 dias /8°C/75% HR; Cura: 65 dias /12 °C/70% HR) (5x10 ⁷ ufc/g)	ND	72	71	58

ND - Não detetado. NQ - Não quantificado. * Os autores não indicaram a concentração inoculada.

Tabela 8 (continuação) - Efeito das culturas de arranque na redução dos teores (%) de amins biogénicas em enchidos.

Produto	Referência	Cultura de arranque	Redução de amins biogénicas (%) em comparação com amostras não inoculadas (produtos acabados)			
			TI	PU	CA	HI
Salchichón espanhol	Ruiz-Moyano <i>et al.</i> (2011)	<i>L. fermentum</i> HL 57 (5x10 ⁷)	28	48	6	30
		<i>P. acidilactici</i> SP979 (7,5 log ufc/g)	ND	19	7	20
Enchidos fermentados turcos	Gücükoglu & Küplülü (2010)*	<i>L. sakei</i> + <i>S. xylosus</i> B-FM (CHR-HANSEN) (Cura a 22 °C)	54	62	ND	78
		<i>L. plantarum</i> + <i>S. carnosus</i> TD-66 (CHR-HANSEN) (Cura a 22 °C)	52	61	ND	75
		<i>L. curvatus</i> + <i>S. carnosus</i> + <i>S. xylosus</i> (CHR-HANSEN) (Cura a 22 °C)	55	63	ND	75
Chouriço português	Latorre-Moratalla <i>et al.</i> (2010b)*	<i>L. sakei</i> (Fermentação: 48 Horas a 1,5°C/80% HR; Cura/fumagem: 8 dias /20°C/70% HR)	17	23	75	ND
		<i>S. equorum</i> (Fermentação: 48 Horas a 1,5°C/80% HR; Cura/fumagem: 8 dias /20°C/70% HR)	ND	ND	45	ND
		<i>L. sakei</i> + <i>S. equorum</i> (Fermentação: 48 Horas a 1,5°C/80% HR; Cura/fumagem: 8 dias /20°C/70% HR)	15	20	89	ND
Fuet espanhol (semelhante a salamame)	Latorre-Moratalla <i>et al.</i> (2010b)*	<i>L. sakei</i> CTC6626 + <i>S. xylosus</i> CTC6013 (Fermentação: 2 dias a 12°C/85% HR; Cura: 28 dias /10°C/75% HR)	19	46	ND	ND
		<i>L. sakei</i> CTC494 + <i>S. xylosus</i> CTC6013 (Fermentação: 48 Horas a 1,5°C/80% HR; Cura: 28 dias /10°C/75% HR)	45	50	ND	ND

ND - Não detetado. NQ - Não quantificado. * Os autores não indicaram a concentração inoculada.

2.5. Análise sensorial

As características sensoriais dos géneros alimentícios são preponderantes, pois determinam fortemente a aceitabilidade dos mesmos por parte dos consumidores. Aqueles exigem, cada vez mais, produtos que possuam propriedades nutricionais diferenciadoras e, simultaneamente, características sensoriais apelativas. Caso isso não suceda, os géneros alimentícios não terão aceitabilidade no mercado, o que poderá conduzir ao seu insucesso, concomitantemente poderão deixar de ser produzidos.

De acordo com IFT's (1981) entende-se por análise sensorial a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações às características dos alimentos e materiais tal como são percebidas pelos órgãos dos sentidos: visão (cor e forma); olfacto (aroma); gosto, sabor ou paladar (na língua as papilas gustativas - doce, salgado, ácido, amargo e *umami*); audição; tato (pele, lábios e mucosas). Segundo Martins (1990), o julgamento pelos órgãos dos sentidos processa-se pela seguinte ordem: aparência, aroma, textura, *flavour*.

Produtos tradicionais como os enchidos apresentam características especiais, o que obriga à utilização de técnicas sensoriais complexas. Fatores como a representatividade das amostras e a variabilidade existente entre enchidos, devem ser tidos em conta no delineamento experimental dos testes sensoriais. A utilização de painéis treinados é essencial para se mitigarem fatores que possam causar ruído na fiabilidade dos resultados.

2.5.1. Métodos sensoriais

De acordo com Sanchez & Lorente (2005); Lyon *et al.* (1992) e IFT's (1981) os métodos utilizados em análise sensorial podem ser classificados em dois grandes grupos: **os afetivos**, onde se avaliam as preferências e/ou aceitação de um produto, e os **analíticos**, onde se avaliam as diferenças ou semelhanças, qualidade e/ou quantidade das características sensoriais de um produto. Por sua vez, **os analíticos** dividem-se em **discriminatórios** e **descritivos**. Os **discriminatórios** são testes analíticos que indicam a existência ou não de diferenças entre produtos, podendo indicar também o sentido das diferenças. Estão compreendidos neste tipo de teste o teste de comparação pareada, teste triangular, testes duo-trio, teste de comparação, entre outros. Quanto aos **descritivos**, que permitem indicar além da possível diferença entre amostras, a magnitude dessas diferenças e a sua caracterização, identificam-se duas fases: uma fase inicial de identificação qualitativa dos atributos e uma segunda fase quantitativa de atribuição de pontuação para os atributos selecionados. O conjunto das características sensoriais do aspeto, aroma, sabor e textura são conhecidos como perfil sensorial de um produto.

De acordo com Lawless & Heymann (1999) a análise descritiva é a mais sofisticada. Esta técnica permite obter descrição sensorial completa de produtos e ajuda a identificar variáveis do processo de formulação e determinar atributos sensoriais que são importantes do ponto de vista da aceitação do produto. Existem vários e diferentes métodos de análise descritiva, que geralmente refletem diferentes filosofias e abordagens para a descrição sensorial.

2.5.2. Atributos visuais

A característica sensorial mais importante associada ao sentido da visão é a avaliação da cor dos produtos, contudo, a aparência, a forma, a superfície, o tamanho e o brilho também são avaliados recorrendo a este sentido (Meilgaard *et al.*, 1999; Anzaldúa-Morales, 1994). Um exame visual aos enchidos pode fornecer algumas informações sobre o processo tecnológico utilizado. A realização de cortes transversais nos enchidos e/ou a obtenção de fatias provenientes destes produtos permitem avaliar várias características:

Intensidade da cor: avaliação da luminosidade (claro/escuro) da cor vermelha para a carne e da cor branca, amarela ou outra para a gordura;

Homogeneidade da cor: uniformidade da cor em toda a secção, ou seja, não se faz uma avaliação independente entre músculos ou entre carne e gordura. Podemos avaliar a qualidade do marmoreado e a efetividade da etapa de mistura dos ingredientes;

Presença de aponevroses, gânglios e cerdas: Permite-nos avaliar a presença destas estruturas, pois estas depreciam a qualidade dos enchidos.

2.5.3. Atributos do aroma, sabor e *flavour*

Estas características são críticas e das mais difíceis de avaliar. Para a maioria destes parâmetros não existem referências suficientemente adequadas para permitirem avaliar o atributo quer em termos de qualidade quer em termos de quantidade (Guerrero *et al.*, 2005; Meilgaard *et al.*, 1999).

Cocconcelli & Fontana (2010); Toldrá (2008) e Leroy *et al.* (2006) referem que a interação entre microrganismos, matérias-primas, enzimas proteolíticas e lipolíticas e as condições de processamento é que determinam as características sensoriais dos enchidos. Flores (2008) refere que a utilização dos condimentos habituais na produção de enchidos e o recurso à fumagem tradicional, têm uma influência enorme nas características sensoriais dos mesmos.

Desta forma, apresentamos alguns atributos negativos e positivos mais comuns na análise sensorial de enchidos:

Alguns dos atributos considerados negativos são: **Humidade:** aroma e *flavour* a lugar fechado, húmido e pouco ventilado. **Fungos:** aroma e *flavour* a bolor. **Animal:** aroma e *flavour* a animal. **Floral:** aroma

e *flavour* semelhante a determinadas flores, similar ao produzido pelo fenilacetaldéido (acidificado). **Avinagrado:** aroma e *flavour* ligeiramente irritante, por vezes pode lembrar o ácido acético. **Ranço:** aroma e *flavour* a ranço (oxidação dos lípidos). **Metálico:** aroma e *flavour* que por vezes faz lembrar sangue.

Como atributos positivos poder-se-iam incluir:

Frutos secos: aroma e *flavour* a frutos secos. **Cura:** aroma e *flavour* complexos formados por vários atributos, que se vão desenvolvendo ao longo do processo de cura. **Doce:** sabor procedente da degradação das proteínas e lípidos. Pode usar-se como referência a sacarose. **Salgado:** sabor básico produzido por NaCl (equilibrado/sem excessos). **Amargo:** sabor básico que se percebe na parte posterior da língua. **Ácido:** sabor característico que pode ocorrer quando a cura destes produtos é feita de forma rápida, quando são adicionados açúcares fermentescíveis ou quando se adiciona vinho às massas em excesso. **Picante:** associado à formulação dos enchidos ou muitas vezes influenciado por enchidos ligeiramente acidificados. **Umami:** sabor típico do glutamato monossódico e de alguns nucleótidos. Certos aminoácidos e péptidos também podem conferir esta sensação (Arnau, 2000).

2.5.4. Atributos da textura

A textura é o conjunto de todos os atributos mecânicos, geométricos e de superfície de um produto, perceptíveis por meios mecânicos, táteis e quando apropriado, por recetores visuais e auditivos (ISO 11036:1994).

Mais recentemente, Szczesniak (2002) define a textura como a manifestação sensorial e funcional das propriedades estruturais, mecânicas e superfícies dos alimentos, detetada por meio dos sentidos da visão, audição, tato e cinestesia. A mesma autora refere que esta definição leva a importantes conceitos, tais como:

a) a textura é uma propriedade sensorial, portanto, apenas um ser humano ou um animal a podem perceber. Os instrumentos de medição da textura só podem detetar e quantificar certos parâmetros físicos, devendo estes ser interpretados em termos de percepção sensorial;

b) um atributo multiparamétrico;

c) deriva da estrutura dos alimentos (molecular, microscópica e macroscópica);

d) pode ser detetada por vários sentidos, sendo o tato o mais importante.

Na tentativa de relacionar a avaliação feita pelo homem com as medições instrumentais Szczesniak (1963b) classificou as características texturais em três grupos: i) **Atributos mecânicos**, apresentados na Figura 4; ii) **Atributos geométricos:** Granulometria - relacionados com a percepção da forma, do

tamanho e a orientação das partículas; iii) e **outros**, refere-se às propriedades humectantes (teor de água) e ao teor de gordura.

2.6. Métodos utilizados para a determinação da textura

Scott-Blair (1958) classifica os métodos instrumentais para medir a textura em três grupos:

Métodos fundamentais: São utilizados para medir propriedades reológicas fundamentais como a viscosidade, o módulo de elasticidade e a reação de *Poisson*. Dentro deste grupo, os ensaios mais comuns são os de relaxação e os de compressão-descompressão. Geralmente estão um pouco correlacionados com as medidas sensoriais que não são realizadas em condições ambientais de consumo (Rosenthal, 1999; Bourne, 1982).

Métodos empíricos: Medem parâmetros normalmente pouco definidos do ponto de vista reológico. Dentro deste grupo, os ensaios mais comuns são os de penetrometria, punção, compressão e de corte. Estes métodos medem propriedades dos produtos que frequentemente são mal definidas para além de serem de difícil expressão. Os resultados obtidos são normalmente característicos para as condições experimentais utilizadas (Rosenthal, 1999).

Métodos imitativos: Tentam imitar as condições em que se encontram os alimentos na boca dos consumidores. Dentro deste grupo, a análise do perfil de textura do inglês *Texture Profile Analysis*, vulgarmente conhecido como ensaio TPA é o método que nos últimos anos tem sido mais utilizado para avaliar todo o tipo de géneros alimentícios (Rosenthal, 1999; Pons & Fiszman, 1996).

O ensaio TPA pode, nalguns casos, substituir um painel de provadores na avaliação da textura de alimentos (Bourne, 2002; Szczesniak, 2002).

Este método baseia-se na realização de dois ciclos de compressão sucessivos sobre os alimentos, imitando a ação das mandíbulas (ver Figura 4).

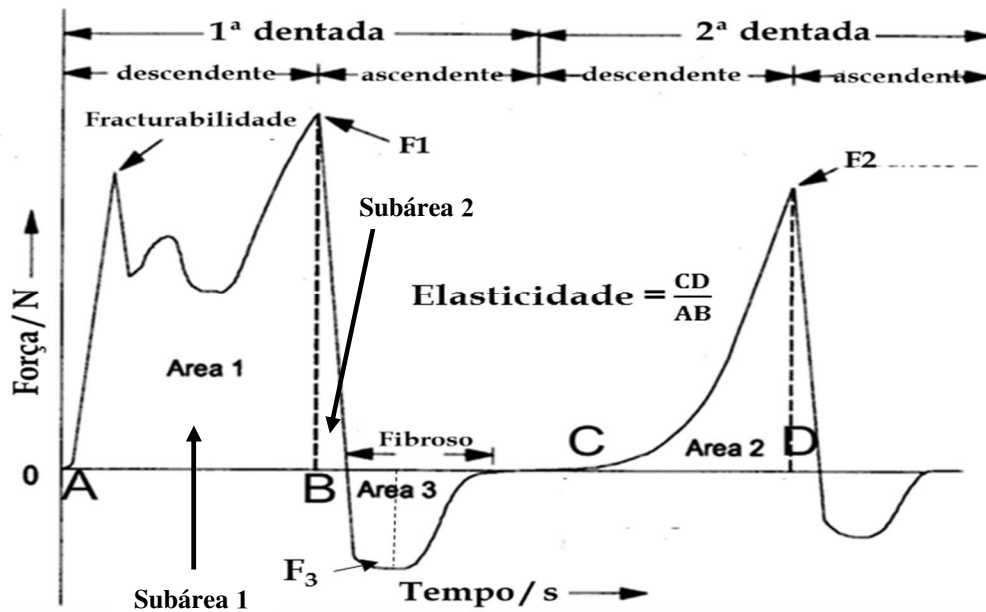


Figura 4 - Curva típica obtida no teste TPA e respetivos parâmetros de textura (adaptado de Zheng *et al.*, 2016; Sanchez, 2009; Rosenthal, 1999).

Segundo Szczesniak (1963a) os parâmetros de textura que podem ser obtidos através do ensaio TPA são:

Fraturabilidade F (N, g) - Define o carácter quebradiço, crocante, frágil. **Módulo Map (N/s ou g/s)** - Declive da curva no primeiro ciclo (rigidez do material). **Dureza 1 = F1 (Firmeza, N ou g)** - Força de compressão ou penetração no primeiro ciclo. Define a dureza, suavidade, firmeza. **Adesividade = A3 (m² ou mm²)** - Trabalho necessário para vencer as forças de atração. Define o carácter pegajoso, adesivo. **Força adesiva = F3 (N ou g)** - Força negativa. **Stringiness (m ou mm)** - Define o carácter fibroso. **Dureza 2 = F2 (N ou g)** - Força de compressão ou penetração no segundo ciclo. **Springiness (elasticidade) - CD/AB**. Plasticidade e elasticidade. **Coesividade = A2/A1** - Força de ligação interna que define a estrutura dos alimentos. **Gomosidade (N ou g)** - F1 x coesividade. Define o carácter gomoso, farinhento, pastoso. **Mastigabilidade (N ou g) - gomosidade x elasticidade**. Define a tenrura, o carácter mastigável (*chewiness*). Zheng *et al.* (2016) e Sanchez (2009) acrescentam a **Resiliência = Subárea 2/Subárea 1**. Define a capacidade de um alimento absorver energia mecânica em regime elástico (ou resistir à energia mecânica absorvida) e readquirir a forma original quando é retirada a carga que provocou a deformação. Quanto mais resiliente for o alimento, menos frágil este será.

2.7. Medição objetiva da cor

A cor dos enchidos é uma característica que em conjunto com as outras definem a aparência dos mesmos. A aparência de um género alimentício é importante porque é praticamente o único critério que o/s cliente/s e/ou consumidore/s pode/m utilizar para avaliar a aceitabilidade dos produtos no ato de compra. Lima (2014) refere que a aparência é determinada por uma combinação de fatores, incluindo a fonte luminosa, o observador e o tipo de superfície do material exposto, se é uma superfície boa refletora, ou não. A mesma autora escreve que em 1931 a *Commission Internationale de L'Eclairage* (CIE) debruçou-se sobre o assunto na tentativa de sistematizar os métodos de avaliação da cor e considerou como elementos fundamentais: 1) o observador padrão 2º (2 graus) (baseado no sistema Triestímulo XYZ); 2) o iluminante padrão D65 - fonte luminosa com curvas espectrais características, cuja temperatura de cor é 6504 K, e é utilizado para representar a variação da luz solar ao longo do dia, na gama do visível do espectro e na região UV até 300 nm.

A avaliação ou medição da cor pode fazer-se através de diversos métodos, subjetivos e objetivos. Os métodos mais frequentemente utilizados são baseados no sistema CIE LAB ou $L^* a^* b^*$ (*Commission Internationale de l'Eclairage*, 1978). Entre os equipamentos mais usados para medir a cor dos enchidos estão os colorímetros Minolta (Mora-Galego, 2014; Essid & Hassouna, 2013; Casaburi *et al.* 2007), provavelmente, devido às elevadas correlações observadas entre a avaliação subjetiva e as medições objetivas da cor utilizando o sistema CIE LAB (Gómez & Lorenzo, 2013; Lorenzo & Franco, 2012; Jeremiah *et al.*, 1972).

O método CIE LAB tem como base a teoria de que a cor é definida com a combinação de três cores primárias (azul, verde e vermelho). Este método foi criado a partir de alguns testes que foram feitos para determinar a sensibilidade média de diversos observadores reais a partir dos quais foram definidas curvas de sensibilidade para cada uma das cores primárias. Aos valores médios de X (vermelho), Y (verde) e Z (azul) foi dado o nome de “valores triestímulo”. Para tornar a resposta mais fácil de interpretar, estes valores são usualmente convertidos para o denominado sistema CIELab, que dá as coordenadas L^* , a^* , b^* e é o sistema atualmente aceite a nível mundial. Os colorímetros são equipamentos que permitem a medição destas coordenadas, com exatidão, a partir das quais se podem detetar as diferenças de cor.

O sistema CIELab define o espaço com coordenadas retangulares (L^* , a^* , b^*) conjuntamente com outras coordenadas cilíndricas (L^* , C^* , H°) onde (Lima, 2014; Warriss, 1996; Murray, 1995):

- L^* (Value) mede a variação da luminosidade entre o preto (0) e o branco (100);

- a^* é uma coordenada da cromaticidade que representa a quantidade de croma ou cor em plano cromático e define a cor vermelha para valores positivos e a cor verde para valores negativos;
- b^* é uma coordenada da cromaticidade que representa a quantidade de croma ou cor em plano cromático e define a cor amarela para valores positivos e a cor azul para valores negativos;
- C^* (*Chroma*) corresponde à pureza, saturação, croma ou quantidade de cor e quanto mais forte e brilhante é a cor mais afastado está da origem das coordenadas, em que $C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$;
- H° (*Hue*) corresponde à tonalidade e é representado por um ângulo entre 0° a 360° . Os ângulos entre 0° e 90° representam os vermelhos, laranja e amarelo, de 90° a 180° são os amarelos, amarelos-verdes e os verdes, de 180° a 270° são os verdes, *cyans* (azul-verde) e azuis, de 270° a 360° são os azuis, magenta e novamente os vermelhos. $H^\circ = \arctg(b^*/a^*)$.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a avaliação do efeito de diferentes culturas de arranque autóctones, puras e mistas, na qualidade e na segurança de paios de porco preto, do Alentejo, e painhos da Beira Baixa produzidos em ambiente industrial.

Considerando que na utilização de culturas de arranque é necessário escolher tanto os microrganismos que as constituem, bem como a sua concentração, com a realização deste estudo pretendemos atingir os seguintes objetivos específicos:

I - Avaliar qual ou quais as estirpes a usar como cultura de arranque e em que concentrações apresentam melhores efeitos ao nível da qualidade (cor, perfil de textura e análise sensorial dos produtos) e ao nível da segurança (pH, a_w , parâmetros microbiológicos, incluindo indicadores de higiene e de segurança, e aminos biogénicas) nos enchidos a inocular.

II - Com base nos resultados obtidos, propor as culturas mais adequadas e as respetivas concentrações, perspetivando a sua utilização como culturas de arranque no fabrico dos enchidos alvo de estudo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Matérias-primas e ingredientes

Foi utilizada carne e gordura de porco preto, para os enchidos produzidos no Alentejo e carne e gordura de porco branco, para a produção dos painhos da Beira Baixa. A compra e escolha das matérias-primas, a par dos restantes ingredientes e matérias-primas subsidiárias, ficaram ao cuidado das empresas parceiras, para minimizar alterações ao processo produtivo habitual de cada fábrica.

Na Tabela 9 apresentamos os ingredientes utilizados na produção dos paios de porco preto, do Alentejo.

Tabela 9 - Ingredientes dos paios de porco preto, do Alentejo.

Ingredientes	
	Vinho branco, 8%; sal, 2,5%; massa de pimentão, 2,5%; massa de alho, 0,8%; nitrito de sódio, 0,02%; nitrato de potássio, 0,008%, nitrito de potássio, 0,007%; fosfato disódico, 0,03%; trifosfato pentassódico, 0,03%; ácido ascórbico, 0,03% e ascorbato de sódio, 0,02%.

Na Tabela 10 apresentamos os ingredientes utilizados na produção de painhos da Beira Baixa.

Tabela 10 - Ingredientes dos painhos da Beira Baixa.

Ingredientes	
	Vinho branco, 5%; sal, 2,5%; massa de pimentão, 2,5%; água, 2%; massa de alho, 0,8%; louro, 0,05%; nitrito de sódio, 0,02%; nitrato de potássio, 0,007%, nitrito de potássio, 0,007%; fosfato disódico, 0,03%; trifosfato pentassódico, 0,03%; ácido ascórbico, 0,04% e ascorbato de sódio, 0,02%.

4.2. Processos de fabrico

O processo produtivo dos paios de porco preto, do Alentejo, decorreu como referido na Tabela 11, onde enumeramos as etapas e as descrevemos de forma breve.

Tabela 11 - Etapas do processo produtivo dos paios de porco preto, do Alentejo, e respetiva descrição.

Etapa	Descrição
Receção das matérias-primas	≤ 7,0°C
Armazenamento das matérias-primas	0,0°C - 3,0°C
Cubicagem	≤ 12,0°C
Mistura dos ingredientes (incluindo a inoculação das culturas de arranque)	≤ 12,0°C
Maturação	Aproximadamente 72 horas/3,0°C- 5,0°C/ Humidade Relativa (HR) 90,0% - 95,0%
Enchimento, atadura e picado	≤ 12,0°C

Tabela 11 (continuação) - Etapas do processo produtivo dos paios de porco preto, do Alentejo, e respetiva descrição.

Etapa	Descrição
Fermentação (só culturas mistas inoculadas com a concentração 10 ⁸ células grama de massa)	Na antecâmara dos fumeiros a temperaturas compreendidas entre 14,3°C – 21,2°C
Desidratação inicial em fumeiro tradicional com recurso a lenha de azinho	24 horas/18,0°C - 24,0°C/HR 28,0% - 72,0%
Cura em câmara de cura com temperatura e humidade relativa controladas	8,0°C - 12,0°C/HR 60,0% - 80,0% até se atingir 38% a 40% de perda de peso inicial - aproximadamente 40 dias
Embalamento	Sob vácuo
Transporte até ao laboratório	Mala térmica (Camping Gaz Coldstar 100, Lyon, França) com capacidade para manter continuamente o fornecimento de frio através do isqueiro do carro, a fim de garantir a manutenção de temperaturas de refrigeração (3-5°C)

Para produzirmos os paios de porco preto, do Alentejo, recorreremos a uma cubicadora da marca MHS, modelo Schneidetechnik 1000 (Abstatt, Alemanha), misturadora a vácuo com pás em formas de Z da marca Asgo, modelo MVZ300 (Ermesinde, Portugal), enchedora da marca Frey, modelo F-Line F190 (Herbrechtingen, Alemanha) e embaladora a vácuo da marca Turbovac, modelo 700 STE-XL ('s-Hertogenbosch, Holanda) e câmaras de cura da marca Zanotti, modelo Uniblock UAU007ER299F (Alessandria, Itália).

O processo produtivo dos painhos da Beira Baixa decorreu como referido na Tabela 12, onde enumeramos as etapas e as descrevemos de forma breve.

Tabela 12 - Etapas do processo produtivo dos painhos da Beira Baixa e respetiva descrição.

Etapa	Descrição
Receção das matérias-primas	≤ 7,0°C
Armazenamento das matérias-primas	0,0°C - 3,0°C
Picagem	≤ 12,0 °C
Mistura dos ingredientes (incluindo a inoculação das culturas de arranque)	≤ 12,0 °C
Maturação	Aproximadamente 72 horas/3,0°C - 5,0°C/ HR 90,0% - 95,0%
Enchimento, atadura e picado	≤ 12,0°C
Fermentação (só culturas mistas)	Na antecâmara dos fumeiros a temperaturas compreendidas entre 15,1°C - 22,3°C
Cura em fumeiro tradicional com recurso a lenha de azinho	10,5°C - 48,4°C/HR 31,7% - 84,8% até se atingir 38% a 40% de perda de peso inicial - aproximadamente 17 dias
Embalamento	Sob vácuo
Transporte até ao laboratório	Mala térmica (Camping Gaz Coldstar 100, Lyon, França) com capacidade para manter continuamente o fornecimento de frio através do isqueiro do carro, a fim de garantir a manutenção de temperaturas de refrigeração (3-5°C)

Para produzirmos os painhos da Beira Baixa recorreremos a uma picadora da marca Braher, modelo 114 (Andoain, Espanha), misturadora a vácuo com pás em formas de Z da marca Asgo, modelo MVZ150 (Ermesinde, Portugal), enchedora da marca Frey, modelo F-Line F193 (Herbrechtingen, Alemanha) e embaladora a vácuo da marca Henkelman, modelo 2-75 ('s-Hertogenbosch, Holanda).

A cura dos painhos decorreu integralmente em fumeiro tradicional, sem recurso a câmaras de cura.

Como invólucros, como é habitual nos enchidos tradicionais, utilizámos intestino grosso de suíno (tripa natural, fresca e salgada) para os paios e painhos. Antes do enchimento as tripas foram cuidadosamente raspadas e lavadas com recurso a água, sal grosso, limão, vinagre e desinfetante comercial para tripas (Desitripa, Formulab - Maia, Portugal).

4.3. Características gerais dos enchidos

Na Tabela 13 apresentamos as características gerais dos paios de porco preto, do Alentejo, e dos painhos da Beira Baixa.

Tabela 13 - Características gerais dos paios de porco preto, do Alentejo, e dos painhos da Beira Baixa.

Dimensão do produto (comprimento)	25 cm - 30 cm
Peso após enchimento	400 g - 450 g
Peso do produto acabado	240 g - 270 g
Diâmetro do produto acabado	Aproximadamente 5 cm

4.4. Ensaios de inoculação

4.4.1. Culturas de arranque

As estirpes inoculadas (Tabela 14) foram isoladas de enchidos cárneos fermentados e da superfície de equipamentos de várias indústrias de transformação de produtos cárneos. Foram selecionadas por apresentarem melhores resultados em provas de caracterização fenotípica, nomeadamente atividades nitrato redutase, lipolítica e proteolítica, bem como ausência de resistência a antimicrobianos. A sua identificação foi efetuada com recurso a técnicas de biologia molecular. A identificação molecular das estirpes foi efetuada com recurso a PCR e PCR *fingerprinting*. Pertencem às coleções de isolados da Universidade de Évora e da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. As estirpes pertencentes à coleção de isolados da Universidade de Évora foram identificadas usando métodos moleculares por M. Laranjo (comunicação pessoal). No que respeita às estirpes de *Staphylococcus* e *Lactobacillus* pertencentes à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, foram identificados por M.J.

Fraqueza (comunicação pessoal) e Gonçalves (2012), respetivamente, através de métodos moleculares.

Também inoculámos estirpes - patenteadas - que já tinham provado ter um papel melhorador nos paios de porco Alentejano de outras fábricas, estudados há alguns anos atrás (Elias, 2004). A identificação das estirpes patenteadas foi efetuada por métodos bioquímicos, usando galerias miniaturizadas API (BioMérieux – Marcy-l'Étoile, França), nomeadamente API Staph para *S. xylosus* CECT7057 (Almeida, 2001) e API 50 CH para *L. sakei* CECT7056 (Soares, 2003).

A patente espanhola com o título “Procedimiento biotecnológico para obtener embutidos ibéricos com un contenido reducido en aminas biógenas”, cujos inventores são Miguel Elias (Universidade de Évora) e Alfonso Carrascosa (CSIC - Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid), foi registada na “Oficina Española de Patentes y Marcas” com o nº de publicação 2281247 de 2008). Foi concedida aos mesmos inventores a patente portuguesa nº 103508, com o título “Procedimiento biotecnológico para obter enchidos de porco da raça Alentejana com um teor reduzido em aminas biogénicas”, registada no Boletim da Propriedade Industrial, nº 1 de 2007.

Na Tabela 14 apresentamos a identificação e origem das estirpes inoculadas.

Tabela 14 - Identificação e origem das estirpes inoculadas.

Grupo microbiano	Género	Espécie	Estirpe	Origem
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i> ¹	<i>equorum</i>	5MSA4	Chouriço de carne de porco preto
	<i>Staphylococcus</i> ²	<i>equorum</i>	S2M7	Superfície de picadora
	<i>Staphylococcus</i> ³	<i>xylosus</i>	CECT7057	Paio de porco Alentejano
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i> ²	<i>curvatus</i>	L2B2	Linguça
	<i>Lactobacillus</i> ²	<i>sakei</i>	CV3C2	Chouriço de vinho
	<i>Lactobacillus</i> ³	<i>sakei</i>	CECT7056	Paio de porco Alentejano
Leveduras	- ¹	-	2RB4	Superfície de misturadora

¹ Universidade de Évora; ² Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa da Universidade de Lisboa; ³ Estirpes patenteadas

Todos os isolados utilizados neste estudo estavam em criotubos contendo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Scharlau - Barcelona, Espanha) suplementado com 15% de Glicerol (Merck - Nova Jersey, EUA) e armazenados a -80 °C, em arcas de ultracongelamento da marca Haier, modelo Bio Medical DW-86L388 (Qingdao, China).

A pureza das estirpes foi confirmada antes de procedermos à sua multiplicação, mediante sementeira à superfície em placas com meio MRS Agar (Scharlau - Barcelona, Espanha), para *Lactobacillus*, meio BHI Agar (Scharlau - Barcelona, Espanha), para *Staphylococcus* e para a levedura 2RB4. As estirpes de *Lactobacillus* incubaram a 30°C durante 72 horas, em condições de anaerobiose, e as estirpes de *Staphylococcus* a 37°C durante 24 horas e a levedura 2RB4 a 25°C durante 72 horas.

Para a multiplicação das estirpes de *Lactobacillus*, a partir de uma colónia bem isolada de entre as que haviam crescido em MRS Agar (Scharlau - Barcelona, Espanha), com a ajuda de uma ansa estéril de platina semearam-se 2 *Erlenmeyers* (capacidade de 100 mL) que continham 30 mL de MRS caldo (Scharlau - Barcelona, Espanha) com 4% de NaCl (Prolabo - VWR, Pensilvânia, USA). Os meios inoculados foram a incubar durante 24 h a 30°C em estufa (Memmert - Schwabach, Alemanha). Após este período de multiplicação, o conteúdo de cada um dos *Erlenmeyers* foi transferido para outros 2 *Erlenmeyers* (capacidade de 2000 mL) que continham 1000 mL de MRS caldo com 4% de NaCl. Posteriormente foram colocados 48 horas a 30°C em estufa (Memmert - Schwabach, Alemanha).

Para a multiplicação da levedura 2RB4 seguiu-se metodologia idêntica à dos *Lactobacillus*, no entanto, a temperatura de incubação foi de 25°C e o meio de cultura usado foi o BHI caldo (Scharlau - Barcelona, Espanha) com 4% de NaCl.

No que respeita à multiplicação das estirpes de *Staphylococcus* seguiu-se metodologia idêntica à dos *Lactobacillus*, contudo, a temperatura de incubação foi de 37°C e os *Erlenmeyers* (capacidade de 2000 mL), que continham 1000 mL de BHI caldo com 4% de NaCl, foram colocados sob agitação orbital num agitador da marca IKA, modelo KS 4000i (Staufen im Breisgau, Alemanha) a 160 rpm e a 37°C durante 24 h.

Após a multiplicação as culturas foram submetidas a centrifugação, por forma a concentrar o número de células microbianas assim como eliminar os metabolitos microbianos e o caldo nutritivo onde as bactérias cresceram. Para tal, as culturas que se haviam obtido foram centrifugadas a 7000 RPM durante 10 minutos, em ambiente refrigerado (4°C), numa centrífuga da marca Thermo Scientific Sorvall, modelo Lynx 4000 (Massachusetts, USA), rotor Fiberlite F14-6x250y da mesma marca e copos de centrífuga (Nalgene - Massachusetts, USA). De seguida, eliminámos o sobrenadante e as células concentradas foram ressuspensas em soro fisiológico. Esta solução foi homogeneizada e tornou a ser centrifugada. A operação efetuou-se duas vezes de modo a reduzir a influência de compostos estranhos no aroma dos enchidos. Por fim, ressuspendemos as células concentradas em água destilada estéril (adaptado de Elias, 2004).

Com recurso a um turbidímetro Densichek (Biomérieux - Marcy-l'Étoile, França) foi estimado o número de microrganismos (densidade ótica) existentes na solução concentrada de células bacterianas. De seguida, procedeu-se à sua diluição em água destilada estéril, de acordo que a concentração que pretendíamos inocular. As suspensões microbianas foram colocadas em frascos de vidro estéreis com capacidade para 500 mL a aproximadamente 5°C, durante um período máximo de 16 horas, até ocorrer a inoculação das massas. Como densidade ótica não é sinónimo

de viabilidade microbiana, a mesma foi atestada mediante a sementeira em placas de diluições decimais de amostras de inóculo, recolhidas imediatamente antes da inoculação das massas de carne.

4.4.2. Inoculações das massas com culturas puras

As estirpes inoculadas como culturas puras nas massas produzidas nas duas fábricas foram *Staphylococcus equorum* 5MSA4, *S. equorum* S2M7, *Lactobacillus curvatus* L2B2 e *L. sakei* CV3C2.

Para as inoculações com culturas puras, as concentrações de células inoculados por grama de massa de cada estirpe foram de aproximadamente 10^3 e 10^6 para os paios de porco preto, do Alentejo, existindo sempre um lote controlo, e aproximadamente 10^5 e 10^8 para os painhos da Beira Baixa, também com um lote controlo. A diferença entre as concentrações utilizadas nas duas fábricas deveu-se à diferença entre os processos produtivos associados ao fabrico dos enchidos. Nos painhos da Beira Baixa recorreremos somente à fumagem tradicional, como tal, as condições - teoricamente - serão mais adversas, nomeadamente a ação do fumo sobre as estirpes e as temperaturas elevadas que são atingidas durante a etapa de fumagem, por comparação com as que os paios de porco preto, do Alentejo, estiveram sujeitos. Por isso, reforçámos a concentração microbiana, na tentativa das estirpes disporem de número suficiente para competirem com a microbiota nativa.

A escolha das concentrações de células a inocular por grama de massa teve com base a consulta de diferentes autores, nomeadamente Elias *et al.* (2014), Casquete *et al.* (2012), Janssens *et al.* (2012), Tabanelli *et al.* (2012), Casquete *et al.* (2011b), Ruiz-Moyano *et al.* (2011) e Talon *et al.* (2008), entre outros, todavia, de uma forma geral, as concentrações, por grama de massa inoculadas pelos autores indicados andaram mais próximas das 10^7 a 10^8 células/g de massa, valores que se aproximam mais das concentrações inoculadas nos painhos. Porém, atendendo aos preços das culturas de arranque e numa perspetiva biotecnológica para os produtores daquelas culturas e, consequentemente, dos produtores de enchidos, equacionámos inocular concentrações mais reduzidas nos paios, com o intuito de percebermos se a ação das mesmas seria evidenciada com concentrações aproximadas de 10^3 e 10^6 células/g de massa.

Em cada uma das fábricas foram preparados três lotes independentes ao longo do tempo, para cada uma das estirpes inoculadas (*S. equorum* 5MSA4, *S. equorum* S2M7, *L. curvatus* L2B2 e *L. sakei* CV3C2), com o peso unitário de 150 kg, de massa, com exceção dos lotes preparados na fábrica do Alentejo, aquando das inoculações com as estirpes pertencentes ao género *Lactobacillus*, neste caso, cada lote teve o peso unitário de 180 kg, de massa. Os lotes foram compostos por 5

modalidades de inoculação, com exceção dos que foram preparados na fábrica do Alentejo, aquando das inoculações com as estirpes pertencentes ao género *Lactobacillus*, naquele caso, cada lote foi composto por 6 modalidades de inoculação. O peso unitário de cada modalidade de inoculação foi de 30 kg, de massa, independentemente de existirem 5 ou 6 modalidades de inoculação.

Optámos, como muitos outros autores (Simion *et al.*, 2014; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010b; Talon *et al.*, 2008; Fontán *et al.*, 2007; González-Fernández *et al.*, 2006; Bover-cid *et al.*, 2001a), por adicionar dextrose alimentar às massas dos enchidos, com exceção dos inoculados com culturas puras de *Staphylococcus* nos paios de porco preto, do Alentejo, e de uma modalidade controlo sem dextrose no mesmo tipo de enchido, mas inoculado com culturas puras de *Lactobacillus*. A concentração por nós adicionada foi de 0,25% da massa produzida e resultou da consulta dos autores referidos. Aqueles autores adicionaram concentrações muito variadas (0,1% a 2,0%).

A exceção evidenciada nos dois parágrafos anteriores, relativa à inoculação das estirpes de *Lactobacillus* na fábrica do Alentejo, resultou da criação de uma sexta modalidade (controlo sem dextrose), à qual não adicionámos dextrose alimentar, com o intuito de percebermos como a microbiota indígena responderia à presença daquela fonte de energia.

As modalidades de inoculação nos paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas puras de *Staphylococcus* foram: **1** - Controlo; **2** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4, na concentração de 10^3 células por grama de massa; **3** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4, na concentração de 10^6 células por grama de massa; **4** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^3 células por grama de massa; **5** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^6 células por grama de massa.

As modalidades de inoculação nos paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas puras de *Lactobacillus* foram: **1** - Controlo; **2** - Controlo com dextrose; **3** - *Lactobacillus curvatus* L2B2, na concentração de 10^3 células por grama de massa; **4** - *Lactobacillus curvatus* L2B2, na concentração de 10^6 células por grama de massa; **5** - *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração de 10^3 células por grama de massa; **6** - *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração de 10^6 células por grama de massa.

As modalidades de inoculação nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas puras de *Staphylococcus* foram: **1** - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4, na concentração de 10^5 células por grama de massa; **3** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4, na concentração de 10^8 células por grama de massa; **4** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na

concentração de 10^5 células por grama de massa; **5** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^8 células por grama de massa.

As modalidades de inoculação nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas puras de *Lactobacillus* foram: **1** - Controlo com dextrose; **2** - *Lactobacillus curvatus* L2B2, na concentração 10^5 células por grama de massa; **3** - *Lactobacillus curvatus* L2B2, na concentração 10^8 células por grama de massa; **4** - *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração 10^5 células por grama de massa; **5** - *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração 10^8 células por grama de massa.

4.4.3. Inoculações das massas com culturas mistas

Nas inoculações com culturas mistas foram preparados três lotes independentes ao longo do tempo em cada fábrica, com o peso unitário de 150 kg, de massa. Os lotes foram compostos por 5 modalidades de inoculação e o peso unitário de cada modalidade de inoculação foi de 30 kg, de massa. A todas as modalidades, independentemente do tipo de enchido fabricado, foi adicionada dextrose alimentar (0,25%).

A escolha da estirpe do género *Staphylococcus* e do género *Lactobacillus* a inocular como cultura mista foi fundamentada em função dos resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos, microbiológicos, reológicos e sensoriais e nos teores de amins biogénicas obtidos aquando da inoculação das culturas puras, ou seja, as estirpes que mostraram ter um efeito melhorador sobre as características gerais dos enchidos, no caso, *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2. A cultura mista também continha a levedura 2RB4, todavia, a escolha daquela levedura baseou-se em testes laboratoriais, nomeadamente a presença de atividade lipolítica e proteolítica, isto é, não foi testada como cultura pura nos paios de porco preto, do Alentejo, e/ou nos painhos da Beira Baixa.

No entanto, os resultados dos ensaios em que foram inoculadas culturas puras, provavelmente devido às condições de fabrico adotadas em ambas as fábricas, não mostraram haver diferenças muito pronunciadas entre as modalidades de inoculação estudadas. Posto isto, decidimos testar estirpes - patenteadas - que já tinham provado ter um papel melhorador nas características de paios de porco Alentejano de outras fábricas, estudados há alguns anos atrás. As estirpes em causa foram *S. xylosus* CECT7057 e *L. sakei* CECT7056.

Na empresa do Alentejo executámos dois ensaios de inoculação com culturas mistas. No primeiro ensaio foram inoculadas as estirpes que haviam mostrado melhores resultados enquanto culturas puras (*S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2) e a levedura 2RB4. No segundo ensaio, além das estirpes usadas no primeiro ensaio, também inoculámos as estirpes patenteadas (*S. xylosus* CECT7057 e *L. sakei* CECT7056).

Na empresa da Beira Baixa foi efetuado apenas um ensaio com culturas mistas, onde foram inoculadas as estirpes usadas no segundo ensaio das inoculações efetuadas na empresa do Alentejo, ou seja, *S. equorum* S2M7, *L. sakei* CV3C2, levedura 2RB4, *S. xylosum* CECT7057 e *L. sakei* CECT7056.

As concentrações de células inoculadas por grama de massa das estirpes que haviam mostrado melhores resultados quando inoculadas como culturas puras (*S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2) recaíram sobre 10^6 , para os paios de porco preto, do Alentejo, e 10^8 , para os painhos da Beira Baixa. Significando isto, portanto, que no primeiro ensaio das inoculações dos paios de porco preto, do Alentejo, com culturas mistas inoculámos concentrações de 10^6 células/g de massa e nos painhos da Beira Baixa inoculámos concentrações de 10^8 células/g de massa.

No que concerne à levedura, a concentração utilizada foi sempre de 10^6 células/g de massa, independentemente do tipo de enchido, de acordo com o proposto noutros estudos, nomeadamente por Wang *et al.* (2015), Cano-Garcia *et al.* (2014), Porriños *et al.* (2013) e Andrade *et al.* (2010).

Contudo, e devido ao mencionado anteriormente, inoculámos culturas mistas nos paios de porco preto, do Alentejo, recorrendo às estirpes que haviam mostrado resultados mais satisfatórios quando inoculadas como culturas puras, mais a levedura 2RB4, e mais as culturas patenteadas, e utilizámos uma concentração de aproximadamente 10^8 células/g de massa para as estirpes bacterianas. Optámos por reforçar a concentração das estirpes, no sentido de perceber se esta variável estaria a afetar negativamente a ação das mesmas, e porque a concentração referida foi a que havia sido inoculada pelos detentores da patente.

As modalidades de inoculação nos paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas mistas na concentração 10^6 células por grama de massa foram: **1** - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^6 células por grama de massa; **3** - *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração de 10^6 células por grama de massa; **4** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^6 células por grama de massa e *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração de 10^6 células por grama de massa; **5** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^6 células por grama de massa, *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração de 10^6 células por grama de massa e levedura 2RB4, na concentração de 10^6 células por grama de massa.

Apesar de utilizarmos a designação culturas mistas, neste ensaio em particular, optámos por inocular as estirpes *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2 enquanto culturas puras, porque as mesmas formaram a cultura mista composta por *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2. Com esta ação pretendíamos

averiguar o comportamento das estirpes nas mesmas condições de fabrico, mas inoculadas isoladamente e enquanto cultura mistas, de forma a aferirmos os efeitos isolados e sinérgicos entre estirpes. Não inoculámos a levedura 2RB4 como cultura pura porque não faria sentido fazê-lo em termos tecnológicos.

As modalidades de inoculação nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas foram:

1- Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^8 células por grama de massa e *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração de 10^8 células por grama de massa; **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^8 células por grama de massa, *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração de 10^8 células por grama de massa e levedura 2RB4, na concentração de 10^6 células por grama de massa; **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057, na concentração de 10^8 células por grama de massa e *Lactobacillus sakei* CECT7056, na concentração de 10^8 células por grama de massa; **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057, na concentração de 10^8 células por grama de massa, *Lactobacillus sakei* CECT7056, na concentração de 10^8 células por grama de massa e levedura 2RB4, na concentração de 10^6 células por grama de massa.

As modalidades de inoculação nos paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas mistas na concentração 10^8 células por grama de massa foram:

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^8 células por grama de massa e *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração de 10^8 células por grama de massa; **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7, na concentração de 10^8 células por grama de massa, *Lactobacillus sakei* CV3C2, na concentração de 10^8 células por grama de massa e levedura 2RB4, na concentração de 10^6 células por grama de massa; **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057, na concentração de 10^8 células por grama de massa e *Lactobacillus sakei* CECT7056, na concentração de 10^8 células por grama de massa; **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057, na concentração de 10^8 células por grama de massa, *Lactobacillus sakei* CECT7056, na concentração de 10^8 células por grama de massa e levedura 2RB4, na concentração de 10^6 células por grama de massa.

4.4.4. Planos de amostragem

Na Figura 5 esquematiza-se o plano de amostragem dos ensaios de inoculação com culturas puras e do ensaio de inoculação em paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas mistas na concentração 10^6 células/grama de massa.

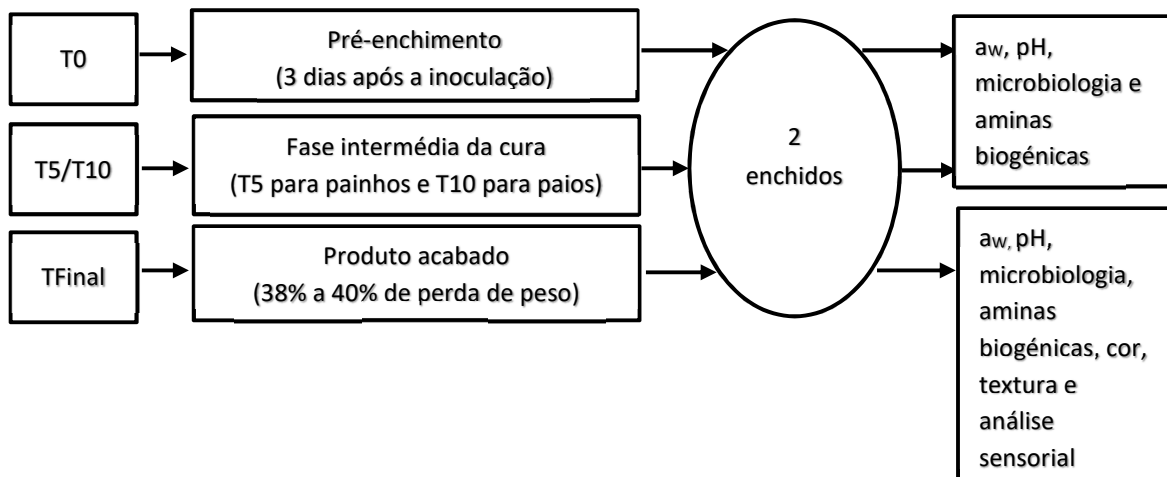


Figura 5 - Plano de amostragem dos ensaios de inoculação com culturas puras e do ensaio de inoculação em paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas mistas na concentração 10^6 células/grama de massa.

A diferença de tempos (T5/T10) entre a recolha de amostras para os dois tipos de enchidos estudados, deveu-se ao facto do processo produtivo dos painhos demorar aproximadamente metade do tempo necessário para produzirmos os paios. Os tempos mencionados referem-se à fase intermédia da cura dos dois tipos de enchidos estudados: T10 - 10 dias de cura (a contar desde o dia do enchimento) no caso dos paios de porco preto, do Alentejo, e T5 - 5 dias de cura (a contar desde o dia do enchimento) para os painhos da Beira Baixa.

As amostras para a determinação de aminas biogénicas, aquando da chegada à Herdade da Mitra, foram imediatamente congeladas para posterior determinação.

Na Figura 6 esquematiza-se o plano de amostragem do ensaio de inoculação dos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

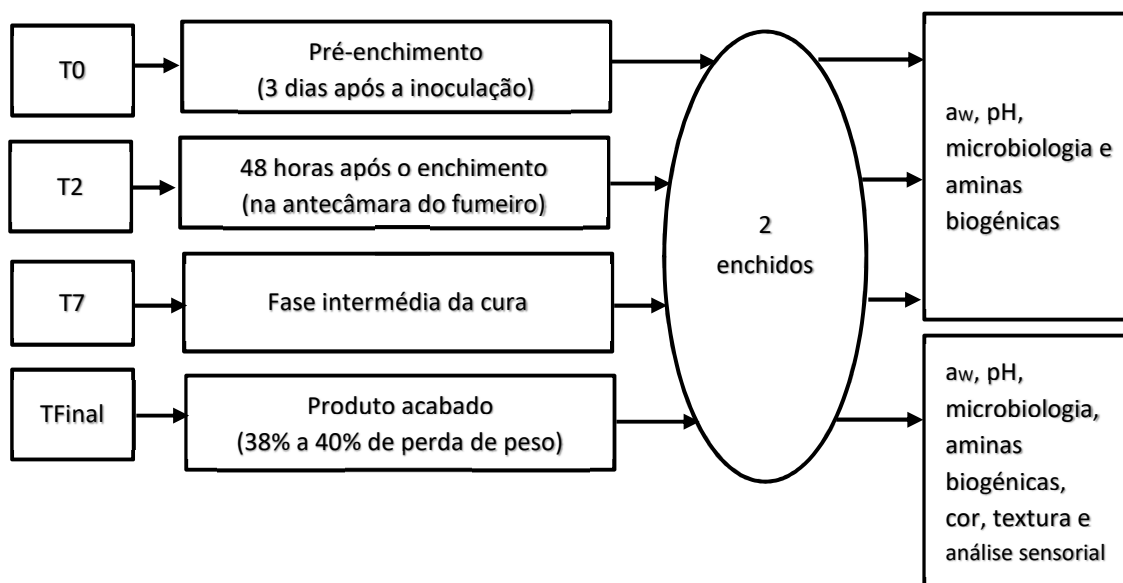


Figura 6 - Plano de amostragem executado no ensaio de inoculação dos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

- T2 - 48 h após o enchimento e imediatamente antes dos enchidos entrarem para a câmara de cura (48 h na antecâmara dos fumeiros). Durante o tempo mencionado os enchidos ficaram sujeitos a temperaturas entre os 15,1°C e os 22,3°C. Introduzimos este tempo, por comparação com as inoculações que tínhamos efetuado até ao momento, como objetivo de facilitar a multiplicação das estirpes, pois se estas forem sujeitas de imediato à ação do fumo e a temperaturas elevadas terão, teoricamente, maiores dificuldades em se manterem ativas.

- T7 - 7 dias de cura (a contar desde o dia do enchimento). O tempo mencionado refere-se à fase intermédia da cura dos painhos da Beira Baixa. Para as culturas puras, como acima referido, recolhemos amostras no T5 (5 dias de cura), no entanto, como a introdução do T2, optámos por manter o mesmo intervalo de tempo entre recolha de amostras, isto é, 5 dias.

As amostras para a determinação de amins biogénicas, aquando da chegada à Herdade da Mitra, foram imediatamente congeladas para posterior determinação.

Na Figura 7 esquematiza-se o plano de amostragem do ensaio de inoculação dos paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas mistas na concentração 10^8 células/grama de massa.

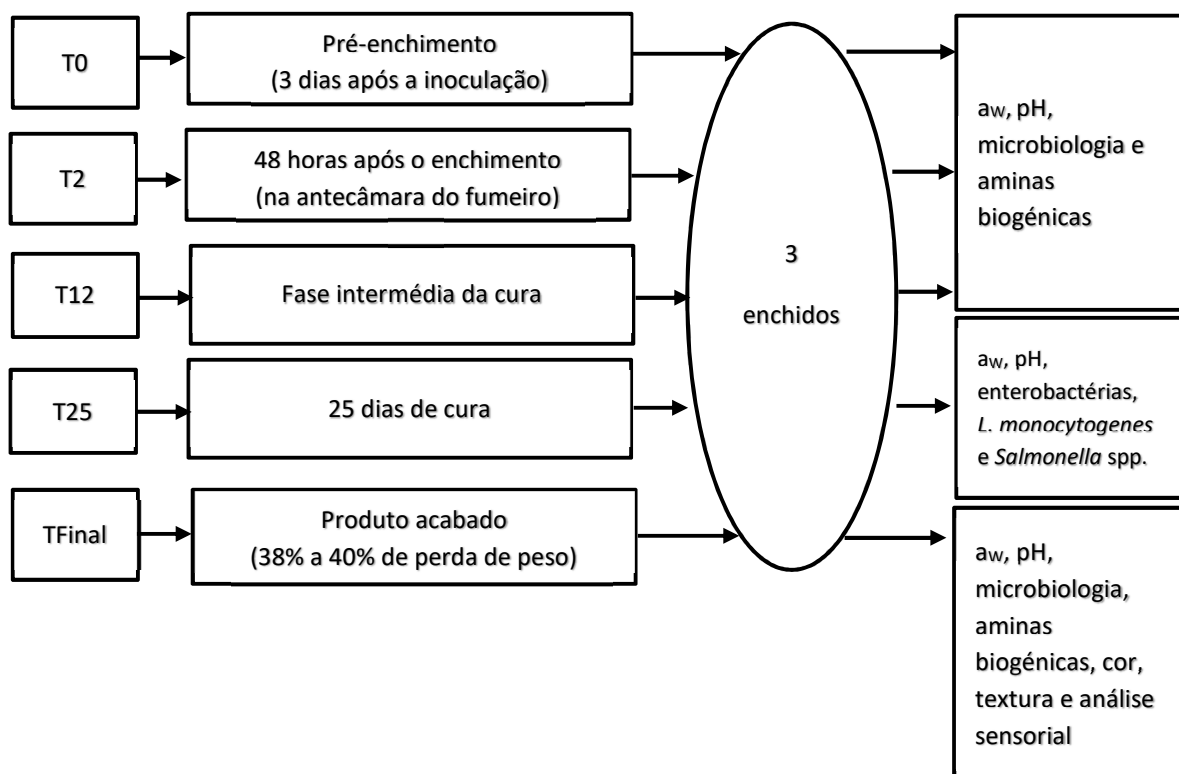


Figura 7 - Plano de amostragem efetuado no ensaio de inoculação dos paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas mistas na concentração 10^8 células/grama de massa.

- T2 - 48 h após o enchimento e imediatamente antes dos enchidos entrarem para a câmara de cura (48 h na antecâmara dos fumeiros). Durante o tempo mencionado os enchidos ficaram sujeitos a temperaturas entre os 14,3°C e os 21,2°C e a razão para a introdução deste tempo de amostragem foi a mesma que a indicada para os painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

- T12 - 12 dias de cura (a contar desde o dia do enchimento). O tempo mencionado refere-se à fase intermédia da cura dos paios de porco preto, do Alentejo. Para as culturas puras, como acima referido, recolhemos amostras no T10 (10 dias de cura), no entanto, como a introdução do T2, optámos por manter o mesmo intervalo de tempo entre recolha de amostras, isto é, 10 dias.

- T25 - 25 dias de cura (a contar desde o dia do enchimento). Como consequência do abaixamento da a_w e do pH o efeito das estirpes inoculadas poderá não ser tão evidente no final da cura, pelo que optámos por introduzir um tempo de amostragem intermédio com o objetivo de avaliar o efeito redutor das culturas sobre os indicadores de segurança (*L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.) e de higiene (enterobactérias).

As amostras para a determinação de aminas biogénicas, aquando da chegada à Herdade da Mitra, foram imediatamente congeladas para posterior determinação.

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Parâmetros físicos (temperatura, humidade relativa e perdas de peso)

As medições da temperatura e da humidade relativa das câmaras de maturação de ambas as fábricas, da câmara de cura da empresa do Alentejo, do fumeiro da empresa da Beira Baixa e das antecâmaras dos fumeiros de ambas as fábricas foram efetuadas com recurso a *Logger* da marca Ebro, modelo EBI-20 THP (Ingolstadt, Alemanha).

O cálculo da percentagem (%) de perda de peso decorreu de igual modo para os dois tipos de enchido. Pesámos 30 paios de porco preto, do Alentejo, ou painhos da Beira Baixa, aleatoriamente, de cada modalidade após o enchimento e fomos pesando ao longo do processo de cura, até atingirem 38% a 40% de perda de peso inicial.

As perdas de peso foram calculadas fazendo a diferença relativa entre o peso inicial de cada enchido e o respetivo peso final. Foi utilizada a seguinte fórmula: perda de peso em percentagem = $(P_i - P_x) * 100 / P_i$ em que P_i é o peso inicial e P_x é o peso final do enchido.

Os paios de porco preto, do Alentejo, foram pesados numa balança da marca Dini Argeo, modelo DFWXP-TT15 (Modena, Itália).

Os painhos da Beira Baixa foram pesados numa balança da marca DIGI, modelo DI-517SS (Tóquio, Japão).

4.5.2. Parâmetros físico-químicos

O pH e a a_w foram determinados nas amostras nos T0, T2, T5/T10, T7/T12, T25 e TFinal (38% a 40% perda de peso inicial).

O pH foi determinado de acordo com o método descrito na ISO 2917:1999. A leitura realizou-se com um potenciómetro digital da marca Crison, modelo Basic 20 (Barcelona, Espanha). O eletrodo utilizado foi da mesma marca e o modelo foi o 25-21.

Para realizar a determinação da atividade da água (a_w) recorreu-se ao equipamento específico Rotronic Hygroscop DT (Zurique, Suíça), com sonda WA-40 (Zurique, Suíça) mantida à temperatura de 25°C.

4.5.3. Parâmetros microbiológicos

De acordo com a legislação vigente, nomeadamente o Regulamento (CE) N.º 1441/2007, da Comissão de 5 de dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) N.º 2073/2005, da Comissão de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, o único parâmetro que temos de pesquisar para os produtos em causa é *Salmonella* spp. e o único parâmetro contável é *L. monocytogenes*, isto é, indicadores de segurança. Com base em trabalhos como os de Simion *et al.* (2014); Baka *et al.* (2011); Aro Aro *et al.* (2010); Elias & Carrascosa (2010); Latorre & Moratalla *et al.* (2010); Roseiro *et al.* (2010) e Casaburi *et al.* (2007) avaliámos ainda os diferentes indicadores de higiene e parâmetros tecnológicos indicados na Tabela 15.

Na Tabela 15 apresentamos os parâmetros microbiológicos determinados nas amostras de paios e painhos nos T0, T2, T5/T10, T7/T12, T25 e TFinal.

Tabela 15 - Parâmetros microbiológicos determinados em cada amostra.

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS		
Indicadores de segurança	Indicadores de higiene	Indicadores tecnológicos
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.*	Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais a 30°C (log ufc/g)	Contagem de <i>Lactobacillus</i> spp. (log ufc/g)
	Contagem de microrganismos psicotróficos (log ufc/g)	
Contagem de <i>L. monocytogenes</i> * (ufc/g)	Contagem de bolores (log ufc/g)	Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. (log ufc/g)
	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> * (log ufc/g)	Contagem de leveduras (log ufc/g)

Os parâmetros microbiológicos determinados no T25 encontram-se indicados com um asterisco (*).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a 25 g de amostra foram adicionados 225 mL de água peptonada (Scharlau - Barcelona, Espanha). A homogeneização foi realizada durante aproximadamente 90 segundos num *Stomacher Masticator* (IUL Instruments - Barcelona, Espanha) com sacos próprios para aquele efeito (Intersciense - Mourjou, França). Os mesmos foram a incubar a 37°C ± 1°C durante 16 a 22 horas em estufa (Memmert - Schwabach, Alemanha). De seguida, pipetámos 0,1 mL do conteúdo para o meio de enriquecimento de *Salmonella* Xpress 2 (SLMX), indo os mesmos a incubar durante 22 a 26 horas a 41,5°C ± 1°C em estufa. Após o tempo de incubação homogeneizámos e pipetámos 0,5 mL para barretes *Salmonella* (SLM) Vidas, as mesmas foram colocadas 15 minutos no Vidas *Heat & Go Dri-Block*® DB-3D (Techne - Stafforshine, Reino Unido), a 131°C, repousaram 10 minutos à temperatura ambiente, antes de serem colocadas no mini Vidas®. Simultaneamente, colocámos no equipamento os cones (SPR-Recipientes de fase sólida) correspondentes ao número de barretes. Os resultados foram obtidos em aproximadamente 45 minutos e o procedimento imunoenzimático foi levado a cabo pelo mini Vidas®. O meio de enriquecimento *Salmonella* Xpress 2 (SLMX), as barretes de *Salmonella* (SLM), os cones SPR e o mini Vidas® foram fornecidos pela bioMérieux (Marcy-l'Étoile, França).

Todos os resultados positivos foram confirmados de acordo com a Norma ISO 6579-1:2017.

Para os restantes parâmetros, às amostras de 10 g foram adicionados 90 mL de água peptonada (Scharlau - Barcelona, Espanha), (diluição 10⁻¹). A homogeneização foi realizada durante aproximadamente 90 segundos num *Stomacher Masticator* (IUL Instruments - Barcelona, Espanha) com sacos próprios para aquele efeito (Intersciense - Mourjou, França). Procedendo-se, posteriormente, à preparação de diluições decimais seriadas com água peptonada tamponada (Scharlau - Barcelona, Espanha).

Os resultados das contagens dos grupos microbianos determinados no presente trabalho foram expressos em log ufc/g, com exceção de *L. monocytogenes* para a qual foram expressos em ufc/g.

A contagem de colónias totais a 30°C foi efetuada de acordo com a ISO 4833-1:2013. A determinação foi realizada em placa com meio de cultura *Tryptone Glucose Extract* (TGE) Agar (Merck - New Jersey, USA). A incubação fez-se à temperatura de 30°C durante 48 h.

A contagem de microrganismos psicrotróficos foi efetuada de acordo com a ISO 17410:2001. A determinação foi realizada em placa com meio de cultura TGE (Merck - New Jersey, USA). As placas foram a incubar a 6,5°C durante 10 dias.

A contagem de *Staphylococcus* spp. foi efetuada de acordo com Talon *et al.* (2007a). A determinação foi realizada em placa com meio de cultura *Manitol Salt Agar* (MSA) (Scharlau - Barcelona, Espanha). A incubação fez-se durante 48 h a 37°C.

A contagem de *Lactobacillus* spp. foi efetuada de acordo com a ISO 15214:1998. A determinação foi realizada em placa com meio de cultura *Man, Rogosa & Sharpe* (MRS) Agar (Scharlau - Barcelona, Espanha). A incubação fez-se durante 72 h a 30°C em condições de anaerobiose, utilizando-se para o efeito uma jarra de anaerobiose (Oxoid - Cheshire, Inglaterra), gerador de gás e indicador de anaerobiose da mesma marca.

A contagem de bolores e leveduras foi efetuada de acordo com a ISO 21527-2:2008. A determinação foi realizada em placa com meio de cultura *Rose Bengal Chloramphenicol* Agar (Scharlau - Barcelona, Espanha). A incubação fez-se durante 48 h a 25°C; efetuou-se a contagem separada de colónias de bolores e de leveduras.

A contagem de *Enterobacteriaceae* foi efetuada de acordo com a ISO 21528-2:2017. A determinação foi realizada em placa com meio de cultura *Violet Red Bile Glucose* (VRBG) Agar (Scharlau - Barcelona, Espanha). A incubação decorreu a 30°C durante 48 h.

Para as contagens de *L. monocytogenes*, a partir da diluição 10⁻¹ e da diluição 10⁻² foi inoculado 0,1 mL do inóculo em placas contendo meio Agar *Listeria* de *Ottaviani & Agosti* (ALOA) (bioMérieux - Marcy-l'Étoile, França) de acordo com a ISO 11290-2: 2014 e com o auxílio de um semeador de vidro esterilizado o conteúdo foi homogeneamente distribuído pelas placas. As mesmas foram incubadas a 37°C por um período de 24 a 48 horas. Apenas foram contadas as colónias características (cor azul e/ou verde com halo transparente).

4.5.4. Determinação de aminas biogénicas

Na Tabela 16 apresentamos as aminas biogénicas determinadas em cada amostra nos T0, T2, T5/T10, T7/T12 e TFinal (38% a 40% de perda de peso inicial).

Tabela 16 - Aminas biogénicas determinadas em cada amostra.

Extração por amostra	Derivatização por amostra	Leituras em HPLC por amostra	Aminas biogénicas
2	4	8	Triptamina
			β -feniletilamina
			Putrescina
			Cadaverina
			Histamina
			Tiramina
			Espermidina
			Espermina

Parâmetros determinados de acordo com Roseiro (2006).

Importa lembrar que as amostras para a determinação de aminas biogénicas foram congeladas imediatamente após a recolha, pelo que foi necessário proceder à descongelação das mesmas.

Homogeneizámos 8 g de amostra em 40 mL de ácido perclórico 0,4 M (Panreac - Barcelona, Espanha) recorrendo a um homogeneizador da marca IKA, modelo T25 digital Ultra Turax e sonda da mesma marca com o modelo 18G-ST (Staufen im Breisgau, Alemanha). Centrifugaram-se as amostras a 5000 RPM durante 10 minutos, em ambiente refrigerado (4°C), numa centrífuga da marca Thermo Scientific Sorvall, modelo Lynx 4000 (Massachusetts, USA), rotor Fiberlite F14-6x250y da mesma marca e copos de centrífuga da marca Nalgene (Massachusetts, USA). De seguida, recolheu-se o sobrenadante e filtrou-se com recurso a papel de filtro Whatman n.º 42 (Maidstone, Reino Unido). O *pellet* resultante foi ressuspenso com 40 mL de ácido perclórico e foi centrifugado nas mesmas condições, sendo novamente depois o sobrenadante filtrado e combinado com o anterior. Ambos os filtrados foram colocados num balão de 100 mL. Adicionou-se 1 mL de padrão interno (1,7-diaminoheptano) (Merck - Nova Jersey, EUA) e perpez-se o balão com ácido perclórico 0,4 M. Todas as amostras foram realizadas em duplicado.

Para a derivatização dos estratos, retirou-se 1 mL do extrato da amostra e adicionou-se a esse volume 200 μ l de solução de hidróxido de sódio (2N) e 300 μ l de bicarbonato de sódio saturado. Em seguida adicionaram-se 2 mL de solução de cloreto de dansilo (na proporção de 5 mg/mL de acetona), preparada no próprio dia e sempre protegida da luz.

Os tubos onde se preparou a reação foram colocados numa estufa a 40°C por um período de 45 minutos. Terminado o tempo de incubação, adicionaram-se 100 μ l de amónia (Panreac - Barcelona, Espanha) para remoção do excesso de cloreto de dansilo e deixou-se repousar durante 30 minutos.

Decorrido esse tempo, todo o agente derivatizante em excesso foi consumido e adicionaram-se 1400 µL de acetonitrilo, HPLC-grade, (VWR - Pensilvânia, USA) para se obter um volume final de 5 mL e centrifugou-se numa centrífuga da marca Hettich, modelo Universal 32R (Kirchlengern, Alemanha) a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Filtrou-se com recurso a seringas Soft-Jet (Henke Sass Wolf - Tuttlingen, Alemanha) e uma membrana Acrodisc 25 mm GHP, GF 0,45 µm (Gelman Sciences, Inc.) para viels roscados e septos (VWR - Pensilvânia, USA) e injetou-se 20 µL no HPLC-DAD.

As aminas biogénicas foram separadas e quantificadas num sistema *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) da marca Thermo Scientific Dionex, modelo Ultimate 3000 (Massachusetts, EUA), equipado com uma bomba quaternária (HPLC Ultimate 3000 pump), extrator automático (Ultimate 3000 Autosampler), detetor de díodo Array (DAD) (Ultimate 3000 RS Diode Array detetor). O comprimento de onda foi ajustado para 254 nm e utilizou-se uma coluna de fase reversa RP-18 (5 µm de 4.0 x 125 mm e 100Å°) (Merck - Nova Jersey, EUA). Para a sua separação realizou-se um programa de eluição com uma mistura de acetato de amónio a 0,1 M (solvente A) e acetonitrilo (solvente B). O gradiente iniciou com 50% e terminou com 90% de acetonitrilo decorridos 23 minutos, com um fluxo de 1 mL min⁻¹ a temperatura de 25°C. O volume de injeção foi de 20 µL.

A identificação das aminas biogénicas foi realizada com recurso a padrões, na forma de sais hidroclicóricos (Dr. Ehrenstorfer - GmbH, Alemanha) de concentração conhecida.

Como referido na Tabela 16 a derivatização e quantificação das oito aminas biogénicas em estudo foram efetuadas de acordo com Roseiro (2006).

Relativamente à quantificação esta foi efetuada por calibração externa, através da integração das áreas obtidas de uma mistura de padrões individuais de concentração conhecida. As concentrações foram calculadas a partir das curvas de calibração obtidas através da razão entre as áreas dos picos cromatográficos das aminas padrão com diferentes concentrações [0-100 µg mL⁻¹].

O teor em aminas biogénicas foi expresso em mg kg⁻¹ de peso fresco.

A recolha e o tratamento dos dados cromatográficos foram efetuados utilizando o *software* Chromeleon versão 6.8 (Thermo Scientific Dionex - Massachusetts, USA).

4.5.5. Determinação objetiva da cor

Relembramos que os parâmetros da cor e da textura foram determinados apenas no TFinal (38% a 40% perda de peso inicial).

De cada amostra cortamos cinco fatias com um centímetro de espessura e com aproximadamente cinco centímetros de diâmetro.

As cinco medições por amostra (cinco fatias) decorreram à temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e foram determinadas com recurso a um colorímetro de refletância da marca Konica Minolta, modelo CR-400 (Osaka, Japão), controlado pelo programa Color Data Software CM-S100w Spetra Magic™ NX versão 2.40.0004 (Konica Minolta - Osaka, Japão), com o Iluminante D65 sendo o observador padrão/ângulo de incidência 2° e a área de 8 mm de diâmetro. O equipamento foi previamente calibrado, usando um padrão de referência branco com as coordenadas $Y= 86,8$, $x= -0,3171$, $y= 0,3242$. Foram medidas as coordenadas de cor $L^* a^* b^*$ e calculadas as C^* e H° , todas do sistema CIELab.

4.5.6. Parâmetros reológicos - Análise do perfil de textura

De cada amostra foram avaliadas cinco fatias com um centímetro de espessura e aproximadamente cinco centímetros de diâmetro.

Foi feita uma análise do perfil de textura (TPA) e determinados os seguintes parâmetros em cada fatia: dureza (N), adesividade ($\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$), coesividade, elasticidade, resiliência e mastigabilidade (N). Para efetuarmos estas determinações recorreremos a um Texturómetro da marca *Stable Micro Systems*, modelo TA-HD Plus (Godalming, Inglaterra).

Na Tabela 17 apresentamos as condições em que decorreram os ensaios.

Tabela 17 - Condições do ensaio para análise da textura.

Temperatura da sala	$20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
Tipo de ensaio	TPA
Nº de ciclos de compressão	2
<i>Trigger point</i>	0,01 N
<i>Hold time</i>	5 s
Velocidade do ensaio	1 mm/s
<i>Target unit</i>	Distância
<i>Target value</i>	10 mm
Tipo de sonda	Sonda cilíndrica plana com 1 cm^2 de área (P/1K)
Tipo de gráfico	Força (N) vs. Tempo (s)

Adaptado de Laranjo *et al.* (2015)

4.5.7. Análise sensorial

Os parâmetros de análise sensorial foram avaliados por um painel de provadores treinados da Universidade de Évora, constituído por dez elementos, cinco do sexo feminino e cinco do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 35 e 60 anos. Este painel foi selecionado e treinado de acordo com as diretrizes constantes da ISO 8586-1:1993.

As provas decorreram numa sala de análise sensorial preparada de acordo com as indicações constantes da ISO 8589:2012.

Trinta minutos antes da prova cortaram-se cinco fatias, por amostra, dos paios de porco preto, do Alentejo, e dos painhos da Beira Baixa, com três milímetros de espessura cada.

Os provadores avaliaram por dia, no máximo, seis enchidos (amostras), e de cada um provaram três fatias com as características indicadas no parágrafo anterior.

A ficha de análise sensorial, que se encontra no anexo 1, foi baseada numa análise quantitativa (0-100), em que 0 significa não detetado e 100 totalmente percecionado. No caso dos atributos intensidade da salga e dureza o valor ótimo esperado será de 50.

Apenas foram avaliados produtos acabados (T_{Final} - 38% a 40% de perda de peso inicial).

4.6. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram efetuadas no Statistica™ V.8.0 da Statsoft (StatSoft Inc., 1984 - 2007, Texas, USA). A identificação de *outliers* foi efetuada com recurso ao teste de *Grubbs* ($p < 0,05$).

Antes de efetuarmos as análises de variância e a comparação de médias aos resultados obtidos, considerando os fatores modalidade, tempo de amostragem e modalidade x tempo de amostragem, efetuámos análises de variâncias considerando apenas o fator lote. Esta ação teve como objetivo aferirmos se o mesmo foi ou não significativo sobre os parâmetros/variáveis em análise.

No tratamento dos resultados determinámos valores médios e desvios padrão para cada uma das modalidades estudadas ao longo da cura, isto para os parâmetros microbiológicos, amins biogénicas, pH e a_w . Posto isto, efetuámos uma análise de variância multifatorial. Quando o teste F da ANOVA foi significativo recorreremos ao Teste *Post Hoc Honest Significant Difference* (HSD) Tukey para comparação múltipla de médias. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$), de modo a verificar a existência ou não de diferenças significativas entre modalidades, tempo de amostragem e modalidade X tempo de amostragem. Comparando os níveis do fator tempo de amostragem dentro de cada nível do fator modalidade e os níveis do fator modalidade dentro de cada nível do fator tempo de amostragem.

No que concerne aos parâmetros da cor, textura e análise sensorial determinámos valores médios e desvios padrão para cada uma das modalidades apenas no produto acabado (38% a 40% de perda de peso inicial). Deste modo, efetuámos o teste paramétrico de análise de variâncias simples (*One-Way ANOVA*). Quando o teste F da ANOVA foi significativo recorreremos ao Teste *Post Hoc Honest Significant*

Difference (HSD) Tukey para comparação múltipla de médias. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$), de modo a verificar a existência ou não de diferenças significativas entre as modalidades.

5. APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Ensaio de inoculação em paios de porco preto, do Alentejo, com culturas puras de *Staphylococcus*

5.1.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)

Na Tabela 18 apresenta-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Tabela 18 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Variáveis	Fator	
	Lote	
	G.L.=2	
pH	F=2,7233 P=0,0667 ^{N.S.}	
a_w	F=21,1250 P=0,0000***	

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ***significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 18 permite concluir que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para a a_w e não foi significativo ($p \geq 0,05$) para o pH.

Os resultados da análise de variância não são totalmente inesperados, apesar das modalidades e as condições de cura serem idênticas, o facto dos lotes terem sido produzidos em datas diferentes e com matérias-primas distintas pode originar este tipo de variância.

Na Tabela 19 apresenta-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 19 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=2	G.L.=8
pH	F=2,4515 P=0,0450*	F=3861,9031 P=0,0000***	F=2,0794 P=0,0365*
a_w	F=1,4394 P=0,2199 ^{N.S.}	F=610,0769 P=0,0000***	F=4,0185 P=0,0001***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S.= Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; *** Significativo para $p < 0,001$

Observando a Tabela 19 pode inferir-se que o fator modalidade foi significativo ($p < 0,05$) para a variável pH e não significativo para a_w ($p \geq 0,05$). O fator tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) para as duas variáveis em análise. A interação entre fatores foi altamente significativa ($p < 0,001$) para a a_w e significativa ($p < 0,05$) para o pH.

Conclui-se que o efeito do fator tempo de amostragem foi superior sobre as variáveis em estudo, por comparação com o fator modalidade.

Na Tabela 20 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos paios de porco preto, inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 20 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros	
		pH	a_w
T0	1	5,79 ^A ± 0,02	0,971 ^{A,b} ± 0,005
	2	5,75 ^A ± 0,10	0,973 ^{A,ab} ± 0,004
	3	5,77 ^A ± 0,11	0,976 ^{A,a} ± 0,004
	4	5,75 ^A ± 0,07	0,963 ^{A,c} ± 0,009
	5	5,75 ^A ± 0,09	0,974 ^{A,ab} ± 0,003
T10	1	4,86 ^{C,ab} ± 0,09	0,947 ^{B,b} ± 0,009
	2	4,92 ^{C,a} ± 0,11	0,948 ^{B,ab} ± 0,011
	3	4,87 ^{C,ab} ± 0,10	0,951 ^{B,ab} ± 0,016
	4	4,84 ^{C,b} ± 0,05	0,956 ^{B,a} ± 0,006
	5	4,86 ^{C,ab} ± 0,14	0,953 ^{B,ab} ± 0,014
TFinal	1	4,99 ^B ± 0,09	0,885 ^{C,a} ± 0,044
	2	5,01 ^B ± 0,08	0,872 ^{C,ab} ± 0,036
	3	5,05 ^B ± 0,14	0,852 ^{C,b} ± 0,065
	4	5,00 ^B ± 0,08	0,883 ^{C,a} ± 0,025
	5	5,00 ^B ± 0,08	0,873 ^{C,ab} ± 0,033

T0 (pré-enchimento); **T10** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo; **2** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^3 células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^6 células/g); **4** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^3 células/g); **5** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A análise da Tabela 20 permite concluir que existiram diferenças significativas para o pH ao longo do processo produtivo, os valores baixaram do T0 (pré-enchimento) para o T10 (fase intermédia da cura) e depois subiram ligeiramente no produto acabado. No que concerne a uma avaliação por tempo de amostragem, no T0 não existiram diferenças significativas entre modalidades. Os valores médios variaram entre $5,75 \pm 0,07$ e $5,77 \pm 0,11$, nas massas inoculadas; na modalidade controlo o valor médio do pH foi de $5,79 \pm 0,02$. Na fase intermédia da cura (T10), como seria expectável, os valores de pH reduziram-se de forma considerável em todas as modalidades. Esta redução deveu-se,

presumivelmente, à formação de ácidos orgânicos, principalmente láctico, como resultado da degradação dos hidratos de carbono durante a fermentação, tal como escreveram Zaho *et al.* (2011) e Aro Aro *et al.* (2010). Os paios inoculados com a estirpe *S. equorum* S2M7 10^3 (modalidade 4) apresentaram um valor médio ($4,84 \pm 0,05$) significativamente inferior aos da modalidade 2 (*S. equorum* 5MSA4 10^3), valor que foi de $4,92 \pm 0,11$. No produto acabado não existiram diferenças significativas entre modalidades. Porém, as modalidades 2 e 3, ou seja, as inoculadas com *S. equorum* 5MSA4, em ambas as concentrações, apresentaram valores médios de pH ligeiramente superiores às restantes. Importa referir que no produto acabado, verificou-se, para todas as modalidades, um ligeiro aumento dos valores médios do pH em relação à fase anterior (T10). Lorenzo & Franco (2012); Ruiz-Moyano *et al.* (2011) e Bover-Cid *et al.* (1999) também observaram aquele aumento nos estudos que executaram em enchidos. Gonzalez-Fernandez *et al.* (2003) atribuíram tal facto à ação da microbiota com capacidade para desencadear a proteólise, principalmente bactérias e eventualmente bolores. Ruiz-Moyano *et al.* (2011) e Elias & Carrascosa (2010) complementam a informação dos autores referidos com a ação das proteases endógenas, com consequente formação de péptidos, aminoácidos livres, aminas e amoníaco, entre outros, aumentando deste modo a concentração de substâncias tampão. Flores *et al.* (1997) referem que, nesta fase do processo, as leveduras também poderão ser responsáveis pela subida dos valores do pH. Patarata (2002) refere que, em termos tecnológicos, não é de excluir a hipótese da perda de ácido acético associada à cinética da desidratação contribuir para o referido aumento do pH.

Tendo em conta os resultados médios que acabámos de analisar, relativamente a resultados obtidos por outros autores, Elias (2004) realizou dois ensaios em paios de porco Alentejano inoculados com *S. xylosus* 8M, na concentração aproximada de 10^8 células/g de massa, e não adicionou dextrose alimentar; obteve valores médios de $5,37 \pm 0,02$ nas massas controlo e $5,36 \pm 0,02$ nas congéneres inoculadas, isto num primeiro ensaio. Num segundo ensaio com condições semelhantes obteve valores médios de $6,04 \pm 0,56$ nas massas controlo e $5,33 \pm 0,14$ nas inoculadas com a estirpe mencionada. Na fase intermédia da cura os valores aumentaram, aproximando-se de 5,60, tanto nos paios não inoculados como nos inoculados, no primeiro ensaio, e $5,98 \pm 0,24$ para os paios inoculados no segundo ensaio, enquanto os paios não inoculados, no segundo ensaio, apresentaram uma redução para $5,80 \pm 0,11$. No produto acabado do primeiro ensaio obteve valores médios de $5,76 \pm 0,01$ e $5,82 \pm 0,01$ para os paios não inoculados e inoculados, respetivamente. Num segundo ensaio, obteve valores médios de $5,76 \pm 0,15$ e $5,61 \pm 0,04$ para os paios não inoculados e controlo, respetivamente. Elias & Carrascosa (2010) obtiveram em paios de porco Alentejano prontos a consumir, não inoculados e sem açúcar adicionado, o valor médio $5,5 \pm 0,4$.

Bover-Cid *et al.* (1999) produziram *fuet* - enchido tradicional Espanhol - e inocularam três estirpes do género *Staphylococcus*, sendo elas *S. carnosus* LTH 2102, *S. xylosus* CTC 3037 e *S. xylosus* CTC 3050. A concentração microbiana inoculada foi de aproximadamente 10^6 células/g de massa e foi adicionada dextrose (0,7%) e lactose (1,0%). Nas massas, os resultados obtidos pelos autores iniciaram-se em torno de 5,9 para todas as modalidades de inoculação, incluindo a controlo. Na fase intermédia da cura alternaram entre os 5,5, para os enchidos inoculados com *S. xylosus* CTC 3037, e 5,7, para os inoculados com *S. xylosus* CTC 3050. No produto acabado foram os enchidos não inoculados que apresentaram os valores médios mais reduzidos, cabendo a estes o valor de 5,6, enquanto os inoculados com *S. xylosus* CTC 3050 se aproximaram de 5,8.

Aro Aro *et al.* (2010) obtiveram, em enchidos japoneses (curiosamente com uma tecnologia semelhante à por nós usada), valores médios próximos de 5,9, quer para as massas não inoculadas (controlo), quer para as inoculadas com uma estirpe de *S. xylosus* (cultura comercial S-Sx Bactoferm™ - Dinamarca). Aqueles valores não sofreram alterações na fase intermédia da cura e nem mesmo no produto acabado (21 dias de cura), revelando a inexistência de diferenças com significado estatístico entre enchidos inoculados e o grupo controlo. Os autores citados utilizaram a concentração microbiana aproximada de 10^7 células/g de massa, adicionaram glucose (1,0%) às massas e certamente não utilizaram carne e gordura de porco preto, a indicação presente no artigo científico consultado é a de utilização de carne magra de porco.

Fonseca *et al.* (2013) obtiveram valores médios de $5,95 \pm 0,13$ nas massas de chouriço galego (Galiza) não inoculado, $6,13 \pm 0,12$ na fase intermédia da cura e $6,13 \pm 0,16$ no produto acabado.

Dos autores citados, apenas Elias (2004) apresentou valores de pH inferiores aos por nós determinados no pré-enchimento. No entanto, a meio da cura esta situação inverteu-se, passando os paios produzidos neste estudo (não inoculados e inoculados) a apresentarem valores médios de pH bastante inferiores aos do autor mencionado, 4,84-4,92 face a 5,54-5,98. A mesma tendência foi observada no produto acabado, pois os valores médios obtidos no presente estudo situaram-se entre 4,99-5,05 e os do autor entre 5,76-5,82.

Desta forma podemos afirmar que os paios produzidos neste ensaio dispõem de um valor de pH que contribuirá para a segurança alimentar de uma forma mais efetiva, face aos resultados determinados pelos diversos autores mencionados. Os resultados por nós obtidos sugerem que, provavelmente, os *Lactobacillus* naturalmente presentes (autóctones) no ambiente fabril onde os paios foram produzidos dispõem de uma atividade acidificante superior aos dos utilizados pelos autores mencionados, uma vez que *Staphylococcus* spp. (estirpes inoculadas) não são reconhecidos principalmente pela ação acidificante. Apesar de Cocconceli & Fontana (2015) e Toldrá (2008) referirem que *Staphylococcus*

também usam os hidratos de carbono, mas de forma mais lenta e em menores quantidades. Todavia, valores muito baixos de pH poderão originar enchidos excessivamente ácidos que se tornarão desagradáveis na avaliação sensorial. Roseiro *et al.* (2010) apontam o valor de 5,20 como o limite de segurança para os enchidos serem considerados de baixo teor de ácido. Porém, Bozkurt & Erkman (2002) indicam o intervalo de valores de 4,7 a 5,2 como sendo o indicado para enchidos curados de elevada qualidade. Os valores médios do pH no produto acabado, de todas as modalidades, couberam no intervalo indicado. No entanto, foram inferiores ao indicado por Roseiro *et al.* (2010), revelando que, segundo aqueles autores, os enchidos não são de baixo teor de ácido.

Deve ter-se em conta que o pH dos enchidos é influenciado pelos microrganismos que constituem a cultura de arranque, mas também pela microbiota que está naturalmente presente nas matérias-primas, restantes ingredientes e em todo o ambiente fabril.

Quanto aos valores da a_w , como seria expectável, houve uma redução ao longo do processo de cura, consequentemente existiram diferenças significativas entre tempos de amostragem. Efetuando uma análise isolada por tempo de amostragem, para o T0, verificamos que as massas apresentaram valores muito próximos. Na fase intermédia da cura (T10) foram as modalidades 1 (controlo) e 2 (*S. equorum* 5MSA4 10^3) aquelas que apresentaram paios com valores médios inferiores aos restantes, $0,947 \pm 0,009$ e $0,948 \pm 0,011$, respetivamente. No produto acabado os paios inoculados com *S. equorum* 5MSA4 10^6 (modalidade 3) apresentaram um valor médio ($0,852 \pm 0,065$) significativamente mais reduzido que os das modalidades 1 e 4 (*S. equorum* S2M7 10^3), que apresentaram valores médios de $0,885 \pm 0,044$ e $0,883 \pm 0,025$, respetivamente. Denotando que a estirpe *S. equorum* 5MSA4 10^6 (modalidade 3) teve um efeito positivo no tempo de cura, isto é, conseguiu acelerar o processo produtivo, tal como verificaram Bingol *et al.* (2014) e Bingol *et al.* (2011) em enchidos turcos tipo *Sucuk*. Como referido ao longo do capítulo revisão bibliográfica, *Staphylococcus* spp. são referidos como microrganismos que aceleram os processos de cura, devido essencialmente à sua ação proteolítica. Esta ação poderá acelerar a perda de água e gerará a acumulação de metabolitos que, conjuntamente, contribuirão para o decréscimo da a_w . Outra conclusão que se retira é que os paios inoculados com a concentração aproximada de 10^6 células/g de massa, para ambas as estirpes, apresentaram valores médios inferiores para a a_w , por comparação com os inoculados com 10^3 células/g de massa.

Fonseca *et al.* (2013); Elias & Carrascosa (2010); e Elias (2004), nas condições citadas na discussão dos resultados obtidos para os valores de pH, obtiveram valores médios para a a_w , no produto acabado, ao contrário do que sucedera para o pH, inferiores aos por nós determinados. Os valores obtidos por aqueles autores rondaram os 0,82. Tal facto deveu-se, presumivelmente, aos tempos de cura usados por aqueles autores, superiores aos do presente ensaio. Contudo, Hierro *et al.* (2015) apontam valores

inferiores a 0,90 para a a_w e a 5,5 para o pH, como sendo os indicados para manter um elevado nível de higiene alimentar em enchidos. Leistner & Rodel (1975) referiram que produtos com um $pH \leq 5,2$ e $a_w \leq 0,95$ ou somente $pH < 5,0$ ou $a_w < 0,91$, são produtos que não necessitam de temperaturas de refrigeração para se manterem estáveis. Tendo em conta os critérios apresentados por Hierro *et al.* (2015) e Leistner & Rodel (1975), concluímos que os enchidos produzidos no corrente ensaio poderão ser conservados à temperatura ambiente.

5.1.2. Parâmetros microbiológicos

Na Tabela 21 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Tabela 21 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Mesófilos	F=0,1652 P=0,8485 ^{N.S.}
Psicotróficos	F=5,933 P=0,0038**
Bactérias láticas	F=1,3433 P=0,2663 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus spp.</i>	F=3,6062 P=0,0313*
Enterobactérias	F=4,4550 P=0,0144*
Bolores	F=9,0226 P=0,0003***
Leveduras	F=2,5746 P=0,0820 ^{N.S.}
<i>L. monocytogenes</i>	F=25,9556 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$;
 *** Significativo para $p < 0,001$

A observação da Tabela 21 permite concluir que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para as contagens de bolores e de *L. monocytogenes*, muito significativo ($p < 0,01$) para microrganismos psicotróficos, significativo ($p < 0,05$) para *Staphylococcus spp.* e enterobactérias e não foi significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis. A microbiota pode ser influenciada por múltiplos fatores, facto que se confirma com a variabilidade existente entre os três lotes produzidos neste ensaio.

Na Tabela 22 apresenta-se a análise de variância para os parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 22 - Análise de variância para os parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=2	G.L.=8
Mesófilos	F=0,8089 P=0,5234 ^{N.S.}	F=28,7144 P=0,0000***	F=0,3652 P=0,9356 ^{N.S.}
Psicrotróficos	F=0,1583 P=0,9587 ^{N.S.}	F=35,5971 P=0,0000***	F=0,0937 P=0,9993 ^{N.S.}
Bactérias lácticas	F=1,1161 P=0,3553 ^{N.S.}	F=313,9932 P=0,0000***	F=0,3818 P=0,9272 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus</i> spp.	F=2,0673 P=0,0935 ^{N.S.}	F=7,3696 P=0,0012***	F=2,0602 P=0,0504 ^{N.S.}
Enterobactérias	F=0,4547 P=0,7687 ^{N.S.}	F=156,1329 P=0,0000***	F=0,2992 P=0,9641 ^{N.S.}
Bolores	F=0,8904 P=0,4740 ^{N.S.}	F=1,2867 P=0,2822 ^{N.S.}	F=1,10368 P=0,4165 ^{N.S.}
Leveduras	F=1,0750 P=0,3750 ^{N.S.}	F=43,3495 P=0,0000***	F=1,3605 P=0,2279 ^{N.S.}
<i>L. monocytogenes</i>	F=0,8961 P=0,4707 ^{N.S.}	F=3,1968 P=0,0465*	F=0,4069 P=0,9132 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S.= Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; *** Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 22 leva-nos a concluir que o fator modalidade não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis em estudo. Entre tempos de amostragem apenas a contagem de bolores não apresentou diferenças significativas ($p \geq 0,05$), para as contagens de microrganismos mesófilos, psicrotróficos, bactérias lácticas, *Staphylococcus* spp., enterobactérias e leveduras foi altamente significativo ($p < 0,001$) e significativo ($p < 0,05$) para *L. monocytogenes*. A interação modalidade x tempo de amostragem não foi significativa ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas, logo a ação de cada um dos fatores será independente, isto é, não se influenciam mutuamente. Conclui-se que o fator modalidade teve pouca influência sobre as variáveis estudadas e que a existência de diferenças ao longo do tempo de amostragem/fases do fabrico são normais e aceitáveis, resultando das múltiplas modificações que ocorrem com a evolução da cura dos produtos.

Na Tabela 23 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paços de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 23 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Parâmetros										
Tempo de amo.	Modalidade	Mesófilos	Psicrotóficos	Bactérias lácticas	<i>Staphylococcus</i> spp.	Enterobactérias	Bolores	Leveduras	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
T0	1	5,63 ^B ±1,02	5,85 ^{AB} ±0,67	4,52 ^B ±0,52	5,87 ±0,98	5,56 ^A ±0,79	0,37 ±0,57	3,73 ^{AB} ±0,72	25,83 ±39,30	ND
	2	5,60 ^B ±0,34	5,78 ^{AB} ±0,43	4,52 ^B ±0,62	6,01 ±0,65	5,26 ^A ±0,63	1,05 ±0,88	3,42 ^B ±0,50	19,17 ±24,36	1
	3	6,00 ±0,69	5,96 ^{AB} ±0,40	4,56 ^B ±0,50	6,12 ±0,72	5,54 ^A ±0,70	0,53 ±0,83	3,69 ±0,39	19,17 ±28,53	ND
	4	5,81 ^B ±0,57	5,90 ^{AB} ±0,42	4,19 ^B ±0,49	6,31 ^{AB} ±0,63	5,30 ^A ±0,77	0,93 ±1,02	3,56 ^B ±0,50	33,33 ±52,59	1
	5	5,88 ^B ±0,63	5,94 ^{AB} ±0,56	4,70 ^B ±0,88	6,25 ^B ±0,97	5,43 ^A ±0,71	<1	3,84 ^B ±0,27	11,17 ±24,00	ND
T10	1	7,15 ^A ±0,30	7,14 ^A ±0,21	7,02 ^A ±0,35	6,87 ±0,90	5,04 ^A ±0,65	0,33 ±0,82	4,49 ^A ±0,51	37,50 ±20,92	ND
	2	6,94 ^A ±0,42	7,04 ^A ±0,23	7,10 ^A ±0,51	7,42 ±1,43	5,00 ^A ±0,22	0,50 ±1,22	4,94 ^A ±0,27	20,00 ±14,14	ND
	3	7,09 ±0,97	7,20 ^A ±0,24	7,15 ^A ±0,46	6,94 ±0,75	5,12 ^A ±0,64	1,38 ±1,54	4,74 ±0,83	22,51 ±26,97	ND
	4	7,13 ^A ±0,56	7,16 ^A ±0,19	7,30 ^A ±0,71	7,19 ^A ±1,21	4,97 ^A ±0,81	0,38 ±0,94	4,81 ^A ±0,46	22,50 ±18,10	ND
	5	7,29 ^A ±0,58	7,36 ^A ±0,65	7,47 ^A ±0,85	7,11 ^{AB} ±1,05	4,91 ^A ±0,58	1,00 ±1,55	4,92 ^A ±0,30	15,83 ±17,44	ND
TFinal	1	5,57 ^B ±0,83	4,81 ^B ±1,43	7,54 ^A ±0,25	6,10 ±1,43	2,44 ^B ±0,63	0,95 ±1,09	2,75 ^B ±1,00	2,50 ±4,18	ND
	2	6,15 ^{AB} ±0,89	5,08 ^C ±1,69	7,54 ^A ±0,34	5,63 ±1,39	1,75 ^B ±0,99	1,58 ±1,25	3,28 ^B ±0,46	5,00 ±8,36	ND
	3	6,30 ±0,85	5,33 ^B ±0,83	7,46 ^A ±0,20	6,64 ±0,70	1,67 ^B ±1,37	0,87 ±0,03	3,93 ±1,55	15,00 ±18,44	ND
	4	5,89 ^B ±0,77	4,94 ^B ±1,55	7,57 ^A ±0,26	5,62 ^B ±0,89	2,04 ^B ±1,14	1,05 ±0,97	3,19 ^B ±0,73	16,66 ±29,26	ND
	5	6,26 ^{AB} ±0,96	4,95 ^B ±1,56	7,82 ^A ±0,24	8,05 ^A ±1,29	1,87 ^B ±1,14	0,53 ±0,85	2,75 ^C ±0,54	3,33 ±2,58	ND

T0 (pré-enchimento); **T10** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo; **2** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10³ células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10⁶ células/g); **4** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10³ células/g); **5** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g).

Listeria monocytogenes apresenta-se em ufc/g. Os restantes parâmetros contáveis apresentam-se em log ufc/g.

Os valores indicados para *Salmonella* spp. referem-se ao número de resultados positivos em 6 amostras.

<1 - Contagens inferiores a uma unidade formadora de colónia por grama (ufc/g).

ND - Não detetado (ausência em 25g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

A contagem de microrganismos mesófilos, cuja origem e comportamento das populações nos enchidos é bastante heterogénea, não constitui um indicador seguro do tipo de populações presentes nos géneros alimentícios, porque inclui microrganismos indesejáveis, capazes de produzir alterações depreciativas nos géneros alimentícios e microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares, juntamente com microrganismos de interesse tecnológico, onde se incluem as bactérias lácticas e os *Staphylococcus* spp.

Observando a Tabela 23 podemos inferir que para a contagem de microrganismo mesófilos, ao longo do tempo de amostragem, de uma forma geral, existiram algumas diferenças com significado estatístico, principalmente entre o T0 (pré-enchimento) e o T10 (fase intermédia da cura), notando-se um ligeiro incremento da concentração deste grupo microbiano. Avaliando isoladamente cada tempo de amostragem, não se observaram diferenças entre modalidades em nenhum dos tempos. Porém, no produto acabado os enchidos não inoculados (controlo) apresentaram contagens de mesófilos inferiores, ainda que sem significado estatístico, aos inoculados.

Lorenzo *et al.* (2014) e Baka *et al.* (2011) referem que as contagens de microrganismos mesófilos, bactérias lácticas e *Staphylococcus* no início da cura poderão estar relacionadas com a inoculação de culturas de arranque, ou seja, poderão sofrer incrementos significativos. O que não se observou no corrente estudo, provavelmente por razões competitivas.

No que concerne a resultados obtidos por outros autores, no pré-enchimento, Elias (2004), quando inoculou *S. xylosus* 8M em paios de porco Alentejano, numa concentração próxima de 10^8 células/g de massa e sem açúcar adicionado, obteve valores médios para mesófilos de 7,23 log ufc/g para os paios controlo, ou seja, não inoculados, e 8,06 log ufc/g para os paios inoculados, isto num primeiro ensaio. Num segundo ensaio produzido com condições semelhantes ao primeiro, obteve 7,78 log ufc/g para os paios não inoculados e 8,78 log ufc/g para os paios inoculados. Aro Aro *et al.* (2010) obtiveram resultados de 3,92 log ufc/g para os enchidos controlo e próximos de 6,50 log ufc/g para os inoculados com *S. xylosus* (cultura comercial S-Sx Bactoferm™ - Dinamarca) com uma concentração microbiana aproximada de 10^7 células/g de massa e 1% de glucose adicionada. Roseiro *et al.* (2010) obtiveram em chouriço grosso de Estremoz e Borba, IGP, não inoculados, um valor médio de 3,82 log ufc/g. Fonseca *et al.* (2013) indicaram um valor de 5,24 log ufc/g de massa em chouriço galego (Galiza) não inoculado e Elias & Carrascosa (2010) obtiveram valores médios de 6,2 log ufc/g em paios do Alentejo não inoculados e sem açúcar adicionado, mas produzidos com condições semelhantes às do corrente ensaio.

Os resultados obtidos no presente estudo para os paios não inoculados foram inferiores aos de Elias (2004), semelhantes aos de Fonseca *et al.* (2013) e Elias & Carrascosa (2010) e superiores aos dos restantes autores. Todavia, os inoculados foram inferiores aos apresentados pelos autores que efetuaram inoculações com culturas puras de *Staphylococcus*, ou seja, Aro Aro *et al.* (2010) e Elias (2004). Mas é de referir que Elias (2004) também não observou diferenças significativas entre os enchidos controlo e inoculados.

Na fase intermédia da cura, a par do presente estudo, todos os autores mencionados, com exceção de Elias & Carrascosa (2010), observaram um incremento deste grupo microbiano, verificando-se

variações entre os 0,5 log ufc/g e os 3 log ufc/g. Os valores obtidos por Elias & Carrascosa (2010) sofreram uma redução para próximos dos log ufc/g.

No corrente estudo, os resultados obtidos no produto acabado, independentemente da modalidade, aproximaram-se dos valores indicados para o pré-enchimento (6,0 log ufc/g), enquanto Fonseca *et al.* (2013), Roseiro *et al.* (2010) e Elias (2004) obtiveram valores médios próximos dos 8,5 log ufc/g. Aro *et al.* (2010) apresentaram valores médios próximos do 7,0 log ufc/g para os enchidos inoculados e 6,0 log ufc/g para os não inoculados, mais próximos dos obtidos neste estudo. O mesmo foi verificado por Elias & Carrascosa (2010).

Nas contagens de microrganismos psicrotróficos observaram-se reduções nas contagens entre o T10 e o produto acabado, cabendo os valores médios significativamente inferiores ao último tempo de amostragem. As contagens determinadas neste trabalho para microrganismos psicrotróficos foram semelhantes às obtidas para os mesófilos até ao T10 (fase intermédia da cura), ou seja, próximas dos 6,0 log ufc/g no T0 (pré-enchimento), próximas dos 7,0 log ufc/g no (T10) e próximas de 5,0 log ufc/g no produto acabado, tendo sido neste último tempo que as contagens de microrganismos psicrotróficos foram inferiores às de mesófilos. Alguns dos autores citados não determinaram psicrotróficos nos seus estudos. No entanto, Elias (2004) e Elias & Carrascosa (2010) determinaram. O primeiro obteve valores semelhantes aos por nós contados, com exceção do produto acabado onde quantificou valores próximos de 7,5 log ufc/g, num primeiro ensaio, mas num segundo ensaio obteve valores em todos os tempos de cura próximos de 8,0 log ufc/g. Já os segundos autores, para paços do Alentejo, indicaram valores médios de 5,3 log ufc/g para as fases do pré-enchimento e fase intermédia da cura e 5,7 log ufc/g para o produto acabado. Estes resultados vão ao encontro do referido por Benito *et al.* (2007), isto é, as contagens de microrganismos psicrotróficos, normalmente, neste tipo de enchido, são inferiores às de microrganismos mesófilos.

Para as contagens de bactérias lácticas existiram diferenças significativas entre o T0 e os tempos de amostragem que lhe sucederam, verifica-se que no T0 a concentração foi significativamente mais reduzida que nos tempos T10 e TFinal. No T0 não existiram diferenças entre modalidades e o mesmo se verificou para os restantes tempos de amostragem, algo perfeitamente aceitável porque não inoculámos estirpes de bactérias lácticas.

Em enchidos chineses produzidos com uma tecnologia semelhante à usada no presente estudo, mas certamente com matéria-prima distinta, Xie *et al.* (2015) obtiveram, para contagens de bactérias lácticas, valores de 4,40 log ufc/g e 3,71 log ufc/g em massas inoculados com uma estirpe de *S. xylosum* e não inoculados, respetivamente. É de realçar que os autores inocularam uma concentração aproximada de 10^5 células/g de massa e adicionaram 1% de glucose às massas. Na fase intermédia da

cura e no produto acabado obtiveram valores próximos de 10,0 log ufc/g, quer para os enchidos controlo quer para os inoculados com *S. xylosus*. Bover-Cid *et al.* (1999) produziram 3 lotes de *fuet* - enchido tradicional espanhol -, cada um deles inoculado com uma de três estirpes do género *Staphylococcus*, sendo elas *S. carnosus* LTH 2102, *S. xylosus* CTC 3037 e *S. xylosus* CTC 3050, a concentração microbiana inoculada foi de aproximadamente 10⁶ células/g de massa, adicionaram 0,7% de dextrose e 1% de lactose e obtiveram valores médios próximos dos 5,5 log ufc/g, independentemente da modalidade, antes do enchimento e valores na ordem dos 8,5 log ufc/g na fase intermédia da cura e produto acabado, para todos os enchidos, valores próximos dos obtidos por Elias (2004) e Roseiro *et al.* (2010) no produto acabado. Aro Aro *et al.* (2010) obtiveram valores próximos dos 6 log ufc/g em enchidos Japoneses prontos a consumir e Elias & Carrascosa (2010) 7,7 log ufc/g para paios de porco Alentejano não inoculados e sem açúcar adicionado. Os nossos resultados iniciaram-se próximos dos 4,5 log ufc/g, passaram a 7,0 log ufc/g na fase intermédia da cura e fixaram-se em torno de 7,5 log ufc/g no produto acabado, independentemente da modalidade. Posto isto, concluímos que os paios (produto acabado) produzidos neste estudo apresentaram valores próximos dos da maioria dos autores citados.

Para um número considerável de autores, incluindo os mencionados no parágrafo anterior, as bactérias lácticas são o grupo microbiano que, a partir de determinado momento da cura, se apresenta em maior número nos enchidos cárneos fermentados (Ravyts *et al.*, 2012, 2010; Babić *et al.*, 2011). Porém, Armengol *et al.* (1994) e Sarra *et al.* (1982) observaram concentrações superiores de *Staphylococcus* spp. em enchidos (produto acabado). Julgamos que esta situação poderá ocorrer se o substrato para as bactérias lácticas não for muito rico em nutrientes e se as concentrações de nitratos forem elevadas, pois neste caso *Staphylococcus* spp. não ficam tão expostos a uma acidificação violenta do meio. Neste ensaio as concentrações foram semelhantes entre bactérias lácticas e *Staphylococcus* spp., com exceção do T0 onde os últimos se destacaram por terem sido inoculados.

As contagens de *Staphylococcus* spp. evidenciam que não existiram diferenças muito pronunciadas, ao nível estatístico, no decorrer da cura, apesar de ter existido um ligeiro incremento do T0 para o T10 e, de uma forma geral, no produto acabado ter existido um ligeiro decréscimo. Benito *et al.* (2007) e Martín *et al.* (2007) também puderam observar este comportamento para *Staphylococcus* spp. Uma avaliação isolada por tempo de amostragem permite inferir que não foram exibidas diferenças significativas entre modalidades. Apesar disso, no produto acabado a modalidade 5 (*S. equorum* S2M7 10⁶) apresentou um valor médio (8,05 ± 1,29 log ufc/g) superior às restantes modalidades. Importa salientar que no T0, apesar de termos inoculado as estirpes em concentrações aproximadas de 10³ e 10⁶ células/g de massa, não existiram diferenças entre modalidades, todas apresentaram contagens

próximas dos 6 log ufc/g. Os paços de controlo apresentaram um valor médio de $5,87 \pm 0,98$ log ufc/g e os inoculados variaram entre $6,01 \pm 0,65$ log ufc/g e $6,31 \pm 0,63$ log ufc/g. Como as amostras não foram colhidas após a inoculação, mas após 72 horas de maturação, pressupomos que as estirpes inoculadas não se irão “somar” às instaladas mas, sobretudo, substituí-las por exclusão competitiva. Daí não terem existido diferenças entre os enchidos inoculados e os de controlo. Todavia, poder-se-ia colocar a questão da viabilidade microbiana, porque também não existiram diferenças entre os enchidos inoculados com 10^3 e 10^6 células/g de massa. Porém, excluímos essa possibilidade, porque a mesma foi atestada mediante sementeira em placas de diluições decimais de amostras de inóculo, recolhidas antes da inoculação das massas de carne. O facto das estirpes ficarem sujeitas a temperaturas de refrigeração durante as 72 horas de maturação poderá, eventualmente, ter contribuído para a perda de viabilidade microbiana, até porque as estirpes foram testadas a 7 °C (M. Laranjo, comunicação pessoal; M.J. Fraqueza, comunicação pessoal) e as massas dos enchidos ficaram a maturar a temperaturas de refrigeração (3°C a 5°C), para além de Abis (2018) referir que as espécies *S. equorum* tem dificuldades em multiplicar-se a temperaturas inferiores a 6°C. Os fatores pH e concentração de NaCl são de extrema importância, mas não nos parecem ter condicionado a multiplicação das estirpes, porque as mesmas foram testadas à temperatura referida, com a concentração de 6% de NaCl e a pH 5,0 e multiplicaram-se.

Alguns autores como Xie *et al.* (2015), em enchidos fermentados chineses, Patarata (2002), em linguiça transmontana e Bover-Cid *et al.* (1999), em *fuet* espanhol, recorrendo a inoculações com concentrações aproximadas de 10^5 células/g de massa, no caso dos primeiros autores citados, e 10^6 células/g de massa para os restantes autores, observaram, imediatamente após a inoculação, e não no pré-enchimento, como ocorreu no nosso estudo, contagens para *Micrococcaceae* inferiores às teoricamente esperadas, de referir que Xie *et al.* (2015) referem que contaram *Micrococcaceae/Staphylococcaceae*. Nas datas em que Patarata (2002) e Bover-Cid *et al.* (1999) desenvolveram os seus estudos o género *Staphylococcus* estava integrado na família *Micrococcaceae*, daí os autores terem apresentado os resultados daquela forma, todavia, tendo em conta a microbiota que habitualmente está presente em enchidos, a maioria das colónias seriam, certamente, referentes a *Staphylococcus* spp. A possibilidade referida pelos autores para as contagens terem sido inferiores às concentrações inoculadas prende-se com a perda de microrganismos viáveis até o culminar do processo de preparação da mistura das massas. Lizaso *et al.* (1999), após ter colocado as massas inoculadas a maturar a temperaturas de refrigeração (tal como nós), contou valores inferiores para *Micrococcaceae* aos que tinha determinado imediatamente após a etapa de mistura, provavelmente devido às temperaturas baixas e à redução dos valores do pH promovidos pelas bactérias lácticas.

Elias (2004) realizou dois ensaios de inoculação independentes, mas com condições de processamento o mais semelhantes possível, e obteve valores médios para *Staphylococcus* spp. de 6,86 log ufc/g para os paios inoculados com *S. xylosus* 8M, numa concentração próxima de 10^8 células/g de massa, e 6,19 log ufc/g para os paios controlo, isto num primeiro ensaio. Num segundo ensaio obteve valores superiores, cabendo 8,22 log ufc/g aos paios inoculados e 7,36 log ufc/g aos não inoculados. Na fase intermédia da cura e no produto acabado obteve contagens próximas de 7,0 log ufc/g e 6,0 log ufc/g, respetivamente, tanto para os enchidos controlo como para os inoculados, ou seja, não observou diferenças significativas em nenhum dos momentos do processo. Bover-Cid *et al.* (1999) obtiveram valores próximos de 3,8 log ufc/g para massas de *fuet* não inoculadas, cabendo às inoculadas concentrações com mais 2 log ufc/g. Na fase intermédia da cura e no produto acabado os valores foram semelhantes entre todos os enchidos e apresentaram-se próximos dos 6 log ufc/g. Valores semelhantes aos obtidos por Fonseca *et al.* (2013); Elias & Carrascosa (2010) e Roseiro *et al.* (2010).

De uma forma geral, os resultados por nós obtidos são próximos dos apresentados pelos autores descritos. Todavia, no produto acabado os paios inoculados com *S. equorum* S2M7 10^6 destacaram-se, porque apresentaram um valor médio de 8,05 log ufc/g, parecendo que a estirpe mencionada teve superior capacidade de adaptação ao meio.

Nas contagens de enterobactérias, no produto acabado, observaram-se diferenças significativas em comparação com os tempos de amostragem que lhe antecederam, ou seja, nos T0 e T10 as contagens do grupo bacteriano em análise foram significativamente superiores. Fazendo uma análise isolada para cada tempo de amostragem, constatamos que não existiram diferenças entre modalidades para nenhum dos três tempos de amostragem estudados. No produto acabado, por comparação com o T0, observaram-se reduções nas contagens entre 3 e 4 log ufc/g, variando os resultados no produto final entre 1,67 e 2,44 log ufc/g, cabendo o valor mais elevado ao grupo controlo. Os valores indicados vão ao encontro dos registados por Castaño *et al.* (2002). Elias (2004) obteve valores médios para o produto acabado ligeiramente superiores a 1,0 log ufc/g e inferiores a 1,50 log ufc/g, independentemente de serem ou não inoculados. Xie *et al.* (2015) apresentaram valores médios de 5,70 log ufc/g e 5,92 log ufc/g para os enchidos inoculados com *S. xylosus* e controlo, respetivamente. Aliás, aqueles autores observaram um aumento da concentração deste grupo bacteriano até quase à fase intermédia da cura, que atingiu 7,25 log ufc/g e 6,95 log ufc/g para os enchidos inoculados e controlo, respetivamente. Roseiro *et al.* (2010) obtiveram o valor médio de 0,8 log ufc/g, valor semelhante ao obtido por Elias & Carrascosa (2010) que foi de 0,1 log ufc/g. Bover-Cid *et al.* (1999) obtiveram valores de <1 log ufc/g a 1,0 log ufc/g, cabendo este último aos enchidos controlo e Fonseca *et al.* (2013) obtiveram o valor médio 5,61 log ufc/g.

Os resultados obtidos neste estudo são próximos dos de Elias (2004), inferiores aos de Xie *et al.* (2015) e Fonseca *et al.* (2013) e superiores aos dos demais autores citados. Pensamos que a justificação para o descrito se prende com o facto dos paios produzidos neste estudo apresentarem valores de pH reduzidos (próximos de 5,0) enquanto, por exemplo, os enchidos produzidos por Xie *et al.* (2015) e Fonseca *et al.* (2013) apresentarem valores compreendidos entre 5,72 e 6,13, respetivamente. Nos estudos dos restantes autores, apesar dos nossos enchidos apresentarem valores de pH mais reduzidos, foram encontrados, de uma forma geral, valores de a_w ligeiramente superiores e essa diferença poderá ter contribuído para os paios apresentarem contagens semelhantes ou superiores de enterobactérias. Hu *et al.* (2008), Drosinos *et al.* (2005) e Papamanoli *et al.* (2003) apresentaram justificações semelhantes para os resultados que obtiveram para o grupo bacteriano em causa.

Para bolores não existiram diferenças entre modalidades ao longo de todo o processo produtivo. Julgamos que as contagens de bolores obtidas no presente estudo foram reduzidas, principalmente porque retirámos a tripa às amostras analisadas.

Nas contagens de leveduras observaram-se diferenças entre o T10 e o TFinal, com os valores médios significativamente superiores no T10. Não se detetaram diferenças entre modalidades no mesmo tempo de cura. No produto acabado a concentração de leveduras reduziu-se para valores semelhantes aos obtidos no T0 (próximos dos 3-3,5 log ufc/g). Todavia, autores como Silvestri *et al.* (2007) e Drosinos *et al.* (2005) observaram um incremento da concentração deste grupo microbiano, em algumas amostras, à medida que a cura se foi efetivando. Elias & Carrascosa (2010), Roseiro *et al.* (2010), Cocolin *et al.* (2006) obtiveram valores médios próximos dos 6 log ufc/g no produto acabado, independentemente dos enchidos serem ou não inoculados. Mendonça *et al.* (2013) e Andrade *et al.* (2010) sugerem que as leveduras, por se encontrarem em concentrações elevadas, desempenham um papel importante nas características dos enchidos. Os autores referem-se essencialmente ao contributo associado às propriedades sensoriais. As contagens obtidas no corrente estudo foram inferiores às apresentadas pelos autores citados, possivelmente porque os valores médios do pH por nós determinados também foram consideravelmente inferiores, chegando a atingir uma unidade a menos.

Devido à grande variabilidade nos resultados, não houve diferenças com significado estatístico para as contagens de *L. monocytogenes*. Contudo, importa referir que todos os valores foram inferiores aos indicados na legislação vigente (100 ufc/g, segundo o Reg. 1441/2007) para alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitirem a multiplicação de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos, e que se observou uma redução dos valores médios no produto acabado, por comparação com os tempos de amostragem que lhe antecederam.

L. monocytogenes está bem adaptada aos ambientes dos matadouros e aos ambientes das fábricas onde são produzidos os enchidos. Posto isto, é frequente existirem autores que reportam a sua presença em equipamentos e utensílios, como foi o caso de Gounadaki *et al.* (2008). Talon *et al.* (2007a) foram mais longe e concluíram que *L. monocytogenes* foi detetada em 6,7% das 314 amostras provenientes dos ambientes fabris de pequenas indústrias produtoras de enchidos de países mediterrânicos e da Eslováquia. Pala & Sevilla (2004) e Atanassova *et al.* (2001) reportaram a sua presença em carne de porco e produtos cárneos. Todavia, no produto acabado, geralmente, as concentrações são reduzidas (Chevallier *et al.*, 2006; Aymerich *et al.*, 2003) ou inferiores ao limiar de deteção do método (Comi *et al.*, 2005).

No presente estudo, no produto acabado, os resultados variaram entre $3,33 \pm 2,58$ ufc/g e $16,66 \pm 29,26$ ufc/g para os enchidos inoculados; a média do grupo controlo foi de $2,50 \pm 4,18$ ufc/g. Ainda assim, a estirpe *S. equorum* S2M7 10^8 foi aquela que mostrou algum efeito na redução das contagens de *L. monocytogenes*.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi negativa em todas as amostras analisadas nos T10 e TFinal. No T0 os paiois alocados às modalidades 2 (*S. equorum* 5MSA4 10^3) e 4 (*S. equorum* S2M7 10^3) apresentaram uma amostra positiva em seis analisadas.

Salmonella spp. são microrganismos patogénicos, como tal, podem pôr em causa a saúde do consumidor. Com efeito, têm sido identificados alguns surtos associados a enchidos fermentados Europeus, sendo exemplo disso os apontados por Gossner *et al.* (2012) e Kuhn (2011) para um enchido francês e um salame dinamarquês, respetivamente. Talon *et al.* (2007a) concluíram que *Salmonella* spp. foi detetada em 4,8% das 314 amostras provenientes dos ambientes fabris de pequenas indústrias produtoras de enchidos de países mediterrânicos e da Eslováquia. Porém, a maioria dos autores não detetou *Salmonella* spp. nos estudos que levaram a cabo (Gounadaki *et al.*, 2008; Lebert *et al.*, 2007b; Drosinos *et al.*, 2005; Gomi *et al.*, 2005; Rantsiou *et al.*, 2005; Gimeno *et al.*, 2001).

5.1.3. Determinação de aminas biogénicas

Na Tabela 24 apresenta-se a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Tabela 24 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Triptamina	F=2,8168 P=0,0625 ^{N.S.}
β - feniletilamina	F=6,3404 P=0,0022 ^{**}
Putrescina	F=52,4637 P=0,0000 ^{***}
Cadaverina	F=49,3734 P=0,0000 ^{***}
Histamina	F=1,3746 P=0,2556 ^{N.S.}
Tiramina	F=60,6933 P=0,0000 ^{***}
Espermidina	F=0,0822 P=0,9211 ^{N.S.}
Espermina	F=2,7233 P=0,0667 ^{N.S.}
Aminas vasoativas	F=20,7260 P=0,0000 ^{***}
Total de aminas	F=26,6454 P=0,0000 ^{***}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; **Significativo para $p < 0,01$; ***Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 24 permite concluir que o fator lote foi altamente ($p < 0,001$) significativo para putrescina, cadaverina, tiramina, aminas vasoativas e total de aminas, muito significativo ($p < 0,01$) para β-feniletilamina e não foi significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis estudadas.

Os resultados da análise de variância não são totalmente inesperados, a aminogénese está condicionada por múltiplos fatores, entre outros, a temperatura, o pH, a microbiota, a utilização de aditivos, o que poderá originar a variância observada.

Na Tabela 25 apresenta-se a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 25 - Análise de variância para os resultados das aminas biogênicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis (mg/kg de enchido)	Fatores		
	Modalidade G.L.=4	Tempo de amostragem G.L.=2	Modalidade x Tempo de amostragem G.L.=8
Triptamina	F=3,4341 P=0,0100*	F=908,2110 P=0,0000***	F=0,8694 P=0,5436 ^{N.S.}
β-feniletilamina	F=3,8020 P=0,0055**	F=441,1914 P=0,0000***	F=0,2135 P=0,9882 ^{N.S.}
Putrescina	F=1,5324 P=0,1951 ^{N.S.}	F=7,4477 P=0,0008***	F=0,1055 P=0,9990 ^{N.S.}
Cadaverina	F=0,3314 P=0,8566 ^{N.S.}	F=17,1757 P=0,0000***	F=0,0779 P=0,9997 ^{N.S.}
Histamina	F=10,2698 P=0,0000***	F=957,5978 P=0,0000***	F=2,6161 P=0,0101*
Tiramina	F=0,8423 P=0,5002 ^{N.S.}	F=28,3936 P=0,0000***	F=0,0454 P=1,0000 ^{N.S.}
Espermidina	F=1,0959 P=0,3604 ^{N.S.}	F=3565,3290 P=0,0000***	F=0,9118 P=0,5082 ^{N.S.}
Espermina	F=0,7813 P=0,5388 ^{N.S.}	F=2851,5840 P=0,0000***	F=0,5363 P=0,8279 ^{N.S.}
Aminas vasoativas	F=1,2132 P=0,3072 ^{N.S.}	F=117,8271 P=0,0000***	F=0,1229 P=0,9983 ^{N.S.}
Total de aminas	F=0,9316 P=0,4471 ^{N.S.}	F=82,8919 P=0,0000***	F=0,1534 P=0,9962 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; **Significativo para $p < 0,01$; ***Significativo para $p < 0,001$

A leitura da Tabela 25 permite inferir que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para histamina, muito significativo ($p < 0,01$) β-feniletilamina, significativo ($p < 0,05$) para triptamina e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis. O fator tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as variáveis estudadas. A interação entre ambos foi significativa ($p < 0,05$) para histamina e não significativa ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

O fator tempo de amostragem mostrou-se significativo sobre um maior número de variáveis estudadas que a modalidade, seguindo a tendência observada para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Na Tabela 26 apresentam-se os valores médios e os desvios padrão para as aminas biogênicas obtidos nos paços de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 26 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Parâmetros (mg/kg de enchido)											
Tempo de amostragem	Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Esermidina	Esermina	Aminas vasoativas	Totaldeaminas
T0	1	9,58 ^B ±2,30	6,15 ^B ±0,97	489,93 ^A ±84,63	262,50 ^B ±80,21	63,31 ^{B,a} ±14,02	243,10 ^{AB} ±103,62	107,41 ^A ±3,47	224,69 ^B ±19,00	322,14 ^B ±96,48	1406,67 ^B ±262,51
	2	9,17 ^B ±3,15	6,18 ^B ±0,59	454,30 ^A ±76,31	267,37 ^B ±66,43	59,98 ^{B,a} ±13,34	231,59 ^{AB} ±88,48	107,60 ^B ±1,79	223,56 ^B ±14,97	306,91 ^B ±91,14	1358,73 ^B ±222,94
	3	5,62 ^B ±4,20	6,24 ^B ±1,22	480,77 ±94,93	276,77 ^B ±59,25	51,16 ^{B,ab} ±8,06	240,32 ^{AB} ±95,02	107,21 ^B ±1,07	218,76 ^B ±15,10	303,35 ^B ±85,34	1386,85 ^A ±225,38
	4	6,29 ^B ±6,59	5,74 ^B ±0,67	432,08 ±141,05	256,68 ±134,96	48,44 ^{B,ab} ±10,81	216,56 ^{AB} ±76,10	106,82 ^B ±1,54	218,35 ^B ±13,79	277,12 ^B ±68,40	1291,05 ^A ±338,26
	5	5,71 ^B ±6,27	5,29 ^B ±1,52	467,95 ±200,15	256,66 ^B ±109,44	41,08 ^{B,b} ±16,76	237,70 ^B ±87,16	99,12 ^A ±27,92	208,22 ^B ±59,24	289,16 ^B ±94,45	1321,11 ^{AB} ±450,16
T10	1	32,49 ^A ±2,34	8,75 ^A ±0,98	400,30 ^B ±84,89	343,60 ^A ±80,10	90,68 ^{A,a} ±13,98	302,23 ^A ±103,63	110,54 ^A ±3,46	339,25 ^A ±18,79	434,15 ^A ±96,30	1627,83 ^A ±262,38
	2	32,07 ^A ±3,13	8,77 ^A ±0,58	364,67 ^B ±76,43	348,46 ^A ±66,19	87,37 ^{A,ab} ±3,64	290,68 ^A ±88,30	110,72 ^A ±1,64	338,11 ^A ±14,86	418,90 ^A ±90,93	1580,86 ^A ±222,32
	3	28,50 ^A ±4,25	8,83 ^A ±1,22	390,61 ±95,32	357,54 ^A ±58,43	78,49 ^{A,ab} ±7,98	299,26 ^A ±94,87	110,22 ^A ±1,38	333,13 ^A ±15,00	415,09 ^A ±85,14	1606,58 ^A ±224,64
	4	29,24 ^A ±6,70	8,33 ^A ±0,68	341,57 ±140,83	337,35 ±134,45	75,77 ^{A,b} ±10,81	275,32 ^A ±75,71	109,77 ^A ±1,69	332,64 ^A ±13,55	388,66 ^A ±67,94	1509,98 ^A ±336,70
	5	29,14 ^A ±7,33	8,35 ^A ±0,39	413,46 ±149,88	365,85 ^A ±89,29	73,35 ^{A,b} ±14,08	314,45 ^A ±55,83	110,12 ^A ±1,50	339,45 ^A ±8,66	425,90 ^A ±49,40	1654,18 ^A ±257,78
TFinal	1	ND ^C	3,91 ^C ±0,96	435,77 ^{AB} ±85,44	260,98 ^B ±78,05	0,29 ^{C,a} ±0,44	191,32 ^C ±105,64	8,52 ^B ±3,02	52,88 ^C ±19,60	195,52 ^C ±105,15	953,68 ^C ±261,22
	2	ND ^C	3,85 ^C ±0,59	418,70 ^{AB} ±71,23	267,42 ^B ±65,05	0,07 ^{C,ab} ±0,11	167,45 ^B ±86,11	8,59 ^C ±1,47	49,28 ^C ±12,88	171,37 ^C ±86,20	915,36 ^C ±210,81
	3	ND ^C	3,88 ^C ±1,20	448,79 ±94,47	276,23 ^B ±58,35	0,12 ^{C,ab} ±0,28	177,04 ^B ±93,88	8,23 ^C ±1,37	45,33 ^C ±15,12	181,04 ^C ±92,93	959,50 ^B ±234,02
	4	ND ^C	3,39 ^C ±0,70	400,53 ±142,83	254,53 ±134,99	ND ^{C,b}	154,41 ^B ±75,87	7,67 ^C ±1,60	44,72 ^C ±13,00	157,80 ^C ±75,77	865,36 ^B ±345,71
	5	ND ^C	3,43 ^C ±0,44	469,30 ±156,16	284,85 ^B ±86,68	ND ^{C,b}	193,22 ^B ±55,80	8,13 ^B ±1,50	53,23 ^C ±8,99	196,65 ^C ±55,68	1010,34 ^B ±262,39

T0 (pré-enchimento); T10 (fase intermédia da cura); TFinal (produto acabado). 1 - Controlo; 2 - *S. equorum* 5MSA4 (10^3 células/g); 3 - *S. equorum* 5MSA4 (10^6 células/g); 4 - *S. equorum* S2M7 (10^3 células/g); 5 - *S. equorum* S2M7 (10^6 células/g). O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina. Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. ND - Não detetado

A análise da Tabela 26 permite verificar que a concentração de triptamina aumentou significativamente entre o T0 (pré-enchimento) e o T10 (fase intermédia da cura), porém, no TFinal (produto acabado) esta amina não foi detetada. Os teores de β -feniletilamina, histamina, tiramina, espermidina e espermina sofreram um incremento do T0 para o T10 e reduziram-se para os valores significativamente inferiores no TFinal. Nos paios inoculados com a estirpe de *S. equorum* S2M7, independentemente da concentração inoculada, não foi detetada (ND) histamina no produto acabado.

A presença das poliaminas naturais espermidina e espermina seguiu o padrão habitualmente encontrado em enchidos (Laranjo *et al.*, 2016; Tasić *et al.*, 2012; Papavergou *et al.*, 2012; Roseiro *et al.*, 2010), com a prevalência da segunda sobre a primeira. Acerca da proporção entre estas duas aminas, existem na literatura diversos exemplos onde são reportados resultados semelhantes, nomeadamente em trabalhos desenvolvidos pelos autores citados na segunda linha deste parágrafo. Kalač & Krausová (2005) referem que a carne e os produtos cárneos geralmente apresentam concentrações que raramente excedem 10 mg/kg para espermidina e teores entre 20 e 60 mg/kg já são considerados elevados para espermina. Todavia, Tasić *et al.* (2012) determinaram valores para espermina de 101 mg/kg em enchidos sérvios não inoculados. Kalač (2009) refere que a presença de maiores quantidades de espermina é comum nos géneros alimentícios de origem animal, pese embora a proporção relativa entre estas duas aminas biogénicas possa ser variável em função do tipo de matérias-primas usado na formulação dos enchidos. Este ensaio corrobora o indicado por Stadnik & Dolatowski (2010) e Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmonero (2004), que referem que os teores das poliaminas naturais, de uma forma geral, se vão reduzindo ou mantendo ao longo do processo de cura. Hernández-Jover *et al.* (1997) referem que é mais comum reduzirem-se os teores de espermina, porque aquela amina pode ser usada por alguns microrganismos como fonte de azoto.

Para o grupo das aminas com propriedades vasoativas (triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina) e para o somatório dos teores das oito aminas estudadas, em função do descrito nos parágrafos anteriores, seria expectável que tivesse ocorrido um incremento do T0 para o T10, sucedido por uma redução no TFinal, e foi exatamente o que adveio.

Os paios controlo, desde o T0, foram sempre, ainda que sem significado estatístico, os que apresentaram teores mais elevados para aminas vasoativas, porém, no produto acabado, os teores foram muito semelhantes entre os paios controlo e os inoculados com a modalidade 5 (*S. equorum* S2M7 10^6). A estirpe referida, inoculada na concentração 10^3 células/g de massa, foi a que mais contribuiu para a redução daquele grupo de aminas e o mesmo se aplica ao total de aminas

biogénicas. Parece que a maior concentração de células inoculadas terá contribuído para a atividade aminogénica.

As aminas biogénicas que apresentaram concentrações mais elevadas no produto acabado foram, por ordem decrescente, putrescina, cadaverina, tiramina e espermina. Por outro lado, triptamina, histamina e β -feniletilamina foram as que apresentaram teores mais reduzidos. Aliás, a primeira não foi detetada. Gomes (2016) e Vidal-Carou *et al.* (2007), no produto acabado, salvo raras exceções, também foram as aminas que determinaram em menores concentrações.

Eerola *et al.* (1998) e Santos (1996) referem que tiramina é a amina biogénica mais tóxica e que teores entre 100 e 800 mg/kg (produto acabado) poderão ser perigosos para o consumidor. Neste ensaio, no produto acabado, todos os valores médios foram próximos de 200 mg/kg para a amina aludida, ou seja, poderão ser perigosos para a saúde dos consumidores, mas foi a única amina com propriedades vasoativas a apresentar teores elevados.

No produto acabado, os valores médios obtidos para o conjunto das aminas vasoativas foram inferiores a 200 mg/kg e para a o total de aminas biogénicas inferiores a e 1000 mg/kg; - apenas a modalidade 5 apresentou o valor $1010,34 \pm 262,39$ mg/kg. Estes resultados são positivos em termos higiénicos, visto serem os limites apresentados como aceitáveis por vários autores, citados por Tasić *et al.* (2012).

A predominância de putrescina relativamente às restantes aminas exógenas foi também encontrada por outros autores, nomeadamente González-Fernández *et al.* (2003). Em Portugal, Roseiro *et al.* (2010) e Roseiro *et al.* (2006) verificaram a prevalência de putrescina e cadaverina em chouriço grosso de Estremoz e Borba, IGP, e painhos de Portalegre, respetivamente. Gomes (2016) também quantificou putrescina, salvo raras exceções, em maiores concentrações em variados enchidos portugueses.

Latorre-Moratalla *et al.* (2007) associaram histamina à presença de diaminas, especialmente cadaverina, no entanto, no presente ensaio essa relação não foi muito evidente.

Como referido no capítulo revisão bibliográfica, Santos (1996) aponta valores de pH compreendidos entre 4 e 5,5 como ótimos para que ocorra descarboxilação. Gomes (2016) confirmou o descrito para painho (5,23), cacholeira (5,54) e chouriço de carne (5,19), tendo sido estes os enchidos que apresentaram os teores mais elevados de aminas biogénicas no estudo levado a cabo pela autora. Todavia, aquela autora determinou valores de pH de 5,18, 5,64 e 5,71, respetivamente, para chouriço mouro, salpicão e chouriço de carne Transmontano, ou seja, valores próximos dos considerados ótimos, mas os níveis de aminas biogénicas foram significativamente inferiores aos dos primeiros

produtos referidos. Lu *et al.* (2010) também concluíram algo semelhante, porque obtiveram valores de pH compreendidos entre 5,30 e 6,56 e não conseguiram estabelecer uma correlação entre o pH e os teores de aminos biogénicas. Já González-Tenorio *et al.* (2013) atribuíram aos valores mais reduzidos de pH a possível causa para teores de aminos biogénicas superiores. Nos resultados obtidos no presente ensaio, com exceção do T0, todos os valores de pH se situaram entre 4 e 5,5, como tal, não nos parece muito correto afirmar perentoriamente que o pH teve um efeito evidente na manutenção, aumento ou redução daqueles contaminantes químicos. Parece-nos que o descrito, mais uma vez, evidencia a dificuldade em estabelecer uma correlação direta entre a acumulação de aminos biogénicas e o pH.

A presença de elevados teores de aminos biogénicas, em geral, e de putrescina e cadaverina, em particular, poderão estar associados a diversos fatores. Todavia, o cuidado a ter na seleção das matérias-primas e a forma como decorre o processo produtivo poderão condicionar a formação de aminos biogénicas (Vidal-Carou *et al.*, 2015). De acordo com González-Tenorio *et al.* (2013); EFSA (2011); Suzzi & Gardini (2003) e Bover-Cid *et al.* (2001a) a produção de putrescina e cadaverina está particularmente associada a bactérias Gram-negativo, principalmente *Enterobacteriaceae* e também pseudomonas. Rabie *et al.* (2014) referem que a multiplicação descontrolada daquelas bactérias ocorre normalmente em virtude de condições de armazenamento inadequadas (descontrolo da temperatura) ou até de uma fermentação descuidada com a libertação de maiores quantidades de enzimas descarboxilases para o meio. Gomes (2016) reforça que o desenvolvimento das *Enterobacteriaceae* é igualmente facilitado pelo aumento da área de exposição à microbiota contaminante que resulta da miga da carne e gordura que ocorre na maioria dos enchidos. Estas bactérias, normalmente, apresentam concentrações mais elevadas nas fases iniciais do processo produtivo, todavia, têm a possibilidade de libertar enzimas descarboxilases que se mantêm ativas mesmo na ausência de células microbianas viáveis (Bover-Cid *et al.*, 2001b). Deste modo, a presença de putrescina e cadaverina nos produtos poderá estar associada ao desenvolvimento de *Enterobacteriaceae*. No presente estudo as concentrações de enterobactérias foram significativamente inferiores no produto acabado, por comparação com os tempos que lhe antecederam. Porém, os teores de putrescina e cadaverina não apresentaram diferenças muito pronunciadas ao longo de todo o processo, ou seja, não se confirmou o descrito pelos autores citados ou houve libertação de enzimas descarboxilases que se mantiveram ativas, como referiram Bover-Cid *et al.*, 2001a.

Se tivermos em conta os resultados obtidos por Laranjo *et al.* (2016); Tasić *et al.* (2012); Papavergou *et al.* (2012) e Papavergou *et al.* (2011), concluímos que os teores totais de aminos biogénicas

determinados no presente ensaio, no produto acabado, foram superiores aos daqueles autores. Porém, Gomes (2016), em painho do Alentejo (2709,96 mg/kg), Roseiro *et al.* (2010), em chouriço grosso de Estremoz e Borba, IGP, (1962,1 mg/kg), Claro (2009), em chouriço de carne de Barrancos (1169,25 mg/kg), chouriço de carne de Beja (2293,38 mg/kg) e chouriço de Portalegre, IGP, (1243,28 mg/kg) e Roseiro *et al.* (2006), em painho de Portalegre (2171,5 mg/kg) quantificaram teores superiores. Julgamos ser importante destacar que os enchidos analisados pelos autores citados foram todos produzidos no Alentejo, região onde produzimos os paios utilizados neste estudo. Também é de realçar que a tecnologia de fabrico dos enchidos alentejanos, de um modo geral, apresenta grandes semelhanças entre si, podendo ser uma das razões para terem obtido teores tão elevados.

No entanto, no que respeita aos teores de amins vasoativas sucedeu o contrário, isto é, apenas Gomes (2016) em chouriço de Carne de Trás-os-Montes, Laranjo *et al.* (2017a), Laranjo *et al.* (2016) em catalão e Tasić *et al.* (2012) apresentaram valores inferiores aos por nós determinados. Os demais autores obtiveram resultados superiores a 200 mg/kg, o que segundo Latorre-Moratalla *et al.* (2017) e Eerola *et al.* (1998) poderá representar falta de higiene e práticas inadequadas desde a escolha das matérias-primas até ao culminar do processo produtivo.

Na Tabela 27 apresenta-se a percentagem de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo e os inoculados.

Tabela 27 - Percentagem de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo e os inoculados.

% de Redução										
Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espermina	Amins vasoativas	Totalde amins
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	ND	1,54	3,92	NR	24,14	12,48	NR	6,81	12,35	4,02
3	ND	0,77	NR	NR	58,62	7,46	3,40	14,28	7,41	NR
4	ND	13,30	8,09	2,47	ND	19,29	9,98	15,43	19,29	9,26
5	ND	12,28	NR	NR	ND	NR	4,58	NR	NR	NR

1 - Controlo; 2 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^3 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^6 células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^3 células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g). O conjunto das amins vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina.

ND - Não detetado

NR - Não ocorreu redução

Tendo como base o descrito na Tabela 27, concluímos que as inoculações, de uma forma geral, promoveram um decréscimo nos teores de amins biogénicas dos paios. No entanto, a estirpe *S. equorum* S2M7 na concentração 10^6 células/g de massa não seguiu essa tendência, ou melhor, apenas seguiu para β -feniletilamina e espermidina. Também não promoveu a redução dos teores de amins vasoativas e total de amins biogénicas, neste último caso, acompanhada pela modalidade 3

que continha *S. equorum* 10^6 células/g de massa. Em sentido oposto surgiram as modalidades 2 (*S. equorum* 5MSA4 10^3) e 4 (*S. equorum* S2M7 10^3), destacando-se a última, porque promoveu superiores reduções quer para os teores de amins vasoativas quer para os teores totais daqueles compostos. Apenas dispomos da atividade descarboxilativa de *S. equorum* S2M7 que foi avaliada por Alfaia *et al.* (2018). A mesma foi baixa para tiramina e não foi detetada para as restantes amins, como é natural não foi estudada para as poliaminas naturais espermina e espermidina, o que nos permite excluir a possibilidade de a estirpe em causa ter atividade descarboxilativa elevada.

Vários autores confirmaram a ação das culturas de arranque na redução dos teores de amins biogénicas (Domínguez *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015; Simion *et al.*, 2014; Baka *et al.*, 2011; Casquete *et al.*, 2011b; Ruiz-Moyano *et al.*, 2011; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010b). A maioria dos autores afirma que o efeito melhorador, isto é, a diminuição dos teores de amins biogénicas, ocorre quando são adicionadas culturas mistas. A maioria dos autores também chegou à conclusão que as inoculações com culturas puras de *Staphylococcus* foram menos eficazes na redução dos teores daqueles compostos, por comparação com a utilização de culturas puras de *Lactobacillus* (Baka *et al.*, 2011; Tosukhowong *et al.*, 2011), apesar destes últimos serem associados, algumas vezes, à produção de tiramina, juntamente com *Enterococcus* (Talon & Leroy, 2011; Ansorena *et al.*, 2002). Autores como Tosukhowong *et al.* (2011) e Latorre-Moratalla *et al.* (2012b, 2010b) referem que as culturas de arranque compostas por bactérias lácticas poderão ter maior capacidade para reduzir a aminogénese, porque mais facilmente conseguem competir com a microbióta com potencial aminogénico, que se encontra naturalmente presente nas massas e, desse modo, substituí-la, em particular culturas de arranque que contenham espécies de *L. sakei* e *L. plantarum*. Jairath *et al.* (2015) reforçam o contributo das bactérias lácticas na redução dos teores de amins biogénicas durante o armazenamento dos enchidos, mais uma vez pela sua capacidade competitiva. Essa capacidade competitiva decorre dos atributos necessário para promoverem abaixamento dos valores do pH, da capacidade de produzirem bacteriocinas, por exemplo curvacina A (Hammes & Hertel, 1996), do tipo respiratório anaeróbio ou microaerófilo e da capacidade para se multiplicarem a temperaturas de refrigeração (Reis *et al.*, 2012). Ammor & Mayo (2007) acrescentam a tolerância a diferentes concentrações de NaCl e nitrito. Porém, será de ressaltar que a redução dos teores de amins biogénicas pela ação das estirpes inoculadas dependerá de inúmeros fatores, tais como as condições em que decorre o processo produtivo, a higiene das matérias-primas e, obviamente, a não capacidade para promoverem descarboxilação de forma expressiva por parte das estirpes (Jairath *et al.*, (2015); Latorre-Moratalla *et al.*, 2012b, 2010b).

5.1.4. Parâmetros da cor

Na Tabela 28 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Tabela 28 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
L*	F=2,9737 P=0,0542 ^{N.S.}
a*	F=4,8161 P=0,0094**
b*	F=8,1220 P=0,0005***
C*	F=4,2342 P=0,0163*
H°	F=20,3199 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

A análise dos resultados apresentados na Tabela 28 permite verificar que o fator lote foi altamente significativo para os parâmetros b* e H° ($p < 0,001$), muito significativo para a* ($p < 0,01$), significativo para C* ($p < 0,05$) e não apresentou diferenças significativas ($p \geq 0,05$) para L*. Como as coordenadas de cor são fortemente influenciadas pelo pH, a_w e pela microbiota é natural que tal variância ocorra, tendo em conta o que havíamos escrito na discussão relativa àqueles parâmetros.

Na Tabela 29 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Tabela 29 - Análise de variância para os parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
L*	F=4,0578 P=0,0038**
a*	F=0,6485 P=0,6288 ^{N.S.}
b*	F=0,7609 P=0,5524 ^{N.S.}
C*	F=0,6006 P=0,6006 ^{N.S.}
H°	F=0,5694 P=0,6852 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ** Significativo para $p < 0,01$

Observando a Tabela 29 pode-se constatar que o fator modalidade foi muito significativo ($p < 0,01$) para L^* e não tendo esse efeito ou outro estatisticamente significativo sobre as restantes variáveis estudadas ($p \geq 0,05$).

Na Tabela 30 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 30 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros				
		L^*	a^*	b^*	C^*	H°
T _{Final} (produto acabado)	1	40,40 ^b ±3,76	16,94±3,94	13,18±4,90	21,62±5,73	37,01±6,90
	2	43,07 ^{ab} ±4,48	17,26±3,53	14,54±6,78	22,76±7,04	38,65±6,49
	3	42,73 ^{ab} ±4,86	18,03±3,07	14,09±4,51	23,04±4,73	37,22±6,84
	4	44,45 ^a ±4,05	17,34±3,58	13,94±5,21	22,36±4,73	37,98±5,38
	5	41,46 ^b ±3,49	16,59±3,04	12,48±3,70	20,96±4,17	36,37±6,37

1 - Controlo; 2 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^3 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^6 células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^3 células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g). Na mesma coluna, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

Observando a Tabela 30 podemos verificar que apenas existiram diferenças estatisticamente significativas para o parâmetro L^* . A modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10^3) foi aquela que mais contribuiu para tornar os paios mais claros (valores de L^* superiores), visto ter apresentado um valor médio de $44,45 \pm 4,05$, principalmente em comparação com as modalidades 1 (controlo) e 5 (*S. equorum* S2M7 10^6) para as quais foi significativamente mais elevada, pois os paios alocados àquelas modalidades apresentaram valores médios de $40,40 \pm 3,76$ e $41,46 \pm 3,49$, respetivamente.

Patarata (2002) inoculou, separadamente, três modalidades de culturas mistas (1) *L. plantarum* e *S. xylosus*; (2) *L. sakei* e *S. xylosus*; (3) *L. sakei*, *S. carnosus* e *S. xylosus*, na proporção de 10^6 células/g de massa, em linguiça tradicional transmontana e quando mediu a cor no homogeneizado da amostra procedente de linguiça com 30 dias de cura, observou que a utilização de culturas de arranque não influenciou a luminosidade (L^*) nem a coordenada a^* . Relativamente à coordenada b^* , o autor registou valores ligeiramente mais baixos no lote controlo ($10,70 \pm 1,10$). Pérez-Alvarez *et al.* (1999), corroborados por Patarata (2002), atribuíram as variações existentes no parâmetro L^* , fundamentalmente, ao teor de humidade das amostras, sendo os valores de L^* tanto mais elevados quanto maiores forem os teores daquele parâmetro, e às características exsudativas da carne, decorrentes de diferenças do pH, com valores de L^* superiores nas carnes mais exsudativas. Sanabria *et al.* (2004) atestam o descrito pelos autores, mas para presunto. Parece-nos que os teores em gordura também poderão afetar a coordenada de cor L^* , isto é, os valores daquela coordenada serão proporcionais aos teores de gordura, tal como reportado por Papadima & Bloukas (1999). Elias

(2004) realizou dois ensaios independentes, com as mesmas condições, e obteve, em paios de porco Alentejano inoculados com *S. xylosum* 8M, na concentração aproximada de 10^8 células/g de massa e sem açúcar adicionado, valores médios para o parâmetro L^* de $37,81 \pm 2,85$ num primeiro ensaio e $37,50 \pm 3,46$ num segundo ensaio, ambos inferiores aos por nós obtidos, pois os nossos resultados foram superiores a 40,00 e inferiores a 45,00. O mesmo autor, para enchidos não inoculados (controlo), obteve para o mesmo parâmetros valores médios de $39,11 \pm 5,44$, num primeiro ensaio, e $37,74 \pm 1,55$ num segundo ensaio. Seguiu-se o mesmo padrão identificado nos inoculados, ou seja, os nossos resultados, mais uma vez, foram ligeiramente superiores a 40,00. Elias & Carrascosa (2010) obtiveram para o parâmetro L^* , em paios do Alentejo não inoculados e sem açúcar adicionado, $40,4 \pm 4,2$, ou seja, um valor mais próximo dos obtidos no presente estudo. Para os resultados obtidos por Patarata (2002), apenas apresentamos os referentes às linguiças tradicionais transmontanas não inoculadas porque o autor inoculou sempre culturas mistas (compostas por duas ou mais estirpes). O valor médio obtido no estudo do autor referido foi de $42,46 \pm 4,43$. Gimeno *et al.* (2001) obtiveram valores médios superiores a 50,00 para enchidos espanhóis produzidos de forma tradicional e com substituição parcial de cloreto de sódio por ascorbato de cálcio. No entanto, os autores obtiveram valores de pH entre 4,42 e 4,66, ou seja, valores bastante baixos. Aqueles autores associaram a acidificação elevada a valores mais reduzidos de L^* e superiores de a^* e b^* , provavelmente pela facilidade em eliminar a água livre, com o efeito do pH reduzido. Tendo como base o descrito por Pérez-Alvarez *et al.* (1999) e Patarata (2002) no início deste parágrafo, podemos comparar, apesar da percentagem de humidade ser um parâmetro distinto da a_w , os valores médios obtidos por Elias (2004) com os nossos e tentar perceber se a premissa indicada pelos autores se aplicou ao nosso estudo. Observando a Tabela 20 relativa aos valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w , obtidos nos 3 lotes dos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*, constatamos que, no produto acabado, os valores médios por nós obtidos para a a_w variaram entre $0,885 \pm 0,044$ para os paios não inoculados e $0,852 \pm 0,065$ (valor mais baixo) e $0,883 \pm 0,025$ (valor mais elevado) para os inoculados. Elias (2004) obteve valores médios de $0,734 \pm 0,091$ e $0,688 \pm 0,095$ para os paios não inoculados e inoculados, respetivamente, e num segundo ensaio $0,734 \pm 0,057$ e $0,821 \pm 0,029$, seguindo a mesma ordem indicada para o primeiro ensaio, ou seja, teoricamente a premissa mantém-se como válida, pois os valores médios da a_w obtidos pelo autor são claramente inferiores aos por nós determinados, concomitantemente os valores de L^* foram mais reduzidos.

Porém, não parece aplicar-se aos resultados apresentados por Elias & Carrascosa (2010), porque os autores obtiveram valores médios de L^* próximos dos obtidos no presente estudo (próximos de 40), mas os valores médios de a_w foram de $0,82 \pm 0,05$, significando, portanto, que foram relativamente inferiores aos por nós obtidos, que ficaram compreendidos entre $0,852 \pm 0,065$ e $0,885 \pm 0,044$.

5.1.5. Parâmetros reológicos

Na Tabela 31 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Tabela 31 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Dureza (N)	F=4,2095 P=0,0167*
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=21,2270 P=0,0000***
Coesividade	F=12,6918 P=0,0000***
Elasticidade	F=1,4671 P=0,2340 ^{N.S.}
Resiliência	F=2,5353 P=0,0827 ^{N.S.}
Mastigabilidade (N)	F=2,0892 P=0,1274 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; *** Significativo para $p < 0,001$

A observação da Tabela 31 permite-nos concluir que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para adesividade e coesividade, significativo ($p < 0,05$) para dureza e não significativo ($p \geq 0,05$) para elasticidade, resiliência e mastigabilidade. Para os parâmetros reológicos aplica-se o que escrevemos para as coordenadas de cor, ou seja, são fortemente influenciados pelo pH, a_w e pela microbiota, é natural que tal variância ocorra, tendo em conta o que havíamos escrito na discussão relativa àqueles parâmetros.

Na Tabela 32 apresentamos a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Tabela 32 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Dureza (N)	F=2,3449 P=0,0575 ^{N.S.}
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=2,4056 P=0,0523 ^{N.S.}
Coesividade	F=3,3776 P=0,01126*

Tabela 32 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Elasticidade	F=1,8156 P=0,1290 ^{N.S.}
Resiliência	F=3,1837 P=0,0153*
Mastigabilidade (N)	F=0,8239 P=0,5119 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$

Observando a Tabela 32 verificamos que o fator modalidade foi significativo ($p < 0,05$) para coesividade e resiliência e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis.

Na Tabela 33 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 33 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Dureza (N)	52,705±23,254	48,502±14,239	42,286±13,948	56,318±28,206	54,505±19,877
Adesividade (N.s ⁻¹)	- 0,936±0,588	- 1,246±1,086	- 0,797±0,687	- 1,375±1,049	- 1,448±1,348
Coesividade	0,556 ^b ±0,078	0,580 ^{ab} ±0,054	0,607 ^a ±0,049	0,565 ^b ±0,068	0,588 ^{ab} ±0,043
Elasticidade	0,877±0,068	0,933±0,262	0,890±0,144	0,845±0,066	0,849±0,080
Resiliência	0,115 ^b ±0,028	0,123 ^{ab} ±0,019	0,136 ^a ±0,026	0,121 ^{ab} ±0,023	0,129 ^{ab} ±0,023
Mastigabilidade (N)	25,828±10,878	26,783±12,664	22,956±8,788	26,652±11,175	27,815±11,798

1 - Controlo; 2 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^3 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^6 células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^3 células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g). Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

Muitos são os fatores que influenciam a textura final dos produtos cárneos, incluindo os ingredientes utilizados e tudo o que envolve o processo produtivo e as suas condicionantes. Barbut (2015) refere que, no geral, o desenvolvimento da textura ocorre em três passos principais: extração das proteínas (principalmente actina e miosina) pela ação dos sais durante a mistura dos ingredientes, formação de um gel proteico durante a acidificação e fortalecimento do gel proteico por desnaturação durante o processo de cura. É impossível não mencionar a ação do pH e da a_w nas características texturais dos enchidos, o pH pelas consequências que tem nas propriedades físicas das proteínas, nomeadamente na sua capacidade de adsorção de água e solubilidade e a depressão da a_w pela redução da água livre,

e consequente aumento da dureza e redução de reações proteolíticas, consequência do menor teor de água disponível para as enzimas atuarem sobre as proteínas da carne.

Observando a Tabela 33 verificamos que apenas existiram diferenças significativas para os parâmetros coesividade e resiliência. Relativamente ao primeiro, foram os paios inoculados com *S. equorum* 5MSA4 10⁶ (modalidade 3) que se apresentaram estatisticamente mais coesos (0,607 ± 0,049), em relação aos associados às modalidades 1 (controlo) e 4 (*S. equorum* S2M7 10³) que apresentaram valores médios de 0,556 ± 0,078 e 0,565 ± 0,068, respetivamente.

Os paios inoculados com *S. equorum* 5MSA4 10⁶ também foram aqueles que apresentaram um valor médio (0,136 ± 0,026) superior para a resiliência, surgindo os paios não inoculados como os menos resilientes (0,115 ± 0,028), ou seja, existiram diferenças significativas entre as modalidades aludidas.

O mais importante a ressaltar será o facto dos paios inoculados com a modalidade 3 terem apresentado melhor ligação das massas (maior coesividade) e, de uma forma geral, todos os paios que foram inoculados apresentaram essa tendência.

Bourne (2002) refere que a resiliência representa o grau em que a amostra retorna à forma original, ou seja, quanto maior for a resiliência maior será a recuperação em relação à forma original e vice-versa. Também é sabido que este parâmetro, geralmente, revela tendência para decrescer ao longo do tempo de cura.

Os paios inoculados com *S. equorum* 5MSA4 10³ e 10⁶ células/g de massa foram os menos duros (48,502 ± 14,239 N e 42,286 ± 13,948 N, respetivamente). É de destacar que este parâmetro pode representar um fator negativo se for excessivamente elevado, mas o mesmo se passa se for demasiado baixo, não sendo o caso dos nossos resultados, visto andarem próximos dos 50 N. Laranja *et al.* (2015); Elias *et al.* (2014) e Elias (2004) obtiveram, para enchidos semelhantes aos por nós produzidos, resultados próximos do valor indicado. Casquete *et al.* (2011b) obtiveram valores próximos para um dos processos produtivos utilizados por aqueles autores e valores muito superiores para o outro, valores superiores a 100 N. Melendo *et al.* (1996) consideraram que valores reduzidos de dureza tornaram os chouriços espanhóis por eles produzidos mais apreciáveis em termos sensoriais, enquanto Gimeno *et al.* (1999) consideraram valores de 62,33 N como um defeito em chouriços de Pamplona, por serem baixos, aos quais havia sido alterada a habitual formulação.

Relembramos que os consumidores esperam dos enchidos um grau de consistência e resistência à mastigação mínimo, abaixo do qual o produto terá fortes possibilidades de ser depreciado.

Como havíamos referido na discussão dos resultados dos parâmetros da cor, Patarata (2002) inoculou, separadamente, três modalidades de culturas mistas (1) *L. plantarum* e *S. xylosum*; (2) *L.*

sakei e *S. xylosus*; (3) *L. sakei* e *S. carnosus* e *S. xylosus*, na proporção de 10^6 células/g de massa, em linguiça tradicional transmontana. Na análise do perfil da textura, para uma deformação da amostra de 40% com uma sonda cilíndrica, considerou os parâmetros dureza, coesividade e adesividade tendo concluído que a utilização de culturas de arranque não teve qualquer efeito sobre os parâmetros por ele estudados. Elias (2004), em paios de porco Alentejano inoculados, apesar de não ter registado diferenças significativas entre modalidades de inoculação, provavelmente devido à grande variabilidade entre amostras, concluiu que a dureza foi superior nos paios do grupo controlo. No nosso caso, como vimos anteriormente, não observámos diferenças para o parâmetro referido.

Elias (2004) também observou que a coesividade foi menor nos grupos controlo, ou seja, denotou pior ligação das massas nos produtos não inoculados. De uma forma geral, vai no sentido do por nós observado. No presente ensaio foram os paios inoculados com *S. equorum* 5MSA4 10^6 (modalidade 3) que se mostraram mais coesos.

No que respeita aos ensaios de textura em enchidos, o parâmetro coesividade é de extrema importância, porque, como já referimos, está associado à ligação das massas e a mesma é fundamental na prova de enchidos.

5.1.6. Análise sensorial

Na Tabela 34 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Tabela 34 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Intensidade da cor	F=5,7876 P=0,0035**
Cores estranhas	F=0,4783 P=0,6205 ^{N.S.}
Marmoreado	F=15,0131 P=0,0000***
Intensidade do aroma	F=1,6080 P=0,2025 ^{N.S.}

Tabela 34 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Aromas estranhos	F=0,8785 P=0,1309 ^{N.S.}
Dureza	F=11,0012 P=0,0000 ^{***}
Fibrosidade	F=0,3422 P=0,7106 ^{N.S.}
Suculência	F=5,8350 P=0,0034 ^{**}
Intensidade do sabor	F=32,8437 P=0,0602 ^{N.S.}
Sabores negativos	F=4,7681 P=0,0093 ^{**}
Intensidade da salga	F=2,5962 P=0,0767 ^{N.S.}
Apreciação global	F=1,7540 P=0,1754 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

A observação da Tabela 34 permite concluir que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para marmoreado e dureza, muito significativo ($p < 0,01$) para intensidade da cor, suculência e sabores negativos e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

Em função dos resultados da análise de variância dos parâmetros anteriormente obtidos, seria natural que o fator lote se mantivesse significativo sobre os parâmetros de análise sensorial, porque os mesmos são influenciados por todos os que analisámos a montante.

Na Tabela 35 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Tabela 35 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Intensidade da cor	F=3,0997 P=0,0164 [*]
Cores estranhas	F=0,9088 P=0,4595 ^{N.S.}
Marmoreado	F=1,1691 P=0,3252 ^{N.S.}
Intensidade do aroma	F=3,7150 P=0,0060 ^{**}

Tabela 35 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Aromas estranhos	F=1,5081 P=0,2006 ^{N.S.}
Dureza	F=2,6613 P=0,0335*
Fibrosidade	F=0,4588 P=0,7659 ^{N.S.}
Suculência	F=0,6675 P=0,6152 ^{N.S.}
Intensidade do sabor	F=2,8947 P=0,0629 ^{N.S.}
Sabores negativos	F=2,1294 P=0,0780 ^{N.S.}
Intensidade da salga	F=0,9965 P=0,4102 ^{N.S.}
Apreciação global	F=1,9236 P=0,1073 ^{N.S.}

G.L. – Grau de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$

Observando a Tabela 35 constata-se que o fator modalidade foi muito significativo ($p < 0,01$) para intensidade do aroma e significativo ($p < 0,05$) para intensidade da cor e dureza. Para as restantes variáveis foi não significativo ($p \geq 0,05$).

Na Tabela 36 mostram-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 36 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Intensidade da cor	66,81 ^{ab} ±12,57	65,92 ^{ab} ±11,25	61,28 ^b ±12,28	64,50 ^{ab} ±11,24	69,48 ^a ±11,41
Cores estranhas	1,60±8,85	0,34±1,71	0,40±1,70	0,00±0,00	0,80±3,40
Marmoreado	55,74±18,48	51,04±20,33	50,84±16,98	55,33±16,68	49,25±18,28
Intensidade do aroma	73,91 ^a ±9,97	70,34 ^{ab} ±10,53	64,98 ^b ±12,95	67,25 ^{ab} ±13,20	66,63 ^b ±16,14
Aromas estranhos	0,64±3,23	1,00±2,86	2,90±6,93	2,08±5,93	1,63±5,25
Dureza	58,35 ^{ab} ±9,59	57,64 ^{ab} ±10,73	54,80 ^b ±11,34	58,86 ^{ab} ±10,47	62,20 ^a ±13,30
Fibrosidade	39,81±27,94	40,64±26,17	41,50±26,92	44,66±28,22	46,35±30,01
Suculência	53,80±21,39	53,10±20,91	57,11±15,62	52,52±18,32	50,73 ±22,13

Tabela 36 (continuação) - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Staphylococcus*.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Intensidade do sabor	72,52±9,37	71,66±8,83	66,22±14,02	66,72±18,05	66,07±12,21
Sabores negativos	4,48±10,78	3,94±6,47	8,72±17,07	10,11±18,63	5,07±6,84
Intensidade da salga	62,49±14,27	64,84±12,08	61,98±11,83	61,98±13,96	59,43±13,90
Apreciação global	59,81±14,54	56,82±15,13	51,74±16,68	51,93±16,35	52,91±16,32

1 - Controlo; 2 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^3 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^6 células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^3 células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g). Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

Observando a Tabela 36 verifica-se que apenas existiram diferenças significativas entre modalidades para os parâmetros intensidade da cor, intensidade do aroma e dureza.

A intensidade da cor ($69,48 \pm 11,41$) foi significativamente superior nos paios inoculados com *S. equorum* S2M7 10^6 (modalidade 5), por comparação com os da modalidade 3 (*S. equorum* 5MSA4 10^6) que apresentaram o valor médio de $61,28 \pm 12,28$. A intensidade do aroma foi significativamente mais evidente nos enchidos controlo ($73,91 \pm 9,97$) e menos intensa nos paios inoculados com as modalidades 3 ($64,98 \pm 12,95$) e 5 ($66,63 \pm 16,14$). Os paios mais duros foram os alocados à modalidade 5 ($62,20 \pm 13,30$), apesar de serem semelhantes aos das restantes modalidades, com exceção dos da modalidade 3 ($54,80 \pm 11,34$) para os quais foram significativamente mais duros.

Relativamente aos parâmetros onde não existiram diferenças significativas, parece-nos importante realçar o facto de, por exemplo, para as cores estranhas os paios não inoculados apresentaram o valor médio mais elevado ($1,60 \pm 8,85$) e na modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10^3) o painel não ter percecionado esta ocorrência ($0,00 \pm 0,00$). Nas restantes modalidades os valores médios foram inferiores a 1,00. Porém, para os aromas estranhos foram os paios não inoculados a obterem um valor médio de $0,64 \pm 3,23$ e as restantes modalidades a obterem valores superiores ou próximos de 1,00. Em parâmetros como a intensidade do sabor e a apreciação global as pontuações foram superiores nos paios controlo, tendo sido os paios inoculados com *S. equorum* 5MSA4 10^3 (modalidade 2) aqueles que mais se aproximaram dos valores de topo. Tendo sido esta última modalidade a que obteve melhores pontuações, valores mais baixos, relativamente ao parâmetro sabores estranhos ($3,94 \pm 6,47$).

Os painéis de provadores consideram como cor mais intensa aquela que apresenta tons de vermelho mais carregado, ou seja, mais escuro. Estes tons correspondem a valores de a^* mais reduzidos, já que este parâmetro tem valores mais elevados quanto mais aberta for a cor vermelha. Se verificarmos a Tabela 30 relativa aos valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor, podemos constatar que, apesar de não existirem diferenças significativas entre modalidades, o valor médio mais elevado coube à modalidade 3 (*S. equorum* 5MSA4 10⁶) e o mais reduzido à modalidade 5 (*S. equorum* S2M7 10⁶). Agora, observando a Tabela 36 onde estão refletidas as pontuações atribuídas pelo painel de provadores, percebemos que as posições das modalidades 3 e 5 se inverteram. Logo, a premissa descrita no início deste parágrafo é corroborada pelo nosso estudo e parece-nos que uma das aptidões do método CIELab é a comparação qualitativa dos resultados da avaliação sensorial e da avaliação instrumental.

A dureza é outro parâmetro que muitas vezes é sujeito a testes de correlação entre os resultados sensoriais e os métodos instrumentais (Gómez & Lorenzo, 2013; Lorenzo & Franco, 2012). Lima (2014), refere que a comparação qualitativa dos resultados da avaliação sensorial e da avaliação instrumental é, sem dúvida, uma das aptidões do ensaio TPA. Posto isto, observando a Tabela 33 relativa aos valores médios e desvios padrão obtidos para a análise do perfil de textura, verificamos que, para a dureza, os valores médios obtidos para cada modalidade, por ordem decrescente, foram hierarquizados do seguinte modo: modalidades 4, 5, 1, 2 e 3. Por outro lado, tendo como base a Tabela 36, verificamos que o painel de provadores pontuou a dureza dos paios, por ordem decrescente, da seguinte forma: modalidades 5, 4, 1, 2 e 3. Havendo uma aproximação ao descrito por Lima (2014), pelo menos para o parâmetro em causa. Curioso verificar que os paios inoculados com *S. equorum* 5MSA4 (modalidades 2 e 3) foram os menos duros em ambas as avaliações. Não apresentamos mais nenhuma comparação entre parâmetros por não haver nenhum com uma relação tão direta como a dureza.

Patarata (2002), em linguiça tradicional transmontana, constatou que a maioria dos atributos avaliados não se mostrou afetada pela inoculação de culturas de arranque. Contudo, à intensidade global do gosto e ao gosto picante foram atribuídas pontuações significativamente mais elevadas no lote controlo, quando comparado com um inoculado com uma cultura comercial contendo estirpes de *L. sakei* e *S. carnosus* e *S. xylosus*. Em resposta a uma pergunta de natureza hedónica contida na ficha de prova, o painel preferiu claramente as amostras do lote não inoculado.

Em jeito de conclusão, parece-nos que a preferência do painel, no presente estudo, de uma forma geral, recaiu sobre os paios não inoculados. Porém, não nos parece correto afirmar que a inoculação das estirpes teve uma ação negativa do ponto de vista sensorial. Elias (2004) chegou a conclusões

semelhantes quando inoculou *S. xylosus* 8M numa concentração aproximada de 10^8 células/g de massa (sem açúcar adicionado) destinada à produção de paios de porco Alentejano.

5.1.7. Principais conclusões do ensaio

Este ensaio permitiu concluir que o efeito das inoculações com estirpes de *Staphylococcus* não se fez sentir ao nível do pH dos produtos. A única estirpe que promoveu a redução significativa da a_w no produto acabado foi *S. equorum* 5MSA4 10^6 células/g de massa, porém, para os teores de aminas biogénicas foi *S. equorum* S2M7 10^3 células/g de massa que contribuiu mais para a redução daqueles contaminantes químicos. Ao nível microbiológico, tinha-se destacado, ligeiramente, *S. equorum* S2M7 10^6 células/g de massa, nomeadamente no que concerne à redução das contagens do indicador de segurança *L. monocytogenes* e no ligeiro aumento das contagens dos indicadores tecnológicos bactérias lácticas e *Staphylococcus* spp., ainda que sem significado estatístico. Ao nível sensorial, após os paios controlo e os inoculados com *S. equorum* 5MSA4 10^3 células/g de massa, respetivamente, foram os inoculados com *S. equorum* S2M7 10^6 células/g de massa a destacar-se pela positiva. Em função do indicado, sabendo que as estirpes por vezes têm efeitos positivos em determinados grupos de parâmetros e noutros não são tão evidentes, selecionamos a estirpe *S. equorum* S2M7, na concentração 10^6 células/g de massa, como sendo a mais indicada para fazer parte integrante da cultura mista, pois esta estirpe foi a que, ainda assim, mais contribuiu para a segurança dos paios de porco preto, do Alentejo, não desvirtuando as suas propriedades sensoriais.

5.2. Ensaio de inoculação em paios de porco preto, do Alentejo, com culturas puras de *Lactobacillus*

Neste ensaio optámos por criar uma nova modalidade, a controlo sem dextrose, com o intuito de percebermos como a microbiota indígena responderia à presença daquela fonte de energia.

5.2.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)

Na Tabela 37 mostra-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Tabela 37 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
pH	F=4,5922 P=0,0105*
a_w	F=5,6041 P=0,0039**

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: *Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$

A leitura da Tabela 37 permite concluir que o fator lote foi muito significativo ($p < 0,01$) para a a_w e significativo ($p < 0,05$) para o pH.

A análise de variância evidencia que os resultados obtidos para parâmetros como o pH e a a_w estarão sujeitos a vários fatores, como a microbiota das matérias-primas, todo o processo produtivo, incluindo as condições de higiene, entre outros, que contribuem para que surjam variações que são consideradas normais em produtos como os enchidos.

Na Tabela 38 apresenta-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 38 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=5	G.L.=2	G.L.=10
pH	F= 5,9520 P=0,0000***	F=3550,1466 P=0,0000***	F=3,1697 P=0,0006***
a_w	F=1,4909 P= 0,1910 ^{N.S.}	F=1434,9133 P=0,0000***	F=2,3842 P=0,0091**

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S.= Não significativo; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

Analisando a Tabela 38 constata-se que os dois fatores foram altamente significativos ($p < 0,001$) para o pH, assim como a interação entre ambos. Para a a_w o fator modalidade foi não significativo ($p \geq 0,05$), o tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) e a interação entre ambos foi muito significativa ($p < 0,01$).

Na Tabela 39 são apresentados os valores médios e desvios padrão para os resultados do pH e a da a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 39 - Valores médios e desvios padrão para os resultados do pH e a da a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

		Parâmetros	
Tempo de amostragem	Modalidade	pH	a_w
T0	1	5,94 ^{A,a} ± 0,09	0,972 ^{A,a} ± 0,007
	2	5,84 ^{A,ab} ± 0,14	0,969 ^{A,ab} ± 0,003
	3	5,83 ^{A,b} ± 0,16	0,968 ^{A,ab} ± 0,001
	4	5,83 ^{A,b} ± 0,16	0,963 ^{A,c} ± 0,007
	5	5,82 ^{A,b} ± 0,15	0,965 ^{A,bc} ± 0,005
	6	5,89 ^{A,ab} ± 0,20	0,964 ^{A,c} ± 0,007
T10	1	5,04 ^{B,a} ± 0,04	0,948 ^{B,ab} ± 0,004
	2	4,98 ^{B,b} ± 0,04	0,952 ^{B,a} ± 0,006
	3	4,95 ^{B,b} ± 0,05	0,949 ^{B,ab} ± 0,006
	4	4,97 ^{B,b} ± 0,04	0,947 ^{B,ab} ± 0,009
	5	5,04 ^{B,a} ± 0,09	0,944 ^{B,b} ± 0,001
	6	5,00 ^{B,ab} ± 0,13	0,947 ^{B,ab} ± 0,014
TFinal	1	5,00 ^{B,ab} ± 0,05	0,861 ^{C,ab} ± 0,015
	2	4,99 ^{B,ab} ± 0,10	0,853 ^{C,b} ± 0,005
	3	4,95 ^{B,b} ± 0,07	0,865 ^{C,ab} ± 0,003
	4	5,00 ^{B,ab} ± 0,12	0,862 ^{C,ab} ± 0,046
	5	5,06 ^{B,a} ± 0,10	0,858 ^{C,b} ± 0,013
	6	4,96 ^{B,b} ± 0,10	0,876 ^{C,a} ± 0,030

T0 (pré-enchimento); **T10** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo; **2** - Controlo com dextrose; **3** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^3 células/g); **4** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^6 células/g); **5** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^3 células/g); **6** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A observação da Tabela 39 permite concluir que para o pH, ao longo tempo de amostragem, foram observadas diferenças significativas entre o T0 (pré-enchimento) e os restantes tempos de amostragem, cabendo, como seria de esperar, os valores mais reduzidos aos últimos.

Efetuada uma análise por tempo de amostragem, no T0 as massas inoculadas com as modalidades 3 (*L. curvatus* L2B2 10^3), 4 (*L. curvatus* L2B2 10^6) e 5 (*L. sakei* CV3C2 10^3) apresentaram valores médios de $5,83 \pm 0,16$, $5,83 \pm 0,16$ e $5,82 \pm 0,15$, respetivamente, que foram significativamente mais reduzidos que o apresentado pelos paios controlo (modalidade 1), que foi de $5,94 \pm 0,09$. Ao nível sanitário, o decréscimo dos valores de pH nesta fase do processo é importante, uma vez que pode dificultar a multiplicação de alguma microbiota indesejável que esteja presente nas massas. Pensamos que esta

situação se deve à inoculação das estirpes de *Lactobacillus*, uma vez que se analisarmos a Tabela 42 abaixo apresentada, relativa aos parâmetros microbiológicos, concluímos que a concentração das bactérias referidas, de uma forma geral, foi ligeiramente superior nas modalidades inoculadas, ainda que sem significado estatístico. Esta rápida acidificação significa que as estirpes se adaptaram bem às condições existentes nas massas e, conseqüentemente, conseguiram metabolizar a dextrose adicionada. Wang *et al.* (2015) acrescentam que o facto dos valores serem baixos no início da fermentação acarreta benefícios não só ao nível sanitário, mas também poderão contribuir para a fixação da cor vermelha, melhoria da textura e redução dos teores de nitrito ao longo da cura. Em suma, contribui para a qualidade e segurança sanitária dos enchidos. Na fase intermédia da cura (T10) os valores de pH reduziram-se de forma considerável em todas as modalidades, aquela redução deveu-se, presumivelmente, às razões já apresentadas na discussão para os paios inoculados com estirpes de *Staphylococcus*.

No produto acabado, os paios associados à modalidade 5 apresentaram um valor médio ($5,06 \pm 0,10$) significativamente mais elevado que os das modalidades 3 (*L. curvatus* L2B2 10^3) e 6 (*L. sakei* CV3C2 10^6) que obtiveram os valores médios $4,95 \pm 0,07$ e $4,96 \pm 0,10$, respetivamente. Ao contrário do verificado para paios inoculados com *Staphylococcus*, não se verificou um ligeiro aumento do pH no produto acabado, causado, à partida, pela proteólise devida à ação microbiana, com conseqüente formação de péptidos, aminoácidos livres, amins e amoníaco, entre outros, aumentando deste modo a concentração de substâncias tampão, todavia, não podemos afirmar o referido para os nossos resultados, porque não efetuámos determinações que o asseverem. Porém, os valores foram bastante similares aos determinados na fase intermédia da cura. Simion *et al.* (2014) constataram o mesmo que nós, mas para enchidos não inoculados, enquanto Elias (2004) observou, no produto acabado, um incremento dos valores de pH em paios de porco Alentejano inoculados com culturas puras de *Lactobacillus*. Uma justificação, ainda que possa ser uma suposição, poderá estar relacionada com o facto das estirpes inoculadas no presente ensaio terem capacidade para produzir mais ácido que as de Elias (2004), compensado, desse modo, o incremento do pH devido à maior concentração de substâncias tampão.

É de referir que os enchidos alocados à formulação controlo com dextrose apresentaram valores médios de pH sempre inferiores aos controlo sem dextrose, todavia, essa diferença foi mais evidente no T10.

No que respeita a resultados obtidos por outros autores, Rubio *et al.* (2013) inocularam *L. plantarum* 299V e *L. rhamnosus* GC em enchidos espanhóis, com as concentrações de aproximadamente 10^3 células/g de massa e 10^7 células/g de massa e adicionaram 0,05% de dextrose + 0,7% de lactose. Antes

do enchimento não detetaram diferenças muito evidentes entre enchidos inoculados e controlo, situando-se os valores em torno de 6,0. Após a fermentação os valores reduziram-se de forma considerável, até que no produto acabado os enchidos controlo apresentaram um valor médio de $5,21 \pm 0,05$ e os inoculados apresentaram valores médios entre $4,69 \pm 0,01$ e $5,01 \pm 0,03$, que foram significativamente inferiores aos dos enchidos controlo. Tendencialmente, para a mesma estirpe, os paios inoculados por aqueles autores, com a concentração 10^7 células/g de massa, apresentaram valores médios do pH significativamente inferiores aos que foram inoculados com a concentração 10^3 células/g de massa. Baka *et al.* (2011) inocularam as estirpes *L. sakei* 8416, *L. sakei* 4413, *L. sakei* 8426, *L. plantarum* 7423 e *L. curvatus* 8427 com concentrações aproximadas de $2-5 \times 10^7$ células/g de massa em enchidos gregos e adicionaram 0,3% de sacarose + 0,1 de lactose. No início da cura não existiram diferenças entre os enchidos inoculados e controlo e os valores variaram entre 5,8 e próximos de 6,0. Os valores indicados foram-se reduzindo até à fase intermédia da cura para valores médios entre 4,5 e 5,5, e no produto acabado subiram ligeiramente, variando entre 4,9 e próximos de 5,1, mas não se observaram diferenças entre modalidades, ou seja, foram semelhantes aos obtidos no presente estudo. Elias (2004) verificou, em paios de porco Alentejano inoculados com uma concentração aproximada de 10^8 células/g de massa, que o pH aumentou de forma gradual à medida que a cura se foi consumando, independentemente dos paios terem sido inoculados com *L. sakei* 27L ou não terem sido sujeitos a inoculação, isto num primeiro ensaio. Num segundo ensaio com condições idênticas, os valores dos paios inoculados foram sempre inferiores aos dos não inoculados, apesar de não existirem diferenças significativas entre os mesmos. Todavia, em ambos os ensaios os valores obtidos pelo autor, no produto acabado, foram superiores aos por nós determinados, situando-se próximos dos 5,70 para os paios inoculados e controlo. Patarata (2002) também observou que a redução do pH foi mais acentuada quando utilizou culturas de arranque em que participaram bactérias lácticas do que quando a fermentação ocorreu de forma espontânea. Aquele autor, no produto acabado, obteve o valor médio de $5,23 \pm 0,05$ para as linguiças não inoculadas e valores médios compreendidos entre $5,13 \pm 0,12$ e $5,15 \pm 0,03$ para os enchidos inoculados. No presente ensaio as diferenças não foram tão pronunciadas.

De acordo com o descrito verificamos que os nossos resultados foram inferiores, superiores e até semelhantes aos apresentados pelos autores referidos. No produto acabado, também se confirma que, dos autores citados, apenas Rubio *et al.* (2013) e Patarata (2002) identificaram diferenças significativas entre os enchidos inoculados e os controlo. O referido mostra que, provavelmente, as bactérias lácticas indígenas tiveram uma capacidade acidificante que se aproximou das culturas inoculadas.

Quanto aos valores médios obtido para a a_w , ao longo do tempo de amostragem, verificaram-se diferenças significativas entre o produto acabado e os tempos que lhe antecederam, sendo os valores do produto acabado significativamente inferiores. A análise isolada por tempo de amostragem, permite-nos verificar que no T0 as massas não inoculadas, sem dextrose (modalidade 1), apresentaram o valor médio ($0,972 \pm 0,007$) mais elevado, tendo sido significativo para algumas massas inoculadas. Como seria expectável houve um decréscimo dos valores médios, para todas as modalidades, do T0 para o T10. No produto acabado foram os paios alocados às modalidades 2 (controlo com dextrose) e 5 (*L. sakei* CV3C2 10³) que apresentaram valores médios significativamente inferiores, $0,853 \pm 0,005$ e $0,858 \pm 0,013$, respetivamente, em relação aos associados à modalidade 6 ($0,876 \pm 0,030$). O valor médio obtido para os paios controlo foi de $0,861 \pm 0,015$. Rubio *et al.* (2013) obtiveram, nas condições descritas na discussão dos resultados obtidos para o pH, no produto acabado, valores médios superiores aos obtidos no presente estudo; tendo os mesmos sido de $0,907 \pm 0,00$ para os enchidos não inoculados e $0,908 \pm 0,000$ a $0,928 \pm 0,00$ para os inoculados, cabendo, portanto, o valor médio mais reduzido aos paios não inoculados. Casquete *et al.* (2012) obtiveram valores médios próximos de 0,80 para *salsichón* e chouriço espanhóis. Elias (2004) obteve valores médios para os paios inoculados com *L. sakei* 27 L de $0,775 \pm 0,070$ e $0,761 \pm 0,025$ num primeiro e segundo ensaios, respetivamente, para os controlo obteve $0,734 \pm 0,091$ e $0,821 \pm 0,029$, respetivamente. Com base nos resultados apresentados para os autores mencionados, verificamos que os resultados obtidos neste ensaio foram inferiores aos obtidos por Rubio *et al.* (2013) e superiores aos dos restantes autores. Julgamos que as diferenças nos valores da a_w se prenderão essencialmente com períodos de cura mais prolongados nos estudos que apresentaram valores inferiores para aquele parâmetro.

Os enchidos alocados à formulação controlo com dextrose apresentaram valores médios de pH sempre inferiores aos controlo, todavia, essa diferença foi mais evidente no T10 (fase intermédia da cura). A tendência para os valores serem mais reduzidos nos enchidos aos quais foi adicionada dextrose também se confirmou para a a_w , com exceção do T10.

5.2.2. Parâmetros microbiológicos

Na Tabela 40 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Tabela 40 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Mesófilos	F=8,8465 P=0,0003***
Psicrotróficos	F=17,5791 P=0,0000***
Bactérias láticas	F=0,4997 P=0,6082 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus spp.</i>	F=10,5114 P=0,0000***
Enterobactérias	F=4,2957 P=0,0161*
Bolores	F=2,1735 P=0,0161*
Leveduras	F=6,7308 P=0,0018**
<i>L. monocytogenes</i>	F=14,9512 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

Relativamente aos resultados obtidos, o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para as contagens de microrganismos mesófilos, psicrotróficos, *Staphylococcus spp.* e *L. monocytogenes*, muito significativo ($p < 0,01$) para leveduras, significativo ($p < 0,05$) para enterobactérias e bolores e não significativo ($p \geq 0,05$) para bactérias láticas. Os resultados da análise de variância seguem o observado para os parâmetros físico-químicos, demonstrando a variância entre lotes que resultará das variações naturais entre as matérias-primas usadas e todos os outros fatores que afetam a microbiota dos enchidos.

Na Tabela 41 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 41 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade G.L.=5	Tempo de amostragem G.L.=2	Modalidade x Tempo de amostragem G.L.=10
Mesófilos	F=0,8696 P=0,5049 ^{N.S.}	F=15,4527 P=0,0000***	F=1,9204 P=0,0523 ^{N.S.}
Psicrotróficos	F=0,6867 P=0,6347 ^{N.S.}	F=45,6776 P=0,0000***	F=0,2793 P=0,9843 ^{N.S.}

Tabela 41 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Fatores			
Variáveis	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=5	G.L.=2	G.L.=10
Bactérias láticas	F=2,3455 P=0,0475*	F=299,5859 P=0,0000***	F=0,7867 P=0,6414 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus</i> spp.	F=0,6821 P=0,6381 ^{N.S.}	F=19,8014 P=0,0000***	F=0,4168 P=0,9352 ^{N.S.}
Enterobactérias	F=1,3944 P=0,2339 ^{N.S.}	F=151,8137 P=0,0000***	F=1,0603 P=0,4011 ^{N.S.}
Bolores	F=0,7339 P=0,5999 ^{N.S.}	F=0,0929 P=0,9114 ^{N.S.}	F=0,8096 P=0,6199 ^{N.S.}
Leveduras	F=0,7236 P=0,6075 ^{N.S.}	F=16,3033 P=0,0000***	F=1,2115 P=0,2945 ^{N.S.}
<i>L. monocytogenes</i>	F=0,2260 P=0,9503 ^{N.S.}	F=2,0344 P=0,1367 ^{N.S.}	F=0,9914 P=0,4569 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S.= Não Significativo; * Significativo para $p < 0,05$; *** Significativo para $p < 0,001$

Analisando a Tabela 41 podemos inferir que o fator modalidade foi significativo ($p < 0,05$) para bactérias láticas e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis. Entre tempos de amostragem os microrganismos mesófilos, psicotróficos, bactérias láticas, *Staphylococcus* spp., enterobactérias e leveduras apresentaram diferenças altamente significativas ($p < 0,001$), enquanto para bolores e *L. monocytogenes* as diferenças não foram significativas ($p \geq 0,05$). Para a interação entre fatores não se identificaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$). O fator tempo de amostragem mostrou-se significativo sobre mais parâmetros que a modalidade de inoculação, revelando que as estirpes não tiveram um efeito pronunciado sobre a microbiota dos enchidos.

Na Tabela 42 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paços de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 42 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Parâmetros										
Tempo de amostra	Modalidade	Mesófilos	Psicrotróficos	Bactérias lácticas	<i>Staphylococcus</i> spp.	Enterobactérias	Bolores	Leveduras	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
T0	1	6,50 ^{AB} ±0,67	6,48 ^{AB} ±0,70	3,72 ^B ±1,06	4,65 ^B ±0,91	5,33 ^A ±0,56	0,38 ±0,60	3,80 ^B ±0,52	8,33 ±15,71	2
	2	6,51 ^{AB} ±0,35	6,62 ^{AB} ±0,75	3,71 ^C ±1,13	4,67 ^B ±0,88	5,41 ^A ±0,10	0,22 ±0,53	4,00 ±0,57	5,00 ±5,47	2
	3	6,56 ^A ±0,49	6,56 ^A ±0,63	4,59 ^C ±0,50	4,55 ^B ±0,98	4,40 ^A ±0,35	< 1	3,50 ±0,61	10,00 ±10,95	1
	4	6,39 ±0,45	6,59 ^A ±0,55	4,56 ^B ±0,53	4,67 ^B ±0,91	5,48 ^A ±0,31	< 1	3,66 ±0,41	5,83 ±8,01	1
	5	6,68 ±0,36	6,70 ^{AB} ±0,38	4,04 ^B ±1,28	4,40 ^B ±0,95	5,55 ^A ±0,42	< 1	3,59 ^B ±0,31	4,17 ±8,01	ND
	6	6,4 ±0,65	6,48 ^{AB} ±0,41	3,92 ^C ±0,89	4,93 ±0,15	5,16 ^A ±0,50	< 1	3,78 ±0,29	3,33 ±5,16	1
T10	1	7,20 ^A ±0,41	7,45 ^A ±0,40	7,83 ^A ±0,15	6,63 ^A ±0,83	5,14 ^A ±1,63	< 1	4,65 ^A ±0,36	3,33 ±8,26	2
	2	7,54 ^A ±1,14	7,57 ^A ±0,58	8,40 ^A ±0,58	6,51 ^A ±1,25	4,82 ^A ±1,62	0,53 ±1,15	4,43 ±0,44	7,50 ±8,21	3
	3	7,04 ^A ±0,81	7,12 ^A ±0,87	8,60 ^A ±0,93	6,27 ^A ±0,24	4,60 ^A ±0,88	0,27 ±0,65	4,08 ±0,64	3,33 ±6,05	2
	4	6,61 ±0,41	6,88 ^A ±0,77	8,52 ^A ±1,44	6,49 ^A ±0,63	4,33 ^A ±0,93	0,22 ±0,53	3,98 ±0,38	5,00 ±6,32	2
	5	7,00 ±0,43	7,57 ^A ±0,54	8,20 ^A ±0,60	7,21 ^A ±1,90	5,41 ^A ±1,30	< 1	4,59 ^A ±0,34	10,83 ±12,00	2
	6	7,65 ±0,66	7,47 ^A ±0,88	8,95 ^A ±0,77	6,70 ±2,75	5,55 ^A ±1,46	< 1	4,28 ±0,49	11,67 ±12,52	1
TFinal	1	5,84 ^B ±0,76	5,68 ^B ±1,00	7,55 ^{A,ab} ±0,19	6,46 ^{AB} ±1,67	1,24 ^B ±1,19	< 1	3,88 ^B ±0,34	9,17 ±20,10	1
	2	5,80 ^B ±0,87	5,35 ^B ±1,34	6,98 ^{B,b} ±0,98	5,39 ^{AB} ±1,02	1,33 ^B ±1,37	0,17 ±0,41	3,65 ±0,96	< 1	ND
	3	5,46 ^B ±0,66	5,20 ^B ±0,78	7,59 ^{B,ab} ±0,30	4,80 ^B ±0,34	0,17 ^B ±0,41	0,33 ±0,82	4,03 ±0,39	< 1	1
	4	7,00 ±1,32	5,30 ^B ±0,96	8,02 ^{A,a} ±0,75	5,57 ^{AB} ±0,89	1,97 ^B ±1,10	0,22 ±0,53	3,90 ±0,44	3,33 ±6,06	ND
	5	6,44 ±1,08	5,76 ^B ±1,29	7,60 ^{A,ab} ±0,21	6,03 ^{AB} ±1,72	2,01 ^B ±1,35	< 1	3,72 ^B ±0,36	2,50 ±6,12	ND
	6	6,49 ±1,31	5,66 ^B ±1,13	7,65 ^{A,ab} ±0,18	5,47 ±2,03	1,33 ^B ±1,71	< 1	3,86 ±0,31	1,67 ±2,58	ND

T0 (pré-enchimento); **T10** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo; **2** - Controlo com dextrose; **3** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^3 células/g); **4** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^6 células/g); **5** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^3 células/g); **6** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g).

Listeria monocytogenes apresenta-se em ufc/g. Os restantes parâmetros contáveis apresentam-se em log ufc/g. Os valores indicados para *Salmonella* spp. referem-se ao número de resultados positivos em 6 amostras.

<1 - Contagens inferiores a uma unidade formadora de colónia por grama (ufc/g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

ND - Não detetado (ausência em 25g).

Da análise da Tabela 42, conclui-se que as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos foram semelhantes até ao T10 (fase intermédia da cura). No TFinal (produto acabado) os paços inoculados com *L. curvatus* L2B2 10^6 , *L. sakei* CV3C2 10^3 e *L. sakei* CV3V2 10^6 (modalidades 4, 5 e 6, respetivamente) apresentaram contagem superiores, de 1 log ufc/g a 1,5 log ufc/g para o grupo dos microrganismos mesófilos, face aos microrganismos psicrotróficos. No T0, para os dois grupos microbianos, os resultados rondaram os 6,5 log ufc/g, no T10 foram próximos dos 7,0 log ufc/g e no produto acabado variaram entre os 5,5 log ufc/g para psicrotróficos e os 7,0 log ufc/g para microrganismos mesófilos.

Para as contagens de microrganismos mesófilos, Ruiz-Moyano *et al.* (2011), no início da cura, observaram diferenças significativas entre enchidos espanhóis não inoculados e inoculados com *L. fermentum* HL57 e *P. acidilactici* SP979, na concentração aproximada de 5×10^7 log ufc/g de massa e sem açúcar adicionado. Naquela fase da cura, os valores variaram entre os 6 log ufc/g para os enchidos controlo e os 6,5 log ufc/g e 8 log ufc/g para os inoculados com *Pediococcus* e *Lactobacillus*, respetivamente. Todavia, no produto acabado não observaram diferenças entre os enchidos inoculados e não inoculados, mas as concentrações foram superiores a 8 log ufc/g. Valor que também foi contado por Casquete *et al.* (2012) e Elias (2004), independentemente das amostras terem sido inoculadas ou não, e por Benito *et al.* (2007) e Fontan *et al.* (2007), mas estes dois últimos grupos de autores não inocularam culturas de arranque, como tal, apenas servem de referência para a concentração de 8 log ufc/g no produto acabado.

O que escrevemos nos dois parágrafos anteriores para o produto acabado, revela que os resultados obtidos no presente estudo foram um pouco inferiores - 1 a 2,5 log ufc/g - aos obtidos nos estudos referidos, parecendo que as estirpes tiveram alguma dificuldade em adaptarem-se ao meio e, conseqüentemente multiplicar-se, possivelmente, porque tiveram dificuldade em competir com a microbiota indígena.

Para as contagens de microrganismos psicrotróficos, Casquete *et al.* (2012) e Benito *et al.* (2007), no produto acabado, observaram contagens similares às obtidas no presente estudo, já Elias (2004) obteve valores com aproximadamente mais 1 log ufc/g a 2 log ufc/g nos dois ensaios realizou. O grupo dos microrganismos psicrotróficos apresentou contagens semelhantes às da maioria dos autores e citados, o que é positivo na medida em que este grupo microbiano poderá ter efeitos depreciativos, nomeadamente ao nível sensorial, sobre os enchidos.

No que respeita às contagens de bactérias lácticas, verificou-se um incremento do T0 para os restantes tempos de amostragem, havendo mesmo diferenças significativas. Porém, no produto acabado observou-se um ligeiro decréscimo deste grupo bacteriano face ao T10 (fase intermédia da cura).

Quando efetuamos uma análise por tempo de amostragem, verificamos que apenas existiram diferenças significativas no produto acabado, tendencialmente os paios inoculados apresentaram contagens superiores e os enchidos controlo aos quais se adicionou dextrose apresentaram as contagens mais reduzidas. No entanto, no T0, apesar de não existirem diferenças entre enchidos inoculados e não inoculados, notamos que os primeiros apresentaram, de uma forma geral, valores médios com aproximadamente mais meio valor na escala logarítmica. Também importa evidenciar que para os paios não inoculados com e sem dextrose não se observaram quaisquer diferenças, pois os resultados obtidos foram de $3,72 \pm 1,06 \log \text{ ufc/g}$ e $3,71 \pm 1,13 \log \text{ ufc/g}$, respetivamente. Apesar de termos inoculado as estirpes em concentrações aproximadas de 10^3 e 10^6 células/g de massa, não existiram diferenças entre modalidades, todas apresentaram contagens próximas dos $4 \log \text{ ufc/g}$, revelando que poderá ter ocorrido perda de microrganismos viáveis durante as 72 h de maturação, no entanto, excluimos essa hipótese porque, como havíamos referido no capítulo materiais e métodos deste trabalho, a mesma foi atestada mediante a sementeira em placas de diluições decimais de amostras de inóculo, recolhidas antes da inoculação das massas de carne. Todavia, as concentrações inoculadas variaram entre 10^3 e 10^6 células/g de massa, como tal, teoricamente, deveriam existir diferenças entre as modalidades de inoculação, mas não será de excluir a possibilidade de terem ocorrido interações entre a microbiota indígena e a inoculada, durante a maturação das massas. No T10 houve um aumento da concentração deste grupo microbiano e foram os paios controlo sem dextrose (modalidade 1) que apresentaram o valor médio ($7,83 \pm 0,15 \log \text{ ufc/g}$) mais reduzido e os alocados à modalidade 6 (*L. sakei* CV3C2 10^6) o mais elevado, valor que foi de $8,95 \pm 0,77 \log \text{ ufc/g}$. Naquele momento da cura, a adição de dextrose alimentar parece ter tido algum efeito porque os enchidos aos quais foi adicionada, independentemente de serem ou não inoculados, apresentaram um incremento de quase $1 \log \text{ ufc/g}$ por comparação com os controlo sem dextrose. Esta evolução é natural uma vez que, depois de atingido o máximo de multiplicação, a duração da fase estacionária é muito dependente da disponibilidade de nutrientes, que era maior nas modalidades às quais foi adicionada dextrose. No produto acabado não se notaram grandes diferenças entre modalidades, porém, o valor médio ($6,98 \pm 0,98 \log \text{ ufc/g}$) mais baixo coube aos enchidos associados à modalidade 2 (controlo com dextrose) e o mais elevado ($8,02 \pm 0,75 \log \text{ ufc/g}$) aos paios inoculados com *L. curvatus* L2B2 10^6 ufc/g de massa, tendo existido significância entre os mesmos.

Como já foi mencionado algumas vezes ao longo deste trabalho, as bactérias lácticas constituem a maior parte da microbiota dos enchidos ao longo do processo de cura e no produto acabado, sendo o género *Lactobacillus* aquele que predomina (Talon & Leroy, 2011), o que também foi corroborado pelo presente estudo. Autores como Rubio *et al.* (2013); Casquete *et al.* (2012); Baka *et al.* (2011); Ruiz-Moyano (2011) e Elias (2004), acerca do produto acabado, apresentaram resultados superiores

ou muito próximos de 8 log ufc/g em enchidos inoculados e Benito *et al.* (2007) apresentaram valores médios próximos de 7 log ufc/g em enchidos não inoculados. Também já foi referido no capítulo revisão bibliográfica que o abaixamento do pH facilita esta predominância face a outros grupos microbianos, como por exemplo *Staphylococcus* spp. Leroy *et al.* (2015b) alertam para as consequências de valores de pH elevados (>6,5) que podem culminar com atividades excessivas dos bolores, conduzindo a um aumento da amónia e consequentemente redução de ácido láctico.

Os valores por nós obtidos aproximaram-se dos 8 log ufc/g, com exceção dos paios alocados à modalidade controlo com dextrose que ficaram por $6,98 \pm 0,98$ log ufc/g. Guyot *et al.* (2000) observaram, na presença de glicose, que a taxa de multiplicação de *L. manihotivorans* LMG 18010 permaneceu inalterada, sugerindo que o fluxo de energia adicional obtido a partir da fermentação direta de glicose foi utilizada para funções diferentes da multiplicação, provavelmente para a manutenção celular. Spaziani *et al.* (2009) também concluíram que a adição de 0,5% de glicose às massas não apresentou grandes diferenças nas contagens de LAB, por comparação com as massas sem açúcar fermentescível adicionado.

As contagens de *Staphylococcus* spp. foram significativamente superiores no T10, por comparação com o T0. As contagens mencionadas aumentaram 2 log ufc/g a 2,5 log ufc/g do T0 para o T10, diminuindo na última fase do processo produtivo devido ao abaixamento do valor da a_w , nesta fase os valores ficaram próximos dos 6 log ufc/g. No T0 os valores médios rondaram os 4,5 log ufc/g e no T10 os 6,5 log ufc/g.

Benito *et al.* (2007), para chouriço e *salsichón* espanhóis não inoculados, não perceberam diferenças ao longo do processo produtivo e os valores situaram-se entre os 3 log ufc/g e os 5 log ufc/g. Baka *et al.* (2011), em enchidos gregos, quantificaram 4 log ufc/g no início da cura para enchidos controlo e inoculados com estirpes de *L. sakei* e *L. plantarum* na concentração aproximada $2-5 \times 10^7$ células g/ de massa, a meio da cura e no produto acabado os enchidos controlo mantiveram a mesma concentração. Porém, os inoculados alternaram entre os 3,5 e 4,7 log ufc/g. Elias (2004) obteve resultados, em paios de porco Alentejano, próximos dos 6 log ufc/g no início da cura e no produto acabado, independentemente de serem ou não inoculados.

O descrito permite-nos inferir que os resultados obtidos neste estudo ficaram acima dos obtidos por Benito *et al.* (2007) e Baka *et al.* (2011) e foram próximos dos obtidos por Elias (2004). Os valores apresentados encontram-se próximos dos habitualmente encontrados em enchidos que, dependendo da microbiota das matérias-primas e das condições de processamento, poderão variar de 6,0 log ufc/g a 8,0 log ufc/g (Vignolo *et al.*, 2010; Ammor & Mayo, 2007).

Para as contagens de enterobactérias, como seria de esperar, houve um decréscimo considerável por comparação entre o T0 e o TFinal. Todavia, no T10 as concentrações mantiveram-se próximas das obtidas no T0, isto é, próximas dos 5 log ufc/g. Significando, portanto, que os valores obtidos no produto acabado foram significativamente mais reduzidos que os dos tempos que lhe antecederam. No produto acabado os valores variaram entre os $0,17 \pm 0,41$ log ufc/g e os $2,01 \pm 1,35$ log ufc/g. Uma análise isolada por tempo de amostragem permite concluir que não existiram diferenças entre modalidades em nenhum dos três tempos de análise. As contagens inferiores no produto acabado resultaram do efeito conjunto da redução do pH, redução da a_w , produção de bacteriocinas por parte das bactérias lácticas e fenómenos competitivos que conduziram à redução desta microbiota Gram-negativo (Lu *et al.*, 2015).

Garriga *et al.* (2015) referem que é comum no início do processo de cura as contagens de enterobactérias variarem entre 3 e 6 log ufc/g. Elias (2004), a par do presente estudo, obteve resultados próximos dos 5 log ufc/g quer em enchidos inoculados com *L. sakei* 27 L quer nos controlo, em dois ensaios distintos. Casquete *et al.* (2012) obtiveram resultados (6,5 log ufc/g) ligeiramente superiores em chouriços e *salchichón* espanhóis. Em sentido oposto, Baka *et al.* (2011), em enchidos gregos inoculados com *L. sakei* e *L. plantarum*, obtiveram valores próximos de 3,5 log ufc/g, valores semelhantes aos de González-Fernández *et al.* (2003) para chouriços espanhóis inoculados e não inoculados, assim como Rubio *et al.* (2013) em enchidos espanhóis inoculados com *L. rhamnosus* e *L. plantarum*. Valores elevados de enterobactérias nas fases iniciais da cura poderão representar incrementos nas concentrações de amins biogénicas (Bover-Cid *et al.*, 2003; Vidal-Carou *et al.*, 1990) e, eventualmente, depreciação ao nível sensorial, essencialmente justificada pela formação de sulfeto de hidrogénio (Garriga *et al.*, 1996). Na fase intermédia da cura, Baka *et al.* (2011) e González-Fernández *et al.* (2003), obtiveram valores próximos de 1 log ufc/g, Rubio *et al.* (2013), próximos de 2 log ufc/g, Casquete *et al.* (2012), próximos de 2,5 log ufc/g e Elias (2004) próximos de 3,5 log ufc/g. No produto acabado, Baka *et al.* (2011) obtiveram valores inferiores ao limite de deteção do método, González-Fernández *et al.* (2003) próximos de 1 log ufc/g, mas, de entre os enchidos inoculados apenas os inoculados com *Pediococcus* P208 apresentaram contagem. Casquete *et al.* (2012) obtiveram resultados semelhantes aos dos últimos autores, enquanto Rubio *et al.* (2013) inferiores aos limites de deteção do método para os enchidos inoculados com *L. rhamnosus* 10^7 células/g de massa e *L. plantarum* 10^7 células/g de massa, valores próximos de 1,5 log ufc/g para as mesmas estirpes inoculadas com uma concentração aproximada de 10^5 células/g de massa e 6,43 log ufc/g para os enchidos não inoculados.

Julgamos que os resultados obtidos no presente estudo indicam enchidos com adequado nível de higiene e segurança alimentar, visto os mesmos não ultrapassarem os $2,01 \pm 1,35$ log ufc/g de massa. No que concerne a bolores, não se observaram diferenças significativas entre modalidades nem ao longo do tempo de amostragem. No T0 apenas os paios que não foram inoculados (modalidades 1 e 2) apresentaram valores contáveis. No T10 esta tendência foi verificada para a modalidade controlo com dextrose (modalidade 2) e para as modalidades inoculadas com *L. curvatus* L2B2 10^3 células/g de massa e 10^6 células/g de massa (3 e 4, respetivamente). No produto acabado manteve-se o descrito para o T10. As contagens que não foram inferiores ao limite de deteção do método, independentemente do momento da cura, foram todas inferiores a 0,55 log ufc/g. Casquete *et al.* (2012), em chouriço e *salchichón* espanhóis inoculados com *P. acidilactici* e *S. vitulus* nas concentrações aproximadas de 5×10^7 células/g de massa, obtiveram valores médios entre 1,48 log ufc/g e 2,34 log ufc/g no início da cura, e valores médios próximos de 2 log ufc/g no produto acabado, os autores indicados também não observaram diferenças entre modalidades para os momentos de análise referidos. Alves *et al.* (2016), em paios de porco Alentejano e em paios produzidos a partir de matérias-primas de porcos cruzados (porco Ibérico X Duroc), com diâmetros e tempos de cura distintos, ambos não inoculados, obtiveram valores próximos de 0,70 log ufc/g para os paios de porco Alentejano e próximos de 1,5 log ufc/g para os paios de porco Ibérico X Duroc, isto no produto acabado. Os resultados por nós obtidos no produto acabado foram inferiores aos dos autores apresentados o que poderá ser indicador de estabilidade microbiana. Como já foi referido, concentrações elevadas daqueles microrganismos no produto acabado poderão acarretar depreciação sensorial (Berni, 2015; Sunesen & Stahnke, 2003).

Para as contagens de *L. monocytogenes* não houve diferenças significativas entre modalidades e tempos de amostragem. Nos T0 e T10 os valores variaram entre 3 e 11 ufc/g. Porém, no produto acabado foram os paios alocados às modalidades 2 (controlo com dextrose) e 3 (*L. curvatus* L2B2 10^3) aqueles que apresentaram um valor inferior ao limite de deteção do método (<1 ufc/g). Entre as restantes modalidades, foi a modalidade 1 (controlo) que apresentou o valor médio mais elevado ($9,17 \pm 20,10$ ufc/g) e a modalidade 6 (*L. sakei* CV3C2 10^6) que apresentou o valor médio ($1,67 \pm 2,58$ ufc/g) mais reduzido. Importa ressaltar que todos os valores foram inferiores aos indicados na legislação vigente (100 ufc/g, segundo o Reg. 1441/2007) para alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitirem o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos.

Casquete *et al.* (2012), em enchidos espanhóis inoculados com *P. acidilactici* e *S. vitulos* na concentração aproximada de 5×10^7 células g/massa, Lebert *et al.* (2007b) e Drosinos *et al.* (2005),

ambos em enchidos não inoculados, também contaram *L. monocytogenes* no início da cura, mas as concentrações foram-se reduzindo ao longo da mesma e, nalguns casos, como a obtenção do produto acabado, foi inferior ao limite de deteção do método, como foi o caso de Casquete *et al.* (2012) e Drosinos *et al.* (2005). Porém, Lebert *et al.* (2007b) confirmaram a presença de *L. monocytogenes* em 3 enchidos prontos a consumir e que foram produzidos em França, num total de 9. Os valores médios obtidos pelos últimos autores variaram entre 1,2 log ufc/g e 2,8 log ufc/g, isto é, valores muito superiores aos obtidos neste estudo e que representam um perigo biológico, tornando os enchidos impróprios para consumo, e uma violação da lei por ultrapassarem o limite legal acima indicado.

No T0, *Salmonella* spp. só foi negativa para os paios alocados à modalidade 5 (*L. sakei* CV3C2 10³), no entanto, as modalidades não inoculadas (1 e 2) apresentaram duas amostras positivas em seis amostras analisadas, enquanto as inoculadas apresentaram uma positiva no mesmo número de amostras analisadas. No T10 todas as modalidades apresentaram *Salmonella* spp. e no produto acabado as modalidades 1 (controlo) e 3 (*L. curvatus* L2B2 10³) foram as únicas a manter amostras positivas, neste caso uma em seis possíveis. A *Food Safety Authority of Ireland* (FSAI) (2011) refere que fatores como a a_w e o pH afetam significativamente a multiplicação de *Salmonella* spp. A mesma autoridade, indica que os limites mínimos de a_w e de pH para a multiplicação e manutenção de *Salmonella* spp. se situam em 0,94 e 3,8, respetivamente, isto é, abaixo de algum daqueles valores as células ficam inativas, porém, não são eliminadas, podendo sobreviver durante anos em géneros alimentícios com valores de a_w bastante reduzidos, como a pimenta preta, o chocolate e a gelatina (Podolak *et al.*, 2010; ICMSF, 1996). No produto acabado, os paios onde *Salmonella* spp. foi detetada apresentaram valores médios de a_w inferiores a 0,866 e pH \leq 5,0. Tendo como referência os valores limite indicados pela FSAI para a a_w e para o pH, e os determinados nos paios, julgamos que os mesmos seriam suficientes para inativar o grupo de bactérias em análise, porém, insuficientes para o eliminar. Como referido no capítulo materiais e métodos, todos os valores positivos para *Salmonella* spp. foram confirmados, como tal, a justificação poderá estar no facto da mesma estar presente, mas inativa.

A adição de dextrose alimentar (0,25%) nos enchidos controlo teve algum efeito no que respeita aos indicadores de segurança *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., por comparação com os controlo sem dextrose, provavelmente porque os valores de pH e a_w foram ligeiramente inferiores nos que sofreram a adição do monossacárido referido.

González-Fernandez *et al.* (2006) e Bover-Cid *et al.* (2001) só observaram o efeito pronunciado da adição de açúcar sobre enterobactérias.

5.2.3. Determinação de aminas biogénicas

Na Tabela 43 é mostrada a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Tabela 43 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Triptamina	F=32,5204 P=0,0000***
β-feniletilamina	F=8,2251 P=0,0004***
Putrescina	F=0,2352 P=0,7907 ^{N.S.}
Cadaverina	F=7,4148 P=0,0008***
Histamina	F=9,3443 P=0,0001***
Tiramina	F=34,7718 P=0,0000***
Espermidina	F=19,2442 P=0,0000***
Espermina	F=7,4597 P=0,0007***
Aminas vasoativas	F=40,1503 P=0,0000***
Total de aminas	F=11,0029 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo ***Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 43 permite concluir que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as variáveis, com exceção de putrescina para o qual não foi significativo ($p \geq 0,05$). Como referido no capítulo revisão bibliográfica e na apresentação, análise e discussão dos resultados para as inoculações com culturas puras de *Staphylococcus*, os teores de aminas biogénicas estão sujeitos a múltiplos fatores, onde se encontram o pH e os parâmetros microbiológicos, posto isto, os resultados obtidos para a análise de variância poderão ser considerados expectáveis, em função dos que havíamos determinado para o pH e para os parâmetros microbiológicos.

Na Tabela 44 apresenta-se a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 44 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis (mg/kg de enchido)	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=5	G.L.=2	G.L.=10
Triptamina	F=13,8707 P=0,0000***	F=7,4189 P=0,0008***	F=0,1917 P=0,9967 ^{N.S.}
β-feniletilamina	F=11,8981 P=0,0000***	F=56,1893 P=0,0000***	F=5,9708 P=0,0000***
Putrescina	F=4,2221 P=0,0011**	F=349,4625 P=0,0000***	F=0,9857 P=0,4572 ^{N.S.}
Cadaverina	F=6,0112 P=0,0000***	F=140,3958 P=0,0000***	F=0,8658 P=0,5663 ^{N.S.}
Histamina	F=3,5924 P=0,0000***	F=19,7286 P=0,0000***	F=4,4649 P=0,0000***
Tiramina	F=0,9358 P=0,4589 ^{N.S.}	F=18,4254 P=0,0000***	F=1,1150 P=0,3525 ^{N.S.}
Espermidina	F=9,9018 P=0,0000***	F=22,5703 P=0,0000***	F=0,0007 P=1,0000 ^{N.S.}
Espermina	F=12,1328 P=0,0000***	F=0,7791 P=0,4602 ^{N.S.}	F=0,0455 P=1,0000 ^{N.S.}
Aminas vasoativas	F=11,9654 P=0,0000***	F=13,9208 P=0,0000***	F=0,2381 P=0,9921 ^{N.S.}
Total de aminas	F=10,6965 P=0,0000***	F=171,4867 P=0,0000***	F=0,3523 P=0,9649 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; **Significativo para $p < 0,01$; ***Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 44 permite verificar que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as variáveis, com exceção de tiramina para o qual foi não significativo ($p \geq 0,05$). O fator tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as variáveis, com exceção de espermina, para a qual foi não significativo ($p \geq 0,05$) e a interação entre os fatores mencionados foi altamente significativa ($p < 0,001$) para β-feniletilamina e histamina e não significativa ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis.

Na Tabela 45 são exibidos os valores médios e desvios padrão para as aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 45 - Valores médios e desvios padrão de aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Parâmetros (mg/kg de enchido)											
Tempo de amostragem	Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Aminavasotivas	Totaldeaminas
T0	1	355,30 ^a ±163,79	6,30 ^{B,a} ±2,88	80,91 ^{B,a} ±20,65	212,51 ^{B,a} ±100,90	0,17 ±0,43	36,73 ^B ±32,23	12,77 ^{A,a} ±0,97	46,48 ^a ±7,22	398,50 ^a ±148,62	751,16 ^{B,a} ±186,93
	2	114,66 ^b ±162,46	6,42 ^{B,a} ±3,53	21,18 ^{B,b} ±15,18	74,35 ^{B,b} ±64,26	0,32 ±0,69	49,15 ±29,62	10,92 ^{ab} ±2,96	34,46 ^{ab} ±17,35	170,54 ^b ±186,62	311,36 ^{B,b} ±233,34
	3	45,48 ^{B,b} ±77,40	3,80 ^{B,b} ±0,38	93,41 ^{B,a} ±48,58	187,63 ^{B,a} ±95,73	ND ^B	43,63 ^B ±25,31	12,01 ^{A,ab} ±0,61	45,82 ^a ±5,38	98,94 ^{B,b} ±90,02	437,80 ^{B,b} ±187,38
	4	67,89 ^b ±95,02	3,97 ^{B,b} ±0,10	68,69 ^{B,b} ±70,27	138,95 ^{B,ab} ±138,46	ND ^B	32,37 ±19,39	11,63 ^{ABC,ab} ±1,48	40,73 ^{ab} ±9,31	104,23 ^{B,b} ±105,58	364,23 ^{B,b} ±185,27
	5	48,42 ^b ±78,72	3,61 ^{B,b} ±0,53	52,48 ^{B,ab} ±19,94	108,02 ^{B,ab} ±39,20	ND	45,93 ±43,97	9,73 ^b ±2,55	29,71 ^b ±17,92	97,96 ^b ±106,79	297,91 ^{B,b} ±161,63
	6	119,03 ^b ±178,70	3,84 ^{B,b} ±0,78	60,74 ^{B,ab} ±26,15	119,08 ^{B,ab} ±50,59	ND ^B	39,82 ^B ±11,43	11,68 ^{ab} ±2,01	45,62 ^a ±12,57	166,69 ^b ±185,20	399,81 ^{B,b} ±222,15
T10	1	296,96 ^a ±259,68	7,08 ^{B,a} ±2,88	81,67 ^{B,a} 20,53	201,88 ^{B,a} ±93,37	0,14 ±0,38	36,26 ^B ±33,87	12,58 ^{A,a} ±0,97	44,62 ^a ±7,16	340,45 ^a ±255,47	681,19 ^{B,a} ±304,89
	2	130,60 ^{ab} ±163,62	7,22 ^{B,a} ±3,55	21,94 ^{B,b} ±15,32	56,77 ^{B,a} ±32,64	0,29 ±0,64	48,06 ±29,81	10,79 ^{ab} ±2,99	32,78 ^{ab} ±17,45	186,25 ^{ab} ±187,96	308,53 ^{B,b} ±227,02
	3	66,83 ^{B,b} ±76,31	4,60 ^{B,b} ±0,38	94,46 ^{B,a} ±48,74	194,26 ^{B,a} ±96,03	ND ^B	42,40 ^B ±25,31	11,86 ^{A,ab} ±0,61	44,09 ^a ±5,41	113,83 ^{B,b} ±89,91	458,40 ^{B,ab} ±187,47
	4	83,19 ^b ±94,98	4,75 ^{B,b} ±0,10	69,36 ^{B,ab} ±70,00	144,80 ^{B,ab} ±137,91	ND ^B	47,69 ±43,88	11,43 ^{ABC,ab} ±1,48	38,81 ^{ab} ±9,28	135,62 ^{AB,b} ±129,53	400,02 ^{B,b} ±188,51
	5	62,96 ^b ±79,76	4,41 ^{B,b} ±0,52	70,15 ^{B,ab} ±46,00	129,72 ^{B,ab} ±90,45	ND	44,71 ±43,96	9,58 ^b ±2,56	27,96 ^b ±17,94	112,08 ^b ±107,79	349,49 ^{B,b} ±174,15
	6	129,52 ^{ab} ±171,75	4,64 ^{B,b} ±0,77	50,77 ^{B,ab} ±28,55	129,86 ^{B,ab} ±51,61	ND ^B	38,61 ^B ±11,38	11,54 ^{ab} ±2,02	43,90 ^a ±12,60	172,77 ^{ab} ±177,83	408,84 ^{B,b} ±215,25

T0 (pré-enchimento); T10 (fase intermédia da cura); TFinal (produto acabado).

1 - Controlo; 2 - Controlo com dextrose; 3 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^3 células/g); 4 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^6 células/g); 5 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^3 células/g); 6 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g). O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina. Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. ND - Não detetado

Tabela 45 (continuação) - Valores médios e desvios padrão de aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Parâmetros (mg/kg de enchido)											
Tempo de amostragem	Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Aminavasotivas	Totaldeaminas
TFinal	1	385,41 ^a ±287,49	26,54 ^{A,a} ±15,14	382,11 ^A ±146,91	439,75 ^A ±173,33	0,33 ^{ab} ±0,54	79,37 ^A ±37,21	10,79 ^{B,a} ±0,97	44,49 ^a ±7,16	491,62 ^a ±296,36	1368,76 ^{A,a} ±388,26
	2	210,18 ^{ab} ±123,64	18,29 ^{A,abc} ±14,31	371,24 ^A ±163,47	387,21 ^A ±124,29	0,28 ^{ab} ±0,42	70,51 ±58,25	8,97 ^{ab} ±2,98	32,63 ^{ab} ±17,47	299,27 ^{ab} ±172,74	1099,31 ^{A,ab} ±455,19
	3	179,87 ^{A,ab} ±112,37	7,10 ^{A,cd} ±3,82	491,65 ^A ±160,68	375,00 ^A ±73,87	0,90 ^{A,a} ±0,55	110,41 ^A ±91,05	10,05 ^{B,ab} ±0,63	43,91 ^a ±5,46	298,28 ^{A,ab} ±129,13	1218,89 ^{A,ab} ±122,11
	4	171,49 ^{ab} ±128,93	5,42 ^{A,d} ±0,98	428,86 ^A ±161,86	378,68 ^A ±65,16	0,91 ^{A,a} ±0,87	68,99 ±41,20	9,53 ^{B,ab} ±1,52	38,35 ^{ab} ±9,68	246,80 ^{A,b} ±158,56	1002,22 ^{A,ab} ±153,81
	5	140,04 ^b ±130,70	9,16 ^{A,bcd} ±5,89	340,24 ^A ±133,04	354,92 ^A ±121,50	ND ^b	54,57 ±29,94	7,76 ^b ±2,58	24,45 ^b ±17,39	203,77 ^b ±160,91	931,14 ^{A,b} ±424,62
	6	197,20 ^{ab} ±208,41	19,40 ^{A,ab} ±11,24	415,74 ^A ±78,70	360,82 ^A ±106,01	0,28 ^{A,ab} ±0,47	76,19 ^A ±21,53	9,72 ^{ab} ±2,06	43,63 ^a ±12,66	293,07 ^{ab} ±225,75	1122,98 ^{A,ab} ±386,61

T0 (pré-enchimento); **T10** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo; **2** - Controlo com dextrose; **3** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^3 células/g); **4** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^6 células/g); **5** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^3 células/g); **6** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g).

O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina.

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. ND - Não detetado.

A análise da Tabela 45 permite inferir que os teores de β -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e tiramina apresentaram uma tendência comum, isto é, de uma forma geral, foram aumentando à medida que cura se foi consumando, algo que Stadnik & Dolatowski (2010) e Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmonero (2004) também haviam verificado.

A presença das poliaminas naturais espermidina e espermina, mais uma vez, seguiu o padrão habitualmente encontrado em enchidos, com a prevalência da segunda sobre a primeira. Acerca da proporção entre estas duas aminas, existem na literatura diversos exemplos onde são reportados resultados semelhantes, nomeadamente em trabalhos desenvolvidos por Papavergou (2011); Favaro *et al.* (2007) e Roseiro *et al.* (2006).

Identificaram-se diferenças significativas ao longo do processo de cura tanto para o conjunto das aminas vasoativas como para o total de aminas biogénicas. No produto acabado, a modalidade controlo apresentou os paios com os valores médios mais elevados para o conjunto das aminas vasoativas e para o total de aminas biogénicas ($491,62 \pm 296,36$ mg/kg e $1368,76 \pm 388,26$ mg/kg, respetivamente), tendo os valores referidos sido significativos face aos obtidos para os paios alocados à modalidade 5 (*L. sakei* CV3C2 10^3), que apresentaram teores de $203,77 \pm 160,91$ mg/kg e $931,14 \pm 424,62$ mg/kg, respetivamente, para as aminas com propriedades vasoativas e para o teor total de aminas. O valor médio ($246,80 \pm 158,56$ mg/kg) determinado nos paios inoculados com a modalidade 4 (*L. curvatus* L2B2 10^6) no que respeita às aminas vasoativas também foi significativamente inferior ao dos paios controlo.

No produto acabado, as aminas biogénicas que apresentaram os teores mais elevados, por ordem decrescente, foram putrescina, cadaverina e triptamina. Alertamos para o facto de nas inoculações com *Staphylococcus* a triptamina não ter sido detetada e aqui aparecer como sendo das aminas que apresentou teores superiores. Claro (2009) também detetou elevados teores daquela amina em chouriço de Portalegre, IGP, e Laranjo *et al.* (2016) em catalão e salsichão. No estudo levado a cabo pelos últimos autores referidos foi mesmo a amina que apresentou os teores mais elevados. Tasić *et al.* (2012), depois da poliamina natural espermina, chegaram à mesma conclusão em enchidos sérvios não inoculados. Aymerich *et al.* (2006) confirmaram a capacidade de uma estirpe de *L. curvatus* para incrementar os teores triptamina. Vidal-Carou *et al.* (2007) referem que concentrações elevadas de triptamina dependerão da existência de altos teores de tiramina, associados à atividade descarboxilativa de determinadas bactérias lácticas ou ECN. A teoria dos últimos autores não parece aplicar-se no que concerne aos teores elevados de tiramina, pois nas inoculações com culturas puras de *Staphylococcus* não havíamos quantificado triptamina e quantificámos teores superiores para tiramina, por comparação com o presente ensaio. Não dispomos de dados relativos à atividade

descarboxilase da estirpe *L. curvatus* L2B2, mas Alfaia *et al.* (2018) confirmaram que a estirpe *L. sakei* CV3C2 não é produtora de triptamina e é muito baixa produtora de tiramina.

O conjunto das aminas vasoativas, no produto acabado, ultrapassou os 200 mg/kg em todas as modalidades, ou seja, o limite já amplamente referido como seguro. Porém, o valor médio ($203,77 \pm 160,91$ mg/kg) obtido nos paios inoculados com *L. sakei* CV3C2 10^3 células/g (modalidade 5) de massa ficou próximo desse limite. Marcobal *et al.* (2012) referem que elevados teores de aminas vasoativas são relevantes na medida em que, se consumidos em simultâneo com outros produtos igualmente contaminados, poderão conduzir à manifestação de efeitos toxicológicos. Em função do exposto, consideramos recomendável a adoção de medidas que visem minorizar os teores destes compostos nos enchidos, através da seleção e controlo mais rigorosos das matérias-primas e/ou das condições de processamento.

Eerola *et al.* (1998) e Santos (1996) referem que tiramina é a amina biogénica mais tóxica e que valores entre 100-800 mg/kg (produto acabado) poderão ser perigosos. Neste estudo, no produto acabado, todos os valores foram inferiores a 100 mg/kg, com exceção dos paios inoculados com *L. curvatus* L2B2 10^3 células/g de massa ($110,41 \pm 91,05$ mg/kg). Porém, os inoculados com *L. sakei* CV3C2 10^3 células/g de massa promoveram uma redução de aproximadamente 31% desta amina, face aos controlo, e de 22,61% face aos controlo com dextrose.

Como já foi sobejamente referido, muitos autores associaram teores elevados de tiramina às concentrações elevadas de bactérias lácticas (Tabanelli *et al.*, 2013; Ladero *et al.*, 2012; La Gioia *et al.*, 2011). Todavia, essa premissa não se comprovou neste ensaio porque as contagens de bactérias lácticas rondaram os 8 log ufc/g no produto acabado e os teores de tiramina não atingiram 80 mg/kg.

O teor total de aminas biogénicas no produto acabado não atingiu os 1400 mg/kg, no entanto, é um valor acima do considerado como recomendável, isto é, 1000 mg/kg (Tasić *et al.*, 2012). Uma vez mais, a par do que escrevemos para a discussão dos resultados obtidos para paios inoculados com *Staphylococcus*, os teores totais de aminas biogénicas obtidas neste trabalho foram superiores aos de Laranjo *et al.* (2016); Tasić *et al.* (2012); Papavergou *et al.* (2012) e Papavergou *et al.* (2011). Todavia, Gomes (2016), em painho do Alentejo (2709,96 mg/kg), Roseiro *et al.* (2010), em chouriço grosso de Estremoz e Borba, IGP, (1962,1 mg/kg), Claro (2009), em chouriço de carne de Beja (2293,38 mg/kg) e Roseiro *et al.* (2006), em painho de Portalegre (2171,5 mg/kg) obtiveram teores superiores aos determinados no corrente ensaio. Julgamos ser importante destacar que os enchidos analisados pelos autores citados foram todos produzidos no Alentejo, região onde produzimos os paios utilizados neste estudo, denotando uma tendência para os enchidos daquela região apresentarem teores elevados daqueles contaminantes químicos. No entanto, no que respeita aos teores de aminas

vasoativas a tendência não foi a mesma, isto é, Laranjo *et al.* (2017a); Laranjo *et al.* (2016); Gomes (2016) em chouriço de carne de Trás-os-Montes; Bover-Cid *et al.* (2014) e Tasić *et al.* (2012) apresentaram valores médios inferiores aos por nós determinados. Julgamos que o referido será consequência, principalmente, das características das matérias-primas e da forma como decorreu todo o processo produtivo.

De uma forma geral, julgamos poder afirmar que as estirpes tiveram efeito na redução de amins biogénicas nos paios. Tendo-se destacado a estirpe *L. sakei* CV3C2, com a concentração aproximada de 10^3 células/g de massa, visto ter sido a única estirpe a conseguir promover a redução dos teores de todas as amins estudadas, indo ao encontro da atividade descarboxilativa da estirpe em causa, que foi avaliada por Alfaia *et al.* (2018). Porém, parece que o incremento da concentração inoculada (de 10^6 células/g de massa) poderá ter contribuído para a atividade aminogénica.

Na Tabela 46 são apresentadas as percentagens de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo com dextrose e os inoculados.

Tabela 46 - Percentagens de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo com dextrose e os inoculados.

Modalidade	% de Redução									
	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina	Amins vasoativas	Totalde amins
1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	14,42	61,18	NR	3,15	NR	NR	NR	NR	0,33	NR
4	18,41	70,37	NR	2,20	NR	2,16	NR	NR	17,53	8,83
5	33,37	49,92	8,35	8,34	100	22,61	13,49	25,07	31,91	15,30
6	6,18	NR	NR	6,82	=	NR	NR	NR	2,07	NR

1 - Controlo; 2 - Controlo com dextrose; 3 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^3 células/g); 4 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^6 células/g); 5 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^3 células/g); 6 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g). O conjunto das amins vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina.

NR - Não ocorre redução

= - Valor médio igual ao do controlo com dextrose

A análise da Tabela 46 permite concluir que a adição do açúcar fermentescível teve um efeito importante na redução dos teores de amins biogénicas, isto se tivermos em conta os resultados obtidos para os enchidos controlo e controlo com dextrose, indo ao encontro do descrito por González-Fernandez *et al.* (2003) e Bover-Cid *et al.* (2001a).

Os resultados apresentados mostram que as estirpes, de uma forma geral, tiveram um efeito importante na redução da concentração de amins biogénicas dos paios. Efeito mais evidente sobre triptamina, β -feniletilamina e cadaverina, no entanto, a modalidade 5 (*L. sakei* CV3C2 10^3), além das amins aludidas, também promoveu a redução das restantes amins estudadas.

Na redução do teor total de amins biogénicas, apenas as modalidades 4 (*L. curvatus* L2B2 10⁶) e 5 (*L. sakei* CV3C2 10³) conseguiram atingir esse objetivo, destacando-se mais a última. Kongkiattikajorn (2015); Latorre-Moratalla *et al.* (2010b) e Bover-Cid *et al.* (2001a) relatam que as culturas mistas têm maior capacidade para reduzir a produção de amins biogénicas, como havíamos referido na análise e discussão dos resultados referentes às inoculações com culturas puras de *Staphylococcus*. Porém, o género *Lactobacillus*, caso seja inoculado sob a forma de cultura pura, será mais eficaz que inocular apenas, por exemplo, estirpes de *Staphylococcus* (Baka *et al.*, 2011). Também já tínhamos apresentado as possíveis razões para o aludido no ensaio com as culturas puras de *Staphylococcus*, que se prendem basicamente com a capacidade das bactérias lácticas de competirem com a microbiota com potencial aminogénico, substituindo-a. A capacidade competitiva decorre da aptidão para promoverem o abaixamento do pH, da capacidade de produzirem bacteriocinas, do tipo respiratório, da capacidade de se multiplicarem a temperaturas baixas, tolerância ao NaCl e nitrito.

Para as amins vasoativas, mais uma vez, foi a estirpe *L. sakei* CV3C2, na concentração 10³ células/g de massa, a destacar-se com a maior percentagem de redução daquele grupo de amins.

5.2.4. Parâmetros da cor

Na Tabela 47 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Tabela 47 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
L*	F=0,6875 P=0,5042 ^{N.S.}
a*	F=12,8252 P=0,0000***
b*	F=2,8029 P=0,0633 ^{N.S.}
C*	F=8,6155 P=0,0003***
H°	F=0,0486 P=0,9526 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *** Significativo para p<0,001

A análise da Tabela 47 permite concluir que o fator lote foi altamente significativo (p<0,001) para a* e C* e não significativo (p≥0,05) para as restantes coordenadas de cor.

Todos os parâmetros estudados estão sujeitos a inúmeros fatores e os parâmetros da cor são particularmente influenciados pelo pH, pela a_w e pela microbiota, entre outros, como, neste ensaio, até ao momento, o fator lote foi significativo para o pH, a a_w e os parâmetros microbiológicos é natural que as coordenadas de cor também o sejam.

Na Tabela 48 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Tabela 48 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
L*	F=3,1080 P=0,0103*
a*	F=0,9666 P=0,4397 ^{N.S.}
b*	F=0,7056 P=0,6199 ^{N.S.}
C*	F=0,7435 P=0,5918 ^{N.S.}
H°	F=1,1393 P=0,3414 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$

Observando a Tabela 48 conclui-se que o fator modalidade foi significativo ($p < 0,05$) para L* e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis estudadas.

Na Tabela 49 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 49 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros				
		L*	a*	b*	C*	H°
T _{Final} (produto acabado)	1	38,30 ^{ab} ±4,64	16,40±2,38	11,39±2,93	20,11±3,88	33,91±6,77
	2	39,59 ^a ±4,59	16,13±2,80	10,95±3,66	19,63±3,98	33,53±6,75
	3	37,30 ^{ab} ±4,42	15,13±2,57	10,58±3,72	18,57±4,02	34,07±6,15
	4	36,10 ^b ±4,41	16,00±3,11	9,80±3,69	18,86±4,38	30,71±5,93
	5	36,44 ^b ±3,39	15,59±2,89	10,58±3,25	18,95±3,82	33,64±6,46
	6	36,90 ^{ab} ±3,85	16,36±2,58	11,07±3,31	19,87±3,93	33,52±6,53

1 - Controlo; 2 - Controlo com dextrose; 3 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^3 células/g); 4 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^6 células/g); 5 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^3 células/g); 6 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g). Na mesma coluna, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A observação da Tabela 49 permite verificar que existiram diferenças significativas apenas para o parâmetro L*. Os paios alocados às modalidades 4 (*L. curvatus* L2B2 10⁶) e 5 (*L. sakei* CV3C2 10³) foram significativamente mais escuros ($36,10 \pm 14,41$ e $36,44 \pm 3,39$, respetivamente) que os alocados à modalidade 2 (controlo com dextrose) que apresentaram um valor médio de $39,59 \pm 4,59$. Não será de excluir a possibilidade dos enchidos alocados às modalidades referidas apresentarem menor teor de gordura, uma vez que a mesma terá um efeito importante sobre a luminosidade dos enchidos, variando de forma proporcional com a coordenada de cor L*, como referido na discussão relativa às inoculações com culturas puras de *Staphylococcus*.

Pérez-Alvarez *et al.* (1999) obtiveram, em enchidos espanhóis não inoculados, valores médios de L* próximos de 50 e de 40 para o centro da rodela dos enchidos e periferia da mesma, respetivamente. Os autores atribuíram esta diferença ao gradiente de humidade dos enchidos, até porque, teoricamente, a humidade no centro será mais elevada, uma vez que a desidratação será paulatina, mas do exterior para o interior do enchido. Elias (2004) inoculou paios de porco Alentejano com *L. sakei* 27L, na concentração aproximada de 10⁸ células/g de massa, sem açúcar adicionado e desenvolveu dois ensaios independentes, mas com condições de produção idênticas e obteve valores médios para o parâmetro L* de $39,34 \pm 2,15$, num primeiro ensaio, e $35,30 \pm 3,67$, num segundo ensaio. Para os enchidos controlo obteve valores médios de $39,11 \pm 5,44$ no primeiro ensaio e $37,74 \pm 1,55$ no segundo ensaio.

Tendo como referência os resultados obtidos pelos autores citados, concluímos que os paios produzidos neste estudo foram mais escuros que os produzidos por Pérez-Alvarez *et al.* (1999) e semelhantes aos de Elias (2004). Em sùmula as inoculações parecem ter contribuído para tornar os paios ligeiramente mais escuros.

5.2.5. Parâmetros reológicos

Na Tabela 50 pode observar-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Tabela 50 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Dureza (N)	F=10,8446 P=0,0000***
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=0,5077 P=0,6028 ^{N.S.}
Coesividade	F=10,7888 P=0,0000***

Tabela 50 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Elasticidade	F=0,4268 P=0,6532 ^{N.S.}
Resiliência	F=1,0261 P=0,3605 ^{N.S.}
Mastigabilidade (N)	F=3,1427 P=0,0456*

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; *** Significativo para $p < 0,001$

A informação presente na Tabela 50 permite verificar que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para dureza e coesividade, significativo ($p < 0,05$) para mastigabilidade e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

O referido no parágrafo seguiu a tendência verificada para os diferentes parâmetros até aqui analisados e discutidos.

Na Tabela 51 é mostrada a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Tabela 51 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Dureza (N)	F=1,8058 P=0,1141 ^{N.S.}
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=1,2590 P=0,2839 ^{N.S.}
Coesividade	F=2,0054 P=0,0802 ^{N.S.}
Elasticidade	F=2,0555 P=0,0733 ^{N.S.}
Resiliência	F=1,0576 P=0,3857 ^{N.S.}
Mastigabilidade (N)	F=2,1965 P=0,0468*

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo

Analisando a Tabela 51 conclui-se que o fator modalidade foi significativo ($p < 0,05$) para mastigabilidade e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

Na Tabela 52 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 52 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

TFinal (produto acabado)						
Modalidade						
Parâmetros	1	2	3	4	5	6
Dureza (N)	71,356 ±20,796	83,610 ±15,479	69,340 ±14,707	73,757 ±15,206	74,329 ±18,091	73,060 ±31,213
Adesividade (N.s⁻¹)	- 2,120 ±1,943	- 2,621 ±1,988	- 1,750 ±1,459	- 2,159 ±2,039	- 1,625 ±1,031	- 2,053 ±1,579
Coesividade	0,547 ±0,050	0,534 ±0,050	0,562 ±0,062	0,568 ±0,033	0,542 ±0,043	0,552 ±0,049
Elasticidade	0,819 ±0,077	0,825 ±0,098	0,893 ±0,230	0,825 ±0,073	0,809 ±0,077	0,816 ±0,069
Resiliência	0,115 ±0,021	0,107 ±0,017	0,116 ±0,024	0,119 ±0,016	0,116 ±0,022	0,115 ±0,026
Mastigabilidade (N)	33,869 ^{ab} ±11,875	40,316 ^a ±11,735	34,174 ^{ab} ±9,265	34,671 ^{ab} ±9,009	32,684 ^{ab} ±9,677	32,205 ^b ±12,668

1 - Controlo; 2 - Controlo com dextrose; 3 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10³ células/g); 4 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁶ células/g); 5 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10³ células/g); 6 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g). Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

A análise da Tabela 52 permite concluir que apenas existiram diferenças significativas para mastigabilidade. Para aquele parâmetro foram os paios alocados à modalidade 6 (*L. sakei* CV3C2 10⁶) que apresentaram o valor médio (32,205 ± 12,668 N) significativamente inferior aos da modalidade 2 (controlo com dextrose), com o valor médio 40,316 ± 11,735 N. Como a mastigabilidade é o produto da dureza, coesividade e elasticidade, concluímos que estes resultados foram influenciados, principalmente, pelos valores obtidos para a dureza, porque foi onde se obtiveram valores médios com menor proximidade entre modalidades. Concluímos que será necessário consumir menor energia para mastigar os paios alocados à modalidade 6.

Valores de a_w mais baixos são muitas vezes associados a durezas mais elevadas e foi isso que se verificou. Os enchidos alocados à modalidade 2, que tinham apresentado os valores mais reduzidos em relação à a_w, foram os mais duros neste estudo.

Os paios inoculados, de uma forma geral, apresentaram-se ligeiramente mais coesos que os controlo, o que representa uma vantagem em termos sensoriais.

González-Fernández *et al.* (2006) inocularam *L. sakei* K29 e *P. P22*, em concentrações aproximadas de 10⁶ a 10⁷ células/g de massa, e adicionaram diferentes concentrações de açúcares fermentescíveis em chouriços espanhóis. Tendo concluído que percentagens inferiores a 0,5% não produziram efeitos na reologia dos enchidos. Porém, percentagens de 0,5% a 1,0% e culturas de arranque tiveram um

efeito melhorador sobre, principalmente, dureza e mastigabilidade. Levando os autores a afirmarem que a inoculação de *L. sakei* K29 poderá encurtar o processo produtivo deste tipo de enchido, para além do efeito melhorador sobre os atributos sensoriais.

Elias (2004) obteve enchidos não inoculados sempre mais duros que os inoculados e os últimos foram sempre mais coesos. No presente ensaio a segunda premissa ainda se pode verificar, mas a primeira não. O mesmo autor realizou dois ensaios independentes, mas com condições os mais próximas possível, porém, obteve resultados completamente díspares. No primeiro, quantificou resultados para a dureza próximos de 62 N para os paios controlo e próximos de 38 N para os inoculados com *L. sakei* 27 L. No segundo ensaio, valores médios próximos de 18 N e 9 N nos paios inoculados e não inoculados, respetivamente. Os valores dos paios inoculados do primeiro ensaio foram os únicos semelhantes aos por nós obtidos. Diferenças tão pronunciadas entre ensaios onde foram adotadas condições idênticas são reveladoras de particularidades que poderão parecer inicialmente irrelevantes, como o diâmetro da tripa, a matriz cárnea, mistura inadequada das massas, entre outros, mas que têm uma influência significativa aquando da avaliação dos produtos, nomeadamente quando são utilizados equipamentos altamente sensíveis e precisos como os texturómetros.

Alves *et al.* (2016), em enchidos não inoculados produzidos com matérias-primas de porco Alentejano com diâmetros e tempos de cura distintos, obtiveram valores médios para a mastigabilidade que foram de apenas 10,6 N a 15,3 N, e em enchidos com matérias-primas provenientes do cruzamento de porco Ibérico x Duroc, também com diâmetros e tempos de cura distintos, valores que variaram de 29,2 N a 31,6 N, isto é, mais próximos dos obtidos neste estudo. Relembramos que as matérias-primas usadas para a produção dos enchidos deste estudo foram de proco preto, ou seja, mais semelhantes às usadas no cruzamento porco Ibérico x Duroc.

De uma forma geral os parâmetros reológicos não foram muito influenciados pelas culturas de arranque.

5.2.6. Análise sensorial

O terceiro lote dos paios inoculados com *Lactobacillus* estava contaminado com *Salmonella* spp., em função do referido, os enchidos só poderiam ser avaliados pelo painel de provadores ao nível visual e olfativo. Todavia, optámos por não avaliar sensorialmente este lote. Como consequência do descrito, só dispomos dos resultados para dois lotes em vez dos habituais três. Para os dois lotes avaliados pelo painel de provadores foram seguidos os procedimentos indicados no capítulo materiais e métodos deste trabalho.

Na Tabela 53 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Tabela 53 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=1 (só temos resultados para 2 Lotes porque o terceiro estava contaminado com <i>Salmonella</i> spp.)
Intensidade da cor	F=0,0257 P=0,8729 ^{N.S.}
Cores estranhas	F=0,5881 P=0,4443 ^{N.S.}
Marmoreado	F=8,5380 P=0,0040 ^{**}
Intensidade do aroma	F=9,2957 P=0,0027 ^{**}
Aromas estranhos	F=5,4794 P=0,0205 [*]
Dureza	F=0,8010 P=0,3722 ^{N.S.}
Fibrosidade	F=0,1258 P=0,7233 ^{N.S.}
Suculência	F=2,6988 P=0,1024 ^{N.S.}
Intensidade do sabor	F=0,5369 P=0,4669 ^{N.S.}
Sabores negativos	F=2,4325 P=0,1209 ^{N.S.}
Intensidade da salga	F=1,1336 P=0,2886 ^{N.S.}
Apreciação global	F=0,1115 P=0,7388 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$

Tendo em conta o indicado na Tabela 53 conclui-se que o fator lote foi muito significativo ($p < 0,01$) para marmoreado e intensidade do aroma, significativo ($p < 0,05$) para aromas estranhos e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis. As características sensoriais dos enchidos resultam da interação entre todos os parâmetros estudados neste trabalho, e de outros que não avaliamos, como a proteólise, lipólise, entre outros, como tal, será natural ocorrerem variações entre lotes independentes.

Na Tabela 54 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Tabela 54 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator	
	Modalidade	
	G.L.=5	
Intensidade da cor	F=0,4928 P=0,7813 ^{N.S.}	
Cores estranhas	F=1,1957 P=0,3139 ^{N.S.}	
Marmoreado	F=0,7451 P=0,5909 ^{N.S.}	
Intensidade do aroma	F=2,0984 P=0,0686 ^{N.S.}	
Aromas estranhos	F=0,5662 P=0,7258 ^{N.S.}	
Dureza	F=3,0299 P=0,0123*	
Fibrosidade	F=0,5380 P=0,7472 ^{N.S.}	
Suculência	F=0,2896 P=0,9182 ^{N.S.}	
Intensidade do sabor	F=0,6270 P=0,6794 ^{N.S.}	
Sabores negativos	F=0,3573 P=0,8769 ^{N.S.}	
Intensidade da salga	F=0,5041 P=0,7728 ^{N.S.}	
Apreciação global	F=0,3819 P=0,8606 ^{N.S.}	

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$;

Analisando a Tabela 54 verifica-se que o fator modalidade foi significativo ($p < 0,05$) para a dureza e não significativo ($p \geq 0,05$) para as outras variáveis estudadas.

Na Tabela 55 são apresentados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 55 - Valores médios e desvios padrão para os resultados dos parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)					
	Modalidade					
	1	2	3	4	5	6
Intensidade da cor	68,94±13,58	69,12±12,05	70,88±12,63	68,27±14,41	70,85±13,12	73,19±13,10
Cores estranhas	0,62±2,07	0,08 ± 0,39	3,81±17,31	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Marmoreado	62,15±18,19	60,35 ±27,23	57,31±22,14	64,88±16,42	54,96±18,37	57,62±24,75
Intensidade do aroma	71,29±14,57	70,35±12,62	69,73±11,54	66,73±17,53	60,50±22,70	72,88±12,49
Aromas estranhos	3,27±9,72	2,80±5,84	4,00±9,17	3,00±5,29	1,08±4,02	2,22±3,78

Tabela 55 (continuação) - Valores médios e desvios padrão para os resultados dos parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com *Lactobacillus*.

TFinal (produto acabado)						
Modalidade						
Parâmetros	1	2	3	4	5	6
Dureza	55,51 ^{ab} ±8,89	51,23 ^{ab} ±12,86	49,23 ^b ±7,27	52,73 ^{ab} ±7,12	51,27 ^{ab} ±13,54	58,42 ^a ±7,22
Fibrosidade	34,84±26,23	32,73±26,03	29,23±24,70	35,35±27,80	30,92±25,03	38,81±26,09
Suculência	62,88±17,26	61,27±21,88	66,42±18,61	63,62±17,39	61,04± 8,19	62,08±19,31
Intensidade do sabor	65,52±23,44	73,27±12,80	66,15±22,13	71,73±13,26	70,77±11,49	71,69±13,09
Sabores negativos	6,18±17,16	4,85±11,71	4,15±6,82	6,00±11,58	2,77±8,19	3,92±8,13
Intensidade da salga	57,75±7,78	60,92±11,86	57,27±9,99	58,62±11,80	57,38±8,52	59,23±9,80
Apreciação global	64,01±14,26	63,46±17,37	67,42±12,74	61,92±20,87	66,15±13,32	63,81±18,33

1 - Controlo; 2 - Controlo com dextrose; 3 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^3 células/g); 4 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^6 células/g); 5 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^3 células/g); 6 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g). Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A observação da Tabela 55 permite inferir que o único parâmetro que apresentou diferenças significativas foi a dureza, como havíamos verificado na análise de variância. Os paios mais duros foram os alocados à modalidade 6 (*L. sakei* CV3C2 10^6) e os menos duros à modalidade 3 (*L. curvatus* L2B2 10^3), com valores médios de $58,42 \pm 7,22$ e $49,23 \pm 7,27$, respetivamente, havendo diferenças significativas entre as modalidades referidas. Mais uma vez, referimos que o consumidor aprecia enchidos com uma dureza mínima, depreciando os produtos demasiado moles ou mal curados, não nos parece ser o caso, visto o valor ótimo para o parâmetro em causa ser 50, como indicado no capítulo materiais e métodos, e neste ensaio todos os valores se aproximaram daquele valor. Também se conclui que na medição instrumental da dureza os paios alocados à modalidade 3 foram os que apresentaram o valor médio mais reduzido, revelando uma aproximação entre os valores medidos mecanicamente (texturómetro) e os atribuídos pelo painel de provadores.

É de ressaltar que os paios inoculados, de uma forma geral, apresentaram intensidades de cor superiores, destacando-se os inoculados com *L. sakei* CV3C2 10^6 células g/massa. Os paios controlo e controlo com dextrose apresentaram cores estranhas e entre os inoculados apenas os alocados à modalidade 3 fizeram parte daquele grupo. Também foram os paios alocados à modalidade 6 que se destacaram ligeiramente no que respeita à intensidade do aroma. Para os aromas estranhos e sabores negativos, entre os inoculados, foram os alocados à estirpe *L. curvatus* L2B2, independentemente da concentração, que apresentaram valores médios ligeiramente superiores. Em termos de apreciação global, o valor médio mais baixo coube aos paios alocados a *L. curvatus*

L2B2 10⁶. Porém, como já tinha sido referido não existiram diferenças significativas entre modalidades.

Como já havíamos referido para as inoculações com as estirpes de *Staphylococcus*, Patarata (2002), na análise sensorial de linguiça tradicional transmontana, verificou que a maioria dos atributos avaliados não foram potenciados nem depreciados pela utilização de culturas de arranque. Rubio *et al.* (2013) verificaram exatamente o mesmo em enchidos espanhóis e inoculados com estirpes de *Lactobacillus*. Ruiz-Moyano *et al.* (2011), em enchidos espanhóis inoculados com *Lactobacillus* e *Pediococcus*, verificaram que o painel de provadores preferiu os enchidos controlo, mas não existiram diferenças entre as amostras ao nível estatístico.

O facto das estirpes não depreciarem produtos com características tão vincadas como são as dos paios de porco preto será um fator positivo, ainda mais porque o painel é especializado na avaliação deste tipo de produto.

5.2.7. Principais conclusões do ensaio

As inoculações não tiveram um efeito muito pronunciado sobre o pH e a a_w dos enchidos inoculados, mas será de referir que no T0 (pré-enchimento) as estirpes, de uma forma geral, promoveram uma redução significativa do pH, contribuindo, entre outros fatores, para a segurança sanitária dos enchidos.

Os enchidos alocados à formulação controlo com dextrose apresentaram valores médios de pH sempre inferiores aos controlo, todavia, essa diferença foi mais evidente no T10 (fase intermédia da cura). A tendência dos valores serem mais reduzidos nos enchidos controlo aos quais foi adicionada dextrose também se verificou para a a_w , com exceção do T10.

Os resultados para os parâmetros microbiológicos, de uma forma geral, não mostram uma ação muito evidente das estirpes sobre a microbiota dos paios. Porém, no produto acabado apenas os paios alocados à modalidade controlo e a *L. curvatus* L2B2, 10³ células/g de massa, mantiveram amostras positivas de *Salmonella* spp., neste caso uma em seis analisadas para ambas as modalidades. Entre os paios inoculados, os únicos que apresentaram valores inferiores ao limite de deteção do método para as contagens de bolores foram os inoculados com a estirpe *L. sakei* CV3C2, independentemente da concentração inoculada. *L. monocytogenes* também apresentou contagens reduzidas nos enchidos inoculados com a estirpe *L. sakei* CV3C2, nas duas concentrações de inoculação (10³ e 10⁶ células/g de massa).

A conclusão imediata a que chegamos é que a adição do açúcar fermentescível teve efeito na redução dos teores de aminas, quando comparadas as duas modalidades controlo.

No produto acabado, para os teores totais de aminas biogénicas e para o conjunto das aminas com propriedades vasoativas foi a estirpe *L. sakei* CV3C2, na concentração 10^3 células/g de massa, que apresentou as percentagens de redução mais elevadas, 15,30% e 31,91%, respetivamente. Os paios alocados à estirpe e concentração referidas, também no produto acabado, apresentaram teores que foram significativamente inferiores aos obtidos para os paios controlo sem dextrose, mas esse efeito, ao nível estatístico, não se manteve para os paios controlo com dextrose adicionada.

De uma forma geral, as estirpes não tiveram um efeito substancial sobre os parâmetros da cor, porém, parecem ter contribuído para os tornar os paios mais escuros (L^* menor) o que poderá contribuir para a aceitação dos mesmos em termos sensoriais. Não havendo, no entanto, nenhuma estirpe a destacar.

Para os parâmetros sensoriais a estirpe que se aproximou mais dos objetivos traçados para este estudo foi *L. sakei* CV3C2. No que concerne à concentração, relativamente à apreciação global, foram os paios associados a 10^3 células/g de massa que obtiveram um valor ligeiramente superior, mas houve um conjunto de parâmetros importantes como intensidade da cor, intensidade do aroma e do sabor onde a concentração 10^6 células/g de massa apresentou supremacia.

Devido à presença de *Salmonella* spp. nos paios prontos a consumir e inoculados com a estirpe *L. curvatus* L2B2, na concentração 10^3 células/g de massa, por precaução, excluímos aquela estirpe das inoculações com culturas mistas. Em função do referido, apesar de ao nível sensorial o impacto das inoculações ser moderado, parece-nos que as mesmas contribuíram para melhorar a higiene e segurança dos enchidos, principalmente a estirpe *L. sakei* CV3C2, com a concentração 10^6 células/g de massa, devido às contagens obtidas para bolores e *L. monocytogenes*, como tal, seleccionámos a estirpe *L. sakei* CV3C2, na concentração 10^6 células/g de massa, como sendo a que mostrou maior aptidão para fazer parte integrante da cultura mista a inocular nos paios de porco preto, do Alentejo.

5.3. Ensaio de inoculação em paio de porco preto, do Alentejo, com culturas mistas

5.3.1. Inoculação com culturas mistas na concentração 10^6 células por grama de massa

Tendo como base os resultados obtidos quando foram inoculadas culturas puras (5.1. e 5.2.), isto é, os dois ensaios anteriormente apresentados, analisados e discutidos, conclui-se que os mesmos, de uma forma geral, mostraram que as estirpes *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2 foram aquelas que mostraram ter um efeito melhorador sobre as características dos paio. Para além disso, a concentração aproximada de 10^6 células por grama de massa também foi a escolhida exatamente pelas mesmas razões.

5.3.1.1 Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)

Na Tabela 56 apresenta-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Tabela 56 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
pH	F=26,4660 P=0,0000***
a_w	F=0,5918 P=0,5537 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ***significativo para $p < 0,001$

Tendo em conta o descrito na Tabela 56 conclui-se que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para o pH e não significativo ($p \geq 0,05$) para a a_w .

O facto dos lotes terem sido produzidos de forma independente ao longo do tempo, acarreta variações associadas a todo o processo produtivo, posto isto, os resultados obtidos para a análise de variância não evidenciam algo totalmente inesperado.

Na Tabela 57 mostra-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 57 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=2	G.L.=8
pH	F=3,0802 P=0,0161*	F=130,5551 P=0,0000***	F=3,8498 P=0,0002***
a_w	F=15,8362 P=0,0000***	F=3085,4594 P=0,0000***	F=6,6067 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: * Significativo para $p < 0,05$; *** Significativo para $p < 0,001$

Observando a Tabela 57 conclui-se que os fatores foram altamente significativos ($p < 0,001$) para as variáveis estudadas, com exceção do fator modalidade que apenas foi significativo ($p < 0,05$) para o pH. A interação entre os fatores foi altamente significativa para as duas variáveis.

Na Tabela 58 são apresentados os valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 58 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros	
		pH	a_w
T0	1	5,48 ^{A,ab} ±0,25	0,967 ^{A,a} ±0,008
	2	5,46 ^{A,ab} ±0,28	0,962 ^{A,bc} ±0,006
	3	5,48 ^{A,a} ±0,31	0,960 ^{A,b} ±0,008
	4	5,29 ^{A,b} ±0,51	0,960 ^{A,b} ±0,007
	5	5,42 ^{A,ab} ±0,32	0,963 ^{A,ab} ±0,002
T10	1	5,05 ^{B,c} ±0,08	0,948 ^{B,a} ±0,007
	2	5,20 ^{B,a} ±0,09	0,937 ^{B,bc} ±0,009
	3	5,13 ^{B,b} ±0,09	0,941 ^{B,b} ±0,004
	4	5,06 ^{B,c} ±0,09	0,941 ^{B,b} ±0,004
	5	5,19 ^{B,a} ±0,09	0,934 ^{B,c} ±0,004
TFinal	1	4,97 ^{B,bc} ±0,14	0,845 ^{C,a} ±0,024
	2	5,05 ^{B,ab} ±0,14	0,826 ^{C,b} ±0,031
	3	4,94 ^{B,c} ±0,07	0,852 ^{C,a} ±0,002
	4	5,10 ^{AB,a} ±0,01	0,823 ^{C,b} ±0,030
	5	5,10 ^{B,a} ±0,10	0,824 ^{C,b} ±0,014

T0 (pré-enchimento); **T10** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g); **3** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g); **4** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g); **5** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A leitura da Tabela 58 permite concluir que para o pH se observaram diferenças significativas entre o T0 (pré-enchimento) e os tempos de amostragem que lhe sucederam, cabendo os valores médios mais reduzidos a estes últimos. No que concerne a uma avaliação por tempo de amostragem, no T0 os paios alocados à modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶) apresentaram um valor médio (5,29 ± 0,51) significativamente mais reduzido que os da modalidade 3 (*L. sakei* CV3C2 10⁶), com 5,48 ± 0,31. O facto das estirpes não conseguirem promover um abaixamento significativo, por comparação com a formulação controlo, revela a capacidade acidificante da microbiota láctica naturalmente presente nas massas (às quais também foi disponibilizada dextrose), tal facto é corroborado pelos resultados referentes às contagens de bactérias lácticas que estão apresentados na Tabela 61 relativa aos resultados obtidos para os parâmetros microbiológicos. Sendo a dextrose/glicose/glucose a principal fonte de energia das bactérias lácticas, por ser um monossacárido, a dextrose pode ser de imediato metabolizada por todas as bactérias lácticas presentes nas massas - indígenas e inoculadas -, reservando-se o uso de dissacáridos para processos mais lentos e com acidificações menos extensas. Na fase intermédia da cura (T10), como era de esperar, ocorreu uma redução dos valores médios do pH. Em discussões supracitadas já apresentámos as nossas justificações e as de outros autores para a referida redução. No produto acabado foi aos enchidos inoculados com *L. sakei* CV3C2 10⁶ (modalidade 3) que coube o valor médio mais reduzido (4,94 ± 0,07), todavia, foram os únicos paios inoculados a apresentarem um valor inferior aos paios controlo (4,97 ± 0,14).

Relativamente a resultados obtidos por outros autores, Simion *et al.* (2014), em enchidos tradicionais Romenos (Dacia), inoculados com uma cultura mista composta por *L. sakei* CECT5764 e *S. equorum* SA25, na concentração aproximada de 10⁷ células/g de massa para cada estirpe microbiana e com a adição de 0,18% de açúcar fermentescível, no T0 (pré-enchimento), determinaram valores médios de 6,09 ± 0,17 para as massas controlo e 6,03 ± 0,20 para as inoculadas. Na fase intermédia da cura os valores médios reduziram-se para 5,33 ± 0,19 e 5,11 ± 0,16 para os enchidos não inoculados e inoculados, respetivamente. Por fim, no produto acabado determinaram valores médios de 5,26 ± 0,31 para os enchidos controlo e 5,13 ± 0,15 para os enchidos inoculados.

Outros autores como Casaburi *et al.* (2007) obtiveram em enchidos italianos (Vallo di Diano), no T0 (pré-enchimento) valores médios de 6,30 para as massas controlo, 6,12 para uma cultura mista composta por *L. curvatus* AVL3 e *S. xylosus* CVS11, e 6,30 para outra cultura mista composta por *L. curvatus* AVL3 e *S. xylosus* FV2S1. Na fase intermédia da cura, os valores médios reduziram-se para 5,80, 5,01 e 5,04 para as modalidades anteriormente referidas, respetivamente. No produto acabado subiram para 6,18, 5,42 e 5,59 para as modalidades anteriormente mencionadas, respetivamente. As

concentrações inoculadas pelos autores foram de aproximadamente 10^7 células/g de massa para cada estirpe microbiana e foram adicionados 0,2% de glucose às massas.

Os resultados apresentados neste parágrafo são referentes apenas ao produto acabado. Elias *et al.* (2014) obtiveram, em paio de porco Alentejano, valores médios de $5,23 \pm 0,05$ para os paios alocados à formulação controlo, $5,25 \pm 0,10$, em paios inoculados com uma cultura comercial (TEXEL® ELSE BR) composta por *Lactobacillus* spp., *Micrococcaceae* e leveduras e $5,26 \pm 0,08$ em paios inoculados com uma cultura experimental composta por *L. sakei* e *S. xylosus*, as estirpes inoculadas nas duas modalidades mencionadas apresentavam a concentração aproximada de 10^5 células/g de massa e não foram adicionados açúcares.

Os resultados obtidos no corrente ensaio, em todos os tempos de amostragem, foram inferiores aos obtidos pelos autores citados nos três parágrafos anteriores, o que, como já foi sobejamente referido, poderá contribuir para a segurança sanitária dos enchidos, começando logo no T0 (pré-enchimento), onde este efeito pode dificultar a multiplicação de alguns microrganismos patogénicos. Julgamos que a razão para os valores médios serem inferiores, se prenderá com o facto dos autores citados terem adicionado concentrações de açúcar fermentescível inferiores à por nós usada, ou não terem adicionado açúcares fermentescíveis, ou a microbiota naturalmente presente nas matérias-primas usadas e as estirpes inoculadas terem maior capacidade para metabolizar os nutrientes disponíveis, resultando na formação de ácido láctico.

Quanto aos valores da a_w , observaram-se diferenças significativas entre tempos de amostragem, cabendo os valores médios significativamente mais reduzidos ao produto acabado. No que concerne a uma avaliação por tempo de amostragem, verificamos que no T0, de uma forma geral, os enchidos inoculados apresentaram valores médios inferiores para o parâmetro em análise. Na fase intermédia da cura (T10) houve diferenças significativas entre os paios controlo ($0,948 \pm 0,007$) e os paios inoculados, cabendo aos últimos valores médios significativamente inferiores, destacando-se os inoculados com a modalidade 5 (*Staphylococcus equorum* S2M7 10^6 , *Lactobacillus sakei* CV3C2 e levedura 2RB4), que apresentaram um valor médio de $0,934 \pm 0,04$. No produto acabado foram os paios alocados às modalidades 2 ($0,826 \pm 0,031$), 4 ($0,823 \pm 0,030$) e 5 ($0,824 \pm 0,014$) que apresentaram valores médios estatisticamente inferiores aos das modalidades 1 ($0,845 \pm 0,024$) e 3 ($0,852 \pm 0,002$). As estirpes, de uma forma geral, mostraram ter um efeito positivo na redução da a_w dos paios. Podendo afirmar-se que tiveram capacidade para acelerar o processo produtivo. De acordo com Hierro *et al.* (2015) os resultados obtidos permitem conservar os enchidos à temperatura ambiente, tanto pelo efeito da a_w como do pH.

Para a a_w , no produto acabado, autores como Simion *et al.* (2014) e Casaburi *et al.* (2007) obtiveram resultados semelhantes aos por nós obtidos e os de Elias *et al.* (2014) foram um pouco superiores (0,88), revelando um grau de cura superior nos nossos enchidos, por comparação com os de Elias *et al.* 2014.

5.3.1.2. Parâmetros microbiológicos

Na Tabela 59 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Tabela 59 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Mesófilos	F=1,9688 P=0,1459 ^{N.S.}
Psicrotróficos	F=0,2060 P=0,8143 ^{N.S.}
Bactérias láticas	F=3,6544 P=0,0300*
<i>Staphylococcus spp.</i>	F=0,3089 P=0,7351 ^{N.S.}
Enterobactérias	F=0,2437 P=0,7843 ^{N.S.}
Bolores	F=0,0985 P=0,9063 ^{N.S.}
Leveduras	F=0,6028 P=0,5496 ^{N.S.}
<i>L. monocytogenes</i>	F=0,3253 P=0,7232 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *significativo para $p < 0,05$

Relativamente aos resultados indicados na Tabela 59 verifica-se que o fator lote foi significativo ($p < 0,05$) para as contagens de bactérias láticas e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis. Ao contrário dos parâmetros físico-químicos, o fator lote teve menor influência sobre os parâmetros microbiológicos, revelando maior padronização da microbiota dos enchidos.

Na Tabela 60 é mostrada a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 60 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade G.L.=4	Tempo de amostragem G.L.=2	Modalidade x Tempo de amostragem G.L.=8
Mesófilos	F=1,4947 P=0,2127 ^{N.S.}	F=8,4658 P=0,0005***	F=1,1806 P=0,3225 ^{N.S.}
Psicrotróficos	F=1,5382 P=0,2001 ^{N.S.}	F=10,4738 P=0,0001***	F=0,5971 P=0,7772 ^{N.S.}
Bactérias lácticas	F=1,4972 P=0,2119 ^{N.S.}	F=40,5454 P=0,0000***	F=0,4135 P=0,9093 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus</i> spp.	F=2,3778 P=0,0596 ^{N.S.}	F=2,8100 P=0,0667 ^{N.S.}	F=1,7117 P=0,1100 ^{N.S.}
Enterobactérias	F=1,0399 P=0,3926 ^{N.S.}	F=232,6414 P=0,0000***	F=1,5455 P=0,1566 ^{N.S.}
Bolores	F=2,1150 P=0,0875 ^{N.S.}	F=0,0715 P=0,9310 ^{N.S.}	F=0,7597 P=0,6390 ^{N.S.}
Leveduras	F=4,6461 P=0,0021**	F=5,4193 P=0,0064**	F=1,7135 P=0,1096 ^{N.S.}
<i>L. monocytogenes</i>	F=0,4161 P=0,7965 ^{N.S.}	F=0,8221 P=0,4435 ^{N.S.}	F=1,0942 P=0,3772 ^{N.S.}

G.L. – Grau de Liberdade

Níveis de significância: N.S.= Não Significativo; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

Observando a Tabela 60 conclui-se que o fator modalidade só apresentou diferenças muito significativas ($p < 0,01$) para as contagens de leveduras. Entre tempos de amostragem, apenas as contagens de *Staphylococcus* spp., bolores e *L. monocytogenes* não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$). Para microrganismos mesófilos, psicrotróficos, bactérias lácticas e enterobactérias aquele fator foi altamente significativo ($p < 0,001$) e para contagem de leveduras muito significativo ($p < 0,01$). A interação modalidade x tempo de amostragem não foi significativa ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas.

Mais uma vez se verifica que o fator modalidade foi não significativo para a maioria dos parâmetros estudados. Provavelmente porque a microbiota naturalmente presente nas massas e no ambiente fabril está bem adaptada às condições em que decorreu a cura.

Na Tabela 61 são apresentados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paos de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 61 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Parâmetros										
Tempo de amostra	Modalidade	Mesófilos	Psicrotróficos	Bactérias lácticas	<i>Staphylococcus</i> spp.	Enterobactérias	Bolores	Leveduras	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
T0	1	7,00 ^B ±0,77	6,60 ±1,17	6,64 ^B ±0,57	9,14 ±0,66	5,99 ^A ±0,49	0,17 ±0,41	3,88 ±0,48	8,33 ±12,11	6
	2	7,23 ^B ±0,96	6,81 ^A ±0,99	6,58 ^B ±0,39	8,97 ±1,42	6,55 ^A ±1,16	0,50 ±0,84	3,78 ^B ±0,23	5,00 ±6,32	5
	3	7,16 ±0,70	6,74 ±0,75	6,32 ^B ±0,27	7,57 ±1,48	6,73 ^A ±0,67	< 1	3,90 ±0,90	6,67 ±7,53	1
	4	7,72 ±1,20	7,32 ±1,50	6,80 ^B ±0,60	10,88 ±3,96	7,02 ^A ±1,34	< 1	5,73 ±2,44	7,00 ±8,37	5
	5	7,35 ±0,76	7,18 ±1,09	7,01 ^B ±0,26	8,40 ±1,74	6,54 ^A ±0,42	< 1	4,04 ±0,37	15,83 ±17,25	3
T10	1	8,46 ^A ±0,67	7,01 ±1,22	7,95 ^A ±0,30	10,17 ±1,77	6,35 ^A ±1,13	0,67 ±1,21	4,33 ±1,09	1,67 ±4,08	6
	2	7,70 ^A ±0,65	6,50 ^{AB} ±0,37	7,59 ^A ±0,28	9,26 ±0,98	5,54 ^A ±0,24	0,25 ±0,60	3,15 ^C ±0,18	3,33 ±4,08	6
	3	7,77 ±0,29	6,51 ±0,58	7,70 ^A ±0,45	9,14 ±0,79	5,63 ^A ±0,40	< 1	3,82 ±0,85	15,00 ±27,20	2
	4	8,61 ±0,82	7,45 ±1,29	7,93 ^{AB} ±0,14	10,47 ±1,47	6,45 ^A ±1,04	< 1	4,56 ±0,69	9,17 ±5,85	4
	5	8,12 ±1,07	7,01 ±1,22	8,18 ^{AB} ±1,11	9,66 ±1,10	6,62 ^A ±1,30	< 1	4,47 ±0,77	4,17 ±3,76	3
TFinal	1	7,38 ^B ±0,60	5,66 ±0,29	8,06 ^A ±0,77	8,68 ±1,03	2,75 ^B ±0,36	0,58 ±1,20	4,61 ±0,35	5,83 ±12,01	ND
	2	7,65 ^{AB} ±0,54	5,69 ^B ±0,26	7,96 ^A ±0,67	8,34 ±0,49	2,69 ^B ±0,50	< 1	4,70 ^A ±0,47	7,50 ±11,72	1
	3	8,39 ±0,97	6,20 ±0,18	8,49 ^A ±1,15	8,49 ±0,71	2,24 ^B ±0,39	0,33 ±0,82	4,85 ±0,42	1,67 ±2,58	ND
	4	8,03 ±1,06	5,89 ±0,44	8,15 ^A ±1,09	8,38 ±2,14	2,48 ^B ±0,40	< 1	4,96 ±0,74	0,83 ±2,24	1
	5	8,48 ±1,19	6,48 ±0,52	8,56 ^A ±1,10	10,31 ±1,29	2,51 ^B ±0,55	< 1	4,74 ±0,69	7,50 ±13,69	ND

T0 (pré-enchimento); **T10** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g); **3** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g); **4** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g); **5** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g).

Listeria monocytogenes apresenta-se em ufc/g. Os restantes parâmetros contáveis apresentam-se em log ufc/g. Os valores indicados para *Salmonella* spp. referem-se ao número de resultados positivos em 6 amostras.

<1 - Contagens inferiores a uma unidade formadora de colónia por grama (ufc/g).

ND - Não detetado (ausência em 25g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

Para as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos não se verificaram diferenças entre modalidades no mesmo tempo de amostragem e mesmo entre tempos de amostragem foram pouco

pronunciadas, isto é, apenas entre os paios associados às modalidades 1 (controlo com dextrose) e 2 (*Staphylococcus equorum* S2M7 10⁶).

No TFinal (produto acabado) parece existir uma tendência, não significativa, para os paios inoculados apresentarem uma concentração superior dos grupos microbianos referidos. Como ocorre frequentemente em enchidos, as contagens de microrganismos psicrótróficos foram inferiores às dos microrganismos mesófilos.

Para as contagens de bactérias lácticas observaram-se diferenças significativas no desenrolar da cura; havendo uma tendência para o incremento da concentração destas bactérias em todas as modalidades. Porém, quando efetuamos uma análise por tempo de amostragem verificamos que não existiram diferenças significativas entre modalidades em nenhum dos ditos tempos, não obstante terem sido os paios alocados às modalidades 3 (*L. sakei* CV3C2 10⁶) e 5 (*S. xylosum* CV3C2 10⁶, *L. sakei* CV3C2 10⁶ e levedura 2RB4 10⁶) que apresentaram valores médios superiores (8,49 ± 1,15 log ufc/g e 8,56 ± 1,10 log ufc/g, respetivamente) no produto acabado.

Outros autores, como Simion *et al.* (2014), em enchidos romenos inoculados com *L. sakei* CECT5764, *S. equorum* SA25 e *L. acidophilus* CECT903, em diferentes composições, nas concentrações 10⁷ células/g de massa para as duas primeiras estirpes e 10⁸ células/g de massa para a terceira estirpe referida, com 0,18% de açúcar adicionado, contaram valores médios de 6,32 ± 0,57 log ufc/g, 9,60 ± 0,50 log ufc/g e 10,17 ± 0,63 log ufc/g no pré-enchimento, para os paios controlo, inoculados com *L. sakei* CECT5764 e *S. equorum* SA25 e inoculados com *L. sakei* CECT5764, *S. equorum* SA25 e *L. acidophilus* CECT 903, respetivamente. Na fase intermédia da cura, quer para os paios inoculados quer para os controlo, os mesmos autores, observaram valores superiores aos obtidos no pré-enchimento. No produto acabado os valores reduziram-se ligeiramente, por comparação com a fase que lhe antecedeu, para 9,77 ± 1,59 log ufc/g, 11,47 ± 0,80 log ufc/g e 11,19 ± 0,22 log ufc/g para os paios controlo e inoculados com as modalidades referidas, respetivamente.

Bañón *et al.* (2014), em salame espanhol inoculado com *S. carnosus*, *K. varians*, *P. pentosaceus* e *L. sakei*, na concentração aproximada de 6 x 10⁷ células/g de massa e com 2% de açúcares adicionados, obtiveram valores médios de 3,53 ± 0,83 log ufc/g e 5,55 ± 0,37 log ufc/g imediatamente antes do enchimento para os enchidos controlo e inoculados, respetivamente. No produto acabado os mesmos sofreram um incremento e foram de 8,28 ± 0,29 log ufc/g e 8,61 ± 0,65 log ufc/g para os enchidos controlo e inoculados, respetivamente.

Talon *et al.* (2008), em enchidos inoculados com *L. sakei* F08F202, *S. equorum* F08Bf15 e *S. succinus* F08Bf19, com uma concentração aproximada de 10⁶ células/g de massa, obtiveram valores médios de 4,1 log ufc/g e 6,3 log ufc/g após a mistura das massas, para os enchidos controlo e inoculados,

respetivamente. Aqueles autores observaram um aumento paulatino da concentração no decorrer da cura, que culminou com valores de 6,6 log ufc/g e 8,8 log ufc/g para os enchidos controlo e inoculados respetivamente. Isto significa que os valores obtidos no produto acabado por Bañón *et al.* (2014) e Talon *et al.* (2008) foram semelhantes aos por nós determinados e que os de Simion *et al.* (2014) foram aproximadamente superiores em 3 unidades na escala logarítmica. Apesar de não termos apresentado os resultados determinados por Casaburi *et al.* (2007), em enchidos italianos (Vallo di Diano), inoculados com culturas mistas na concentração aproximada 10^7 células/g de massa e com 0,2% de glucose adicionada às massas, aqueles autores também obtiveram resultados semelhantes aos por nós determinados, tanto para os enchidos controlo como para os inoculados. No produto acabado, dos autores citados, apenas Talon *et al.* (2008) observaram diferenças significativas entre os enchidos controlo e os enchidos inoculados, com supremacia dos segundos face aos primeiros.

O grupo microbiano em análise, a par de outros estudos já mencionados, foi dos que apresentou concentrações mais elevadas ao longo de todo o processo produtivo. Porém, neste caso, *Staphylococcus* spp., de uma forma geral, apresentaram concentrações sempre ligeiramente mais elevadas que bactérias lácticas. Já na discussão relativa aos paios inoculados com culturas puras de *Staphylococcus* tínhamos verificado que as concentrações tinham sido bastante semelhantes, todavia, neste ensaio foram mais evidentes as elevadas concentrações de *Staphylococcus* spp., tal como verificado por Armengol *et al.* (1994) e Sarra *et al.* (1982). Os autores justificaram esta supremacia de *Staphylococcus* spp. devido à disponibilidade de nitratos e poucos hidratos de carbono - o que não se terá passado no presente ensaio -, pois, desse modo, *Staphylococcus* spp. já não estarão tão suscetíveis ao abaixamento do pH causado pelas bactérias lácticas. Porém, tal como referem Becker *et al.* (2014); Vanderhaeghen *et al.* (2014) e Coton *et al.* (2010) o facto de algumas espécies de ECN, tais com *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, entre outras, estarem associadas à pele dos humanos e animais poderá, eventualmente, ter contribuído para as concentrações determinadas neste ensaio e ainda o sal adicionado às massas (Cordero & Zumalacarregui, 2002).

Não se observaram diferenças entre tempos de amostragem e modalidades para as contagens de *Staphylococcus* spp. Curiosamente, os paios inoculados com a modalidade 5 (*S. xylosus* CV3C2 10^6 , *L. sakei* CV3C2 10^6 e levedura 2RB4 10^6) foram os que apresentaram contagens mais elevadas ($10,31 \pm 1,29$ log ufc/g), parecendo que a presença da levedura 2RB4 facilitou multiplicação de *Staphylococcus* spp. Selgas & García (2015) referem que as leveduras são inoculadas em enchidos, entre muitos outros fatores, pela sua capacidade para a degradar do ácido láctico, caso essa degradação tivesse ocorrido os *Staphylococcus* spp. teriam mais facilidade em se multiplicar, pela sua maior sensibilidade aos ambientes ácidos. Se tivermos em conta os resultados obtidos no produto acabado para o pH,

apresentados na Tabela 58, verificamos que os paios que apresentaram os valores médios mais elevados (5,10) no produto acabado foram os associados às modalidades 5 e 4 (*S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶), mas na fase intermédia da cura (T10) os valores de pH dos paios alocados à modalidade 5 foram dos mais elevados (5,19), podendo haver uma relação com o referido por Selgas & García (2015).

As contagens obtidas para *Staphylococcus* spp. no presente estudo foram próximas de 9 log ufc/g no T0, próximas de 9,5 log ufc/g no T10 e próximas de 8,5 log ufc/g no produto acabado, com exceção da modalidade que continha a levedura 2RB4 que apresentou uma concentração final de 10,31 ± 1,29 log ufc/g. Simion *et al.* (2014) e Talon *et al.* (2008) obtiveram contagens de ECN inferiores às obtidas no corrente estudo, independentemente do tempo de amostragem, no caso dos primeiros autores citados, e no produto acabado, para Talon *et al.* (2008), porque aqueles autores apenas apresentaram resultados para aquele momento da cura. Bañón *et al.* (2014); Bedia *et al.* (2011) e Talon *et al.* (2007b) também obtiveram valores inferiores, mas determinaram apenas *Micrococcaceae*. Tabanelli *et al.* (2012), apenas em produto acabado, determinaram *Micrococci* e *Staphylococci* em enchidos tipo Felino e tipo Milão, e também obtiveram valores que não foram além dos 7,09 ± 0,33 log ufc/g, nos tipo Milão inoculados com *L. sakei*, *S. carnosus* e 5 espécies de *S. xylosus* (10¹¹ células/g de massa) e com 0,50% de dextrose adicionada, tendo sido este o valor médio mais elevado de entre os obtidos por todos os autores citados. Estes resultados parecem indicar que as estirpes de *Staphylococcus* inoculadas no presente ensaio não foram afetadas pela acidez do meio, consequência da atividade das bactérias lácticas.

No que respeita às contagens de enterobactérias, verificou-se uma redução das contagens deste grupo microbiano ao longo do tempo de amostragem, resultando em diferenças significativas entre o produto acabado e os tempos que lhe antecederam. Porém, não existiram diferenças significativas entre modalidades em nenhum dos tempos de amostragem. Os valores foram de aproximadamente 6,5 log ufc/g nos T0 e T10 e de aproximadamente 2,5 log ufc/g no produto acabado. No último momento de amostragem, as contagens foram ligeiramente inferiores nos paios inoculados por comparação com os controlo. Como já havíamos mencionado, esta redução de enterobactérias poderá estar associada à multiplicação das bactérias lácticas com consequente abaixamento do pH, redução da a_w e, obviamente, fenómenos competitivos.

Simion *et al.* (2014) obtiveram valores próximos de 3 log ufc/g na fase do pré-enchimento, independentemente de serem ou não inoculados. Até ao final da primeira semana assistiram a um incremento da concentração, mas no produto acabado os valores reduziram-se para 2 log ufc/g nos enchidos controlo e 1 log ufc/g numa das modalidades de inoculação e na outra o valor foi inferior ao

limite de deteção do método. Talon *et al.* (2008) obtiveram valores médios próximos dos 3 log ufc/g no início da cura, independentemente de serem ou não inoculados os enchidos. Porém, no produto acabado os valores reduziram-se para 2,8 log ufc/g nos enchidos controlo e 2,0 log ufc/g nos inoculados. Casaburi *et al.* (2007) obtiveram valores muito semelhantes aos de Talon *et al.* (2008).

Os resultados obtidos no início da cura pelos autores citados foram, de uma forma geral, inferiores em 3 log ufc/g aos por nós determinados. Todavia, no produto acabado foram semelhantes, ainda que Simion *et al.* (2014) tenham obtido valores ligeiramente inferiores. Já Lorenzo *et al.* (2014) e Essid & Hassouna *et al.* (2014) obtiveram valores próximos dos 4,0 log ufc/g no início da cura, enquanto no produto acabado, os primeiros autores contaram valores inferiores a 1,0 log ufc/g para os enchidos inoculados com culturas mistas (*L. sakei* e *S. carnosus*) e de 2,41 log ufc/g para os controlo, os segundos autores contaram valores praticamente inalterados ao longo de todo o processo produtivo para os enchidos controlo e próximos de 1,0 log ufc/g nos enchidos inoculados (*L. plantarum* e *S. xylosum*). Enterobactérias presentes nas fases iniciais do processo produtivo estarão presentes essencialmente devido a contaminações de origem fecal decorrentes do abate, transporte e/ou armazenamento das matérias-primas. Todavia, as etapas que decorrem nas instalações dos produtores de enchidos também poderão contribuir para o aumento deste grupo microbiano, isto se as boas práticas de higiene e fabrico forem descuradas. A utilização de tripas naturais será mais um fator de realce no incremento do grupo microbiano em discussão.

Para as contagens de bolores não se identificaram diferenças entre modalidades e tempos de amostragem. Porém, importa referir que no produto acabado apenas os paços alocados às modalidades 1 (controlo) e 3 (*L. sakei* CV3C2 10⁶) apresentaram contagens (0,58 ± 1,20 log ufc/g e 0,33 ± 0,82 log ufc/g, respetivamente).

As diferenças entre tempos de amostragem e modalidade não foram muito evidentes para as contagens de leveduras. Tabanelli *et al.* (2012) apresentaram os resultados para bolores e leveduras isoladamente, isto é, a grande maioria dos autores apresenta os resultados para as contagens de bolores e leveduras em conjunto. Advém daí o facto de também apresentarmos a discussão simultânea para bolores e leveduras, ao contrário do que havíamos feito nos dois ensaios anteriores onde inoculámos culturas puras de *Staphylococcus* e *Lactobacillus*. Os autores referidos, para bolores, obtiveram, em produto acabado, valores próximos de 5 log ufc/g para enchidos tipo Felino e próximos de 4,5 log ufc/g para enchidos tipo Milão. Relembramos que todos os enchidos foram inoculados (10¹¹ células/g de massa), foi adicionada dextrose (0,30% e 0,50% para tipo Felino e tipo Milão, respetivamente) e não existiram enchidos controlo. Para leveduras os valores médios foram inferiores, cifrando-se em aproximadamente 3 log ufc/g para os enchidos tipo Felino e próximos de 4 log ufc/g

para os tipo Milão. Julgamos que este facto se prenderá essencialmente com diferenças ao nível do processo produtivo usado nos enchidos produzidos por aqueles autores e o usado no fabrico dos enchidos objeto do nosso estudo.

Talon *et al.* (2008), que apresentaram as contagens de bolores e leveduras em conjunto, obtiveram valores próximos dos obtidos neste ensaio. Porém, autores como Bañon *et al.* (2013) e Bedia *et al.* (2011) obtiveram valores médios ligeiramente superiores. Os mesmos autores apresentaram como possível justificação a impregnação por *P. chrysogenum* das tripas, também nos parece que se terá devido àquela ação. Como já referimos, a utilização de bolores como culturas de arranque é feita, geralmente, à superfície dos enchidos, com o objetivo de inibir o desenvolvimento de estirpes com propriedades tóxicas, capazes de depreciar o produto ao nível sensorial e/ou contribuir para que a desidratação ocorra de forma gradual ou paulatina.

Não houve diferenças com significado estatístico para as contagens de *L. monocytogenes*. No produto acabado foram os paios alocados às modalidades 3 e 4 que apresentaram os valores médios mais reduzidos ($1,67 \pm 2,58$ ufc/g e $0,83 \pm 2,24$ ufc/g, respetivamente). Quando *L. sakei* CV3C2 foi inoculado como cultura pura ou como cultura mista (*S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2) a eliminação de *L. monocytogenes* foi mais efetiva, contudo, esse efeito pareceu perder-se na modalidade 5, com a introdução da levedura 2RB4. Autores como Talon *et al.* (2002) e Hugas *et al.* (1998) verificaram o efeito das bactérias lácticas, principalmente *L. sakei*, na inibição de bactérias patogénicas pela acidificação ou pela produção de bacteriocinas. Talon *et al.* (2008) observaram um incremento desta bactéria à medida que a cura se foi desenrolando, culminando com 2,7 log ufc/g e 1,1 log ufc/g para os enchidos controlo e inoculados, respetivamente. Isto significa que foram valores consideravelmente mais elevados que os apresentados no presente ensaio.

Importa referir que todos os valores obtidos no presente ensaio foram inferiores aos indicados na legislação vigente (100 ufc/g, segundo o Reg. 1441/2007) para alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitirem o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos.

No produto acabado *Salmonella* spp. esteve presente numa amostra em seis analisadas para os paios inoculados com as modalidades 2 (*S. equorum* S2M7 10^6) e 4 (*S. equorum* S2M7 10^6 e *L. sakei* CV3C2 10^6), tornando-os impróprios para consumo (Reg. N.º 1441/2007). Como foi mencionado nas discussões anteriores, felizmente, as bactérias em questão não foram detetadas na maioria dos estudos executados pelos diversos autores citados. Tendo como base o que havíamos escrito na discussão dos resultados para os paios inoculados com culturas puras de *Lactobacillus*, verificamos que, mais uma vez, no produto acabado, nas amostras onde foi detetada a bactéria em questão, os

valores determinados para a a_w ($\leq 0,852$) e para o pH ($\leq 4,94$) seriam suficientes para impedir a sua multiplicação, isto se tivermos em conta os valores propostos pela *Food Safety Authority of Ireland* (FSAI) (2011), mas não a sua eliminação imediata.

5.3.1.3. Determinação de aminas biogénicas

Na Tabela 62 apresenta-se a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Tabela 62 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Triptamina	F=2,4046 P=0,0932 ^{N.S.}
β-feniletilamina	F=0,1451 P=0,8651 ^{N.S.}
Putrescina	F=6,5060 P=0,0019**
Cadaverina	F=13,1988 P=0,0000***
Histamina	F=1,8549 P=0,0667 ^{N.S.}
Tiramina	F=0,2293 P=0,7953 ^{N.S.}
Espermidina	F=3,9058 P=0,0219*
Espermina	F=18,5445 P=0,0000***
Aminas vasoativas	F=0,4376 P=0,6476 ^{N.S.}
Total de aminas	F=3,9341 P=0,0213 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$;
*** Significativo para $p < 0,001$

A avaliação da Tabela 62 permite verificar que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para cadaverina e espermina, muito significativo ($p < 0,01$) para putrescina, significativo ($p < 0,05$) para espermidina e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis estudadas.

Mais uma vez, verifica-se o efeito do lote sobre as variáveis estudadas, refletindo alguma variabilidade de processos e/ou matérias-primas usadas/os neste ensaio.

Na Tabela 63 é apresentada a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 63 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis (mg/kg de enchido)	Fatores		
	Modalidade G.L.=4	Tempo de amostragem G.L.=2	Modalidade x Tempo de amostragem G.L.=8
Triptamina	F=32,1202 P=0,0000***	F=89,2484 P=0,0000***	F=0,1545 P=0,9961 ^{N.S.}
β-feniletilamina	F=8,0404 P=0,0000***	F=1128,0312 P=0,0000***	F=0,9616 P=0,4680 ^{N.S.}
Putrescina	F=5,2645 P=0,0000***	F=41,9628 P=0,0000***	F=0,2545 P=0,9791 ^{N.S.}
Cadaverina	F=6,7291 P=0,0000***	F=28,0943 P=0,0000***	F=0,5266 P=0,8353 ^{N.S.}
Histamina	F=10,0575 P=0,0000***	F=166,8135 P=0,0000***	F=0,1382 P=0,9974 ^{N.S.}
Tiramina	F=4,8419 P=0,0010***	F=30,9303 P=0,0000***	F=0,3017 P=0,9645 ^{N.S.}
Espermidina	F=2,7233 P=0,1264 ^{N.S.}	F=2,7233 P=0,0004***	F=2,7233 P=0,6855 ^{N.S.}
Espermina	F=1,5242 P=0,1974 ^{N.S.}	F=10,2295 P=0,0001***	F=0,2819 P=0,9712 ^{N.S.}
Aminas vasoativas	F=10,6659 P=0,0000***	F=128,6081 P=0,0000***	F=0,4821 P=0,8677 ^{N.S.}
Total de aminas	F=6,8042 P=0,0000***	F=66,6551 P=0,0000***	F=0,5973 P=0,7792 ^{N.S.}

G.L. – Grau de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ***Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 63 permite afirmar que o fator modalidade foi altamente significativo para todas as aminas, com exceção das poliaminas naturais, espermina e espermidina, para as quais foi não significativo ($p \geq 0,05$). Quanto ao fator tempo de amostragem, o mesmo foi altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as variáveis estudadas. Porém, a interação entre os fatores foi não significativa ($p \geq 0,05$) para todas as variáveis.

Na Tabela 64 são mostrados os valores médios e desvios padrão para as aminas biogénicas obtidos nos paços de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 64 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros (mg/kg de enchido)									
		Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina	Aminas vasoativas	Total de aminas
T0	1	50,42 ^{A,ab} ±5,78	20,22 ^A ±0,84	466,47 ^{A,a} ±51,42	570,34 ^A ±100,89	32,81 ^{A,ab} ±9,10	162,13 ^A ±33,62	12,48 ^A ±1,34	46,81 ±11,12	265,58 ^A ±36,90	1361,68 ^A ±141,42
	2	35,66 ^{A,c} ±11,95	17,63 ^A ±5,50	366,30 ^B ±145,51	488,14 ±157,62	29,54 ^{A,ab} ±11,34	141,65 ±60,07	11,16 ±3,71	40,71 ±16,30	224,48 ^A ±80,05	1130,79 ^A ±381,98
	3	43,44 ^{A,bc} ±5,42	19,36 ^A ±0,72	407,36 ^{A,ab} ±50,99	533,10 ^A ±72,79	30,99 ^{A,ab} ±7,51	137,87 ^A ±17,37	12,19 ^A ±1,14	43,28 ±9,46	231,66 ^A ±21,72	1227,58 ^A ±102,13
	4	40,32 ^{A,bc} ±6,28	19,08 ^A ±0,56	422,68 ^{A,ab} ±79,72	492,71 ^A ±90,66	26,50 ^{A,b} ±2,24	136,85 ^A ±21,41	12,24 ±0,73	44,26 ^A ±6,05	222,75 ^A ±22,37	1194,64 ^A ±177,13
	5	59,61 ^{A,a} ±16,64	20,47 ^A ±0,47	417,69 ^{A,ab} ±67,86	485,12 ^A ±51,29	36,21 ^{A,a} ±4,01	142,85 ^A ±19,95	12,75 ^A ±0,90	47,17 ^A ±6,16	259,15 ^A ±20,21	1221,88 ^A ±95,62
T10	1	38,46 ^{B,ab} ±5,80	12,75 ^{B,a} ±0,87	401,79 ^B ±51,69	517,32 ^{AB,a} ±101,11	25,72 ^{A,ab} ±9,03	139,50 ^{AB} ±33,49	12,01 ^{AB} ±1,33	42,89 ±11,06	216,44 ^{B,a} ±36,64	1190,45 ^{B,a} ±141,92
	2	26,79 ^{B,c} ±4,32	11,75 ^{B,ab} ±0,31	327,98 ±91,38	483,83 ^{ab} ±46,10	24,81 ^{A,ab} ±6,72	134,18 ±41,76	11,79 ±1,36	40,96 ±10,39	197,53 ^{A,ab} ±39,78	1062,09 ^{AB,ab} ±146,00
	3	31,50 ^{B,bc} ±5,40	11,90 ^{B,ab} ±0,72	342,86 ^B ±51,05	480,35 ^{A,ab} ±73,51	23,93 ^{A,ab} ±7,46	115,31 ^B ±17,25	11,72 ^{AB} ±1,12	39,37 ±9,39	182,64 ^{B,ab} ±21,41	1056,95 ^{B,ab} ±103,01
	4	25,88 ^{B,c} ±9,38	10,77 ^{B,b} ±3,09	324,99 ^B 116,88	393,79 ^{AB,b} ±128,61	18,06 ^{B,b} ±5,57	104,22 ^B ±35,39	10,83 ±3,11	36,77 ^B ±11,58	158,93 ^{B,b} ±48,96	925,30 ^{A,b} ±295,33
	5	47,60 ^{AB,a} ±16,97	13,00 ^{B,a} ±0,46	352,77 ^A ±67,19	431,95 ^{B,ab} ±51,66	29,13 ^{B,a} ±4,01	120,22 ^B ±20,06	12,28 ^{AB} ±0,90	43,24 ^{AB} ±6,16	209,95 ^{B,a} ±20,03	1050,20 ^{B,ab} ±94,67
TFinal	1	26,21 ^{C,ab} ±5,59	4,80 ^{C,a} ±0,83	329,11 ^C ±50,82	439,42 ^C ±98,35	10,58 ^{B,ab} ±8,01	113,99 ^B ±32,99	11,02 ^B ±1,38	37,88 ±10,92	155,58 ^{C,a} ±37,29	973,01 ^{C,a} ±140,14
	2	14,73 ^{C,c} ±4,61	3,85 ^{C,b} ±0,28	255,70 ±90,69	407,69 ±47,15	10,13 ^{B,ab} ±5,03	108,80 ±40,96	10,86 ±1,34	35,97 ±10,21	137,51 ^{B,ab} ±39,95	847,73 ^{C,ab} ±149,84
	3	19,28 ^{C,bc} ±5,20	3,98 ^{C,b} ±0,70	270,25 ^C ±50,34	403,29 ^B ±71,73	8,20 ^{B,ab} ±6,92	89,72 ^C ±16,95	10,78 ^C ±1,12	34,40 ±9,31	121,18 ^{C,ab} ±21,95	839,90 ^{C,ab} ±101,51
	4	15,70 ^{C,c} ±6,08	3,69 ^{C,b} ±0,51	278,92 ^B ±65,91	353,27 ^B ±49,91	3,17 ^{C,b} ±2,20	88,44 ^B ±21,49	11,37 ±0,94	38,16 ^{AB} ±5,95	111,00 ^{C,b} ±23,66	792,72 ^{B,b} ±175,93
	5	35,60 ^{B,a} ±16,43	5,16 ^{C,a} ±0,57	283,86 ^B ±77,31	360,81 ^C ±89,05	12,96 ^{C,a} ±3,92	94,40 ^C ±19,52	10,82 ^b ±0,78	35,29 ^B ±6,24	148,12 ^{C,a} ±20,75	838,90 ^{C,ab} ±94,05

T0 (pré-enchimento); **T10** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado). **1** - Controlo com dextrose; **2** - *S. equorum* S2M7 (10⁶ células/g); **3** - *L. sakei* CV3C2 (10⁶ células/g); **4** - *S. equorum* S2M7 (10⁶ células/g) + *L. sakei* CV3C2 (10⁶ células/g); **5** - *S. equorum* S2M7 (10⁶ células/g) + *L. sakei* CV3C2 (10⁶ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g). O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina. Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A análise da Tabela 64 mostra que todas as aminos, de uma forma geral, viram os seus teores reduzirem-se à medida que a cura se foi consumando. Gücükoğlu & Küplülü (2010) determinaram os teores das mesmas aminos estudadas no presente ensaio e, salvo raras exceções, também verificaram reduções para todas as aminos. Contrariamente, Xie *et al.* (2015), Stadnik & Dolatowski (2010) e Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmonero (2004) verificaram incrementos ao longo do processo produtivo. Já Laranjo *et al.* (2016) e Simion *et al.* (2014) apresentaram valores médios que não seguiram a mesma tendência para todas as aminos, isto é, alguns teores aumentaram, outros reduziram-se e outros aumentaram até à fase intermédia da cura e voltaram a reduzir-se no produto acabado. Estas variações estarão associadas ao processo produtivo e a todas as suas condicionantes, variações de pH, de temperatura e, conseqüentemente, da microbiota que tem uma influência primordial na descarboxilação dos aminoácidos precursores das aminos biogénicas.

Para as poliaminas naturais (espermidina e espermina) não se verificaram diferenças muito acentuadas entre modalidades e tempos de amostragem. Os teores de espermina, de igual modo aos ensaios anteriores, sobrepuseram-se aos de espermidina e os valores médios mantiveram-se, praticamente, constantes ao longo do todo o processo produtivo. O facto dos resultados se manterem praticamente constantes ao longo da cura confirma que os teores das aminos em questão não resultam da descarboxilação causada por microrganismos, mas de microcomponentes fisiológicos da carne.

À medida que a cura foi progredindo os teores de aminos vasoativas foram-se minorando. No produto acabado todos os valores foram inferiores a 200 mg/kg, como já referimos anteriormente será considerado o valor limite aceitável. Em todos os tempos de amostragem foram os paços controlo que apresentaram concentrações mais elevadas para o grupo em análise. No produto acabado existiram diferenças significativas entre os paços controlo e os inoculados com a modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶), cabendo os valores médios mais reduzidos aos inoculados (155,58 ± 37,29 mg/kg e 111,00 ± 23,66 mg/kg, respetivamente).

Espécies como *S. carnosus* e *L. curvatus* têm sido reportadas como tendo capacidade fortemente aminogénica (Talon & Leroy, 2011; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010a). Contrastando com espécies como *L. sakei*, *L. platarum*, *S. xylosus* e *S. equorum* que têm sido descritas como tendo baixa ou nula atividade aminogénica (Alfaia *et al.*, 2018; Linares *et al.*, 2011; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010a; Simonová *et al.*, 2006). Todavia, Bover-Cid *et al.* (2001c) e Bover-Cid *et al.* (1999) referem que, em geral, culturas de arranque que contêm bactérias lácticas têm mostrado maior eficácia na redução destes contaminantes químicos, por comparação com culturas compostas apenas por ECN.

Os teores totais de aminas também regrediram à medida que a cura se foi efetivando e foram todos inferiores a 1000 mg/kg, o que representa um grau de higiene adequado, contribuindo, portanto, para a segurança sanitária dos enchidos. Mais uma vez, os paios inoculados com a modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶) apresentaram um valor médio significativamente inferior aos controlo (792,72 ± 175,93 mg/kg e 973,01 ± 140,14 mg/kg, respetivamente).

As aminas que apresentaram teores mais elevados no produto acabado, por ordem decrescente, foram cadaverina, putrescina e tiramina. Em sentido oposto surgiram β-feniletilamina, histamina, triptamina e as poliaminas naturais.

Na Tabela 65 apresenta-se a percentagem de redução dos teores de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo e os inoculados.

Tabela 65 - Percentagem de redução dos teores de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paios controlo e os inoculados.

Modalidade	% de Redução									
	Triptamina	β-feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espermina	Aminas vasoativas	Totalde aminas
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	43,80	19,79	22,31	7,22	4,25	4,55	1,45	5,04	11,61	12,88
3	26,44	17,08	17,88	8,22	22,50	21,99	2,18	9,19	22,11	13,68
4	40,10	23,13	15,25	19,61	70,04	22,41	NR	NR	28,65	18,53
5	NR	NR	13,75	17,89	NR	17,19	1,81	6,84	4,79	13,78

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g); 3 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g).

O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β-feniletilamina, histamina e tiramina.

NR - Não ocorre redução

Após análise da Tabela 65 é de referir que os paios alocados à modalidade 5 (continha levedura 2RB4) foram aqueles onde ocorreu menor redução do número de aminas estudadas, porém, não foi o que se verificou em termos dos valores totais. Também é possível concluir que foi a modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶) que promoveu a maior percentagem de redução do total de aminas biogénicas (18,53%) e do conjunto das aminas vasoativas (28,65%). As concentrações de histamina - juntamente com tiramina são consideradas as mais problemáticas em termos toxicológicos - foram reduzidas neste ensaio, mas a última modalidade aludida promoveu uma redução de 70,04% de histamina, por comparação com os paios controlo. Autores como Wang *et al.* (2015) e Casquete *et al.* (2011a), quando inocularam culturas de arranque em enchidos, também foi para histamina que observaram as maiores reduções.

Cadaverina e tiramina também foram reduzidas em percentagens próximas do 20% quando os paios foram inoculados com a modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶).

O facto da cultura de arranque composta por *S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶ ter conseguido, de uma forma geral, promover reduções de amins biogénicas ligeiramente superiores às restantes modalidades, corroborando o descrito por Baka *et al.* (2011); Tosukhowong *et al.*, 2011 e Gücükoğlu & Küplülü (2010) que referem que as culturas mistas têm maior capacidade para reduzir a produção de amins biogénicas. Vidal-Carou *et al.* (2015) sublinham que o efeito na redução dos teores de amins biogénicas por parte das culturas mistas, advém do facto daquelas culturas conseguirem contribuir para o controlo de diferentes grupos bacterianos que poderiam dispor de atividade aminogénica, parece-nos que essa contribuição resultará da competição entre os grupos bacterianos.

A cultura pura de *L. sakei* CV3C2 10⁶ (modalidade 3) também teve um efeito superior na redução dos teores de amins biogénicas, por comparação com a cultura pura composta por *S. equorum* S2M7 10⁶ (modalidade 2), indo ao encontro do mencionado por Baka *et al.* (2011); Tosukhowong *et al.* (2011) e Bover-Cid *et al.* (2001b), apesar da espécie de *S. equorum* ser frequentemente descrita como tendo atividade descarboxilativa fraca ou negativa.

De uma forma geral, os paios inoculados apresentaram concentrações mais baixas de amins biogénicas no produto acabado. Excetuando-se a modalidade que continha levedura 2RB4, parecendo que a mesma teve um efeito positivo no incremento de algumas amins biogénicas, face aos paios não inoculados, nomeadamente para triptamina e histamina. Montel *et al.* (1999) confirmaram a atividade descarboxilase positiva de estirpes de *Debaryomyces* e *Candida* para histidina, além disso, estirpes não identificadas de leveduras produziram teores elevados de β -feniletilamina e tiramina.

De salientar que nos ensaios em que foram inoculadas culturas puras, apresentados e discutidos em 5.1. e 5.2., que levaram à escolha das estirpes (*S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2) e respetiva concentração (10⁶ células g/massa) a inocular neste ensaio com culturas mistas, não houve redução dos teores totais de amins biogénicas no produto acabado, porém, neste ensaio que envolveu culturas mistas, mas também as mesmas culturas puras já testadas anteriormente, aquelas estirpes puras mostraram efeito positivo na redução dos teores de amins biogénicas, apesar das condições de processamento serem em tudo semelhantes. Esta conclusão corrobora Rabie *et al.* (2014); Latorre-Moratalla *et al.* (2012); Stadnik & Dolatowski, (2010) e Ruiz-Capillas *et al.* (2007b) que concluíram que os múltiplos fatores que podem influenciar a produção de amins biogénicas contribuem para uma inevitável volubilidade dos resultados.

5.3.1.4. Parâmetros da cor

Na Tabela 66 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Tabela 66 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
L*	F=7,8433 P=0,0006***
a*	F=0,1331 P=0,8755 ^{N.S.}
b*	F=0,8638 P=0,4237 ^{N.S.}
c*	F=0,5172 P=0,5973 ^{N.S.}
H°	F=0,4322 P=0,4322 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *** Significativo para $p < 0,001$

Observando a Tabela 66 conclui-se que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para L* e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes coordenadas de cor.

Os resultados da análise de variância para os parâmetros da cor seguem a tendência evidenciada para os grupos até aqui estudados, que é a de o fator lote ser significativo não para todos, mas para algumas das variáveis estudadas.

Na Tabela 67 mostra-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Tabela 67 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
L*	F=5,2303 P=0,0006***
a*	F=0,5634 P=0,6896 ^{N.S.}
b*	F=0,2418 P=0,9142 ^{N.S.}
c*	F=0,3275 P=0,8591 ^{N.S.}
H°	F=0,3259 P=0,8602 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *** Significativo para $p < 0,001$

A observação da Tabela 67 permite afirmar que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para o parâmetro L*. Não tendo sido significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

Na Tabela 68 são apresentados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 68 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros				
		L*	a*	b*	C*	H°
T _{Final} (produto acabado)	1	42,32 ^a ±4,63	18,58±2,86	15,64±5,00	24,44±6,74	39,16±6,74
	2	43,41 ^a ±5,03	19,43±3,66	15,72±5,26	25,14±5,81	38,13±5,91
	3	41,32 ^{ab} ±4,26	19,15±3,80	15,87±5,53	25,00±6,17	38,69±6,14
	4	42,00 ^a ±4,66	19,13±2,97	16,26±4,40	25,21±4,79	39,80±5,31
	5	38,14 ^b ±5,24	18,37±2,61	15,02±4,79	23,90±4,62	38,55±6,42

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g); 3 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

Na mesma coluna, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

Nos ensaios anteriores onde foram inoculadas culturas puras de *Staphylococcus* e *Lactobacillus*, apenas foram identificadas diferenças significativas entre modalidades para a coordenada de cor L*, tendo-se verificado o mesmo no corrente ensaio.

Oellingrath & Slinde (1985) referem que a coordenada de cor L* parece ser a que fornece mais informações no que respeita à evolução da cor de produtos cárneos e Gimeno *et al.* (1994) alerta que a coordenada a* não deve ser ignorada.

Os paios inoculados com a modalidade 5 (*S. xylosus* CV3C2 10^6 , *L. sakei* CV3C2 10^6 e levedura 2RB4 10^6) foram significativamente mais escuros ($38,14 \pm 5,24$) que os das restantes modalidades, com exceção dos inoculados com modalidade 3 (*L. sakei* CV3C2 10^6) que apresentaram o valor médio $41,32 \pm 4,26$.

Ravyts *et al.* (2012) e Talon *et al.* (2007b) reportaram o contributo positivo das culturas de arranque sobre as coordenadas de cor de enchidos. Todavia, Wang *et al.* (2015); Essid & Hassouna (2013); Casquete *et al.* (2011b) e Casaburi *et al.* (2007) verificaram que a cor dos enchidos apenas foi afetada pela evolução da cura e não pelas inoculações, algo que não podemos confirmar porque apenas determinámos os parâmetros da cor no produto acabado.

Em função do descrito, apenas a modalidade que continha a levedura 2RB4 pareceu ter algum efeito no escurecimento dos paios, algo que Van Ba *et al.* (2016) também concluíram em enchidos produzidos na Coreia do Sul, com uma tecnologia de produção semelhante à usada no presente

ensaio e inoculados com uma cultura mista composta por *S. xylosus*, *S. carnosus*, *L. curvatus* e *D. hansenii*. No que respeita à concentração microbiana inoculada, os autores apenas referem 0,2 g/kg. Julgamos que não será de descurar a possibilidade dos teores em gordura terem contribuído para os valores obtidos para a coordenada L*, parece-nos que as estirpes não influenciaram de forma muito evidente os parâmetros da cor dos paios.

5.3.1.5. Parâmetros reológicos

Na Tabela 69 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Tabela 69 - Análise de variância para os resultados dos reológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Dureza (N)	F=0,0005 P=0,9995 ^{N.S.}
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=6,4115 P=0,0021**
Coesividade	F=0,1464 P=0,8640 ^{N.S.}
Elasticidade	F=0,5259 P=0,5921 ^{N.S.}
Resiliência	F=1,6309 P=0,1993 ^{N.S.}
Mastigabilidade (N)	F=0,1136 P=0,8927 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ** Significativo para p<0,01

A análise da Tabela 69 permite concluir que o fator lote foi muito significativo (p<0,01) para adesividade e não significativo (p≥0,05) para as demais variáveis.

Ao contrário dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e amins biogénicas o fator lote mostrou ter menor significância sobre os parâmetros reológicos, revelando que, provavelmente, as estirpes tiveram superior influência sobre aqueles grupos de parâmetros.

Na Tabela 70 mostra-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Tabela 70 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Dureza (N)	F=6,2498 P=0,0001***
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=0,8952 P=0,4686 ^{N.S.}
Coesividade	F=3,0599 P=0,0187*
Elasticidade	F=1,4450 P=0,2222 ^{N.S.}
Resiliência	F=2,1511 P=0,0475*
Mastigabilidade (N)	F=3,7857 P=0,0059**

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para p<0,01; ** Significativo para p<0,01 *** Significativo para p<0,001

Observando a Tabela 70 conclui-se que o fator modalidade foi altamente significativo (p<0,001) para a dureza, muito significativo (p<0,01) para a mastigabilidade, significativo (p<0,05) para a coesividade e resiliência e não significativo (p≥0,05) para as restantes variáveis.

Na Tabela 71 indicam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 71 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Dureza (N)	63,169 ^a ±15,151	49,606 ^c ±10,171	58,404 ^{ab} ±14,308	52,785 ^{bc} ±9,826	51,220 ^{bc} ±11,199
Adesividade (N.s ⁻¹)	- 3,398±1,741	- 2,778±1,529	- 2,837±1,852	- 3,003±1,827	- 2,629±1,553
Coesividade	0,594 ^{ab} ±0,035	0,600 ^{ab} ±0,053	0,622 ^a ±0,058	0,581 ^b ±0,044	0,609 ^{ab} ±0,046
Elasticidade	0,881±0,094	0,913±0,097	0,901±0,173	0,889±0,070	0,966±0,256
Resiliência	0,133 ^{ab} ±0,014	0,134 ^{ab} ±0,029	0,144 ^a ±0,022	0,128 ^b ±0,025	0,136 ^{ab} ±0,016
Mastigabilidade (N)	33,325 ^a ±10,504	27,036 ^b ±6,168	32,158 ^{ab} ±8,002	27,192 ^b ±5,355	29,777 ^{ab} ±8,926

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g); 3 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁶ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁶ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

Observando a Tabela 71 verifica-se que os paios controlo foram mais duros ($63,169 \pm 15,151$ N) que os inoculados, e apresentaram diferenças significativas em relação a todas as modalidades inoculadas, com exceção dos paios associados à modalidade 3 (*L. sakei* CV3C2 10^6), com um valor médio de $58,404 \pm 14,308$ N. Os paios atribuídos a esta última modalidade foram significativamente mais duros que os da modalidade 2 (*S. equorum* S2M7 10^6) que apresentaram um valor médio de $49,606 \pm 10,171$ N.

O facto dos paios controlo se apresentarem mais duros poderia estar associado a uma desidratação mais intensa, devido a temperaturas mais elevadas, todavia, parece-nos pouco provável porque os paios estiveram expostos a condições muito semelhantes, visto terem sido curados em câmaras de cura automatizadas, ou, eventualmente, a uma proteólise superior, mas neste caso não podemos tirar conclusões muito aprofundadas porque não determinámos parâmetros como, por exemplo, os ácidos aminados livres que nos permitiriam inferir acerca da extensão da proteólise. Porém, estes compostos, por descarboxilação, podem ser convertidos em aminas biogénicas e, efetivamente, os valores médios das mesmas, no produto acabado, foram superiores nos paios não inoculados (ver Tabela 64). Em sùmula, provavelmente, alguma ação proteolítica das estirpes fez com que os produtos inoculados ficassem menos duros.

Van Ba *et al.* (2016) inocularam culturas mistas em enchidos fabricado na Coreia do Sul e apenas observaram diferenças significativas para o parâmetro dureza, aquelas diferenças foram notadas entre enchidos inoculados e não entre enchidos inoculados e enchidos controlo. Kargozari *et al.* (2014) também identificaram poucas diferenças em enchidos turcos produzidos na planta piloto da Universidade de Salamanca, a concentração inoculada pelos autores foi de aproximadamente 10^6 células/g de massa para as estirpes de *L. plantarum* LBP7, LBP10 e LBP14.

Para o parâmetro dureza, Van Ba *et al.* (2016) obtiveram resultados extremamente baixos, por comparação com os por nós obtidos, cifrando-se em 15,20 N para os enchidos controlo e próximos do mesmo valor para os inoculados. Já Kargorazi *et al.* (2014), obtiveram valores próximos dos 245 N, todavia, os enchidos foram produzidos com carne e gordura de vaca, como tal, os valores, teoricamente, serão superiores atendendo às características físicas e bioquímicas das matérias-primas.

A modalidade 3 (*L. sakei* CV3C2 10^6) apresentou paios significativamente mais coesos e resilientes que os alocados à modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10^6 e *L. sakei* CV3C2 10^6). Hosney & Smewing (1999) referem que alimentos que apresentem valores superiores para adesividade, normalmente apresentam piores ligações internas, isto é, menores valores para coesividade e, basicamente, foi o que ocorreu no presente ensaio.

A mastigabilidade dos paios controlo foi significativamente ($33,325 \pm 10,504$ N) superior à dos paios associados às modalidades 2 ($27,036 \pm 6,168$ N) e 4 ($27,192 \pm 5,355$ N). Como a mastigabilidade resulta da multiplicação entre os parâmetros dureza, coesividade e elasticidade é natural que se tenhamos chegada à conclusão referida.

5.3.1.6. Análise sensorial

É de realçar que os lotes 2 e 3 se encontravam contaminados com *Salmonella* spp. Em função do referido, o painel de provadores apenas avaliou sensorialmente os produtos através dos sentidos da visão e do olfato, ou seja, os parâmetros avaliados pelos restantes sentidos não foram contemplados. Porém, importa evidenciar que *Salmonella* spp. não esteve presente nos paios do lote 1, mas como produzimos os enchidos com um intervalo curto entre lotes, optámos por apresentar os paios ao painel depois de todos os lotes estarem concluídos. Por uma questão de precaução, os paios do lote 1 também não foram provados.

Na Tabela 72 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros da análise sensorial, considerando o fator lote.

Tabela 72 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Intensidade da cor	F=2,8516 P=0,0606 ^{N.S.}
Cores estranhas	F=0,7459 P=0,4759 ^{N.S.}
Marmoreado	F=0,8402 P=0,4335 ^{N.S.}
Intensidade do aroma	F=4,6901 P=0,0104*
Aromas estranhos	F=0,6607 P=0,5178 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$

Relativamente aos resultados indicados na Tabela 72 constata-se que o fator lote foi significativo ($p < 0,05$) para a variável intensidade do aroma e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

O referido não é totalmente inesperado, apesar das modalidades e as condições de cura serem idênticas, o facto dos lotes terem sido produzidos em datas diferentes e com matérias-primas distintas poderá originar este tipo de variância.

Na Tabela 73 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros da análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Tabela 73 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando com o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Intensidade da cor	F=0,9970 P=0,4109 ^{N.S.}
Cores estranhas	F=0,2565 P=0,9054 ^{N.S.}
Marmoreado	F=0,3444 P=0,8476 ^{N.S.}
Intensidade do aroma	F=1,3406 P=0,2571 ^{N.S.}
Aromas estranhos	F=0,1074 P=0,9798 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo

A análise da Tabela 73 permite concluir que o fator modalidade não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas.

Na Tabela 74 mostram-se os valores médios e desvios padrão para os resultados dos parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 74 - Valores médios e desvios padrão para os resultados dos parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Intensidade da cor	71,86±15,12	73,44±13,91	74,25±15,15	67,47±18,20	69,91±19,16
Cores estranhas	0,92±2,60	0,79±2,63	0,31±1,77	0,63±3,54	0,78±2,57
Marmoreado	64,37±15,67	66,24±16,60	67,35±16,74	67,00±16,12	63,34±19,88
Intensidade do aroma	66,95±16,82	70,79±10,98	72,88±16,66	71,53±11,36	73,50±13,16
Aromas estranhos	2,79±4,16	3,06±4,38	3,84±14,24	2,81±5,67	2,81±6,83

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g); 3 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^6 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^6 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A análise da Tabela 74 permite inferir que não existiram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros de análise sensorial avaliados pelo painel. Porém, os paios alocados à modalidade 3 (*L. sakei* CV3C2 10⁶) apresentaram os valores médios mais elevados para intensidade da cor, marmoreado e aromas estranhos (74,25 ± 15,15, 67,35 ± 16,74 e 3,84 ± 14,24, respetivamente), os associados à modalidade 1 (controlo) o valor médio mais elevado para cores estranhas (0,92 ± 2,60) e a modalidade 5 (*S. equorum* S2M7 10⁶, *L. sakei* CV3C2 10⁶ e levedura 2RB4 10⁶) o valor médio mais elevado para intensidade do aroma (73,50 ± 13,16).

De uma forma geral, conclui-se que as inoculações com culturas mistas não depreciaram as características sensoriais dos paios de porco preto o que num produto com características tão definidas e que o painel está habituado a identificar deverá ser tido em conta. Até parecem ter incrementado algum efeito positivo, nomeadamente ao nível do aroma. Autores como Bañón *et al.* (2014); Baka *et al.* (2011) e Casquete *et al.* (2011b) identificaram os efeitos positivos das culturas de arranque ao nível sensorial de enchidos. Bedia *et al.* (2011) verificaram que as inoculações prejudicaram os enchidos ao nível do sabor. Prpich *et al.* (2016) e Simion *et al.* (2014) constataram algo semelhante ao por nós já descrito, isto é, não houve uma depreciação das características sensoriais, todavia, também não se observou um contributo significativo para a melhoria das mesmas.

5.3.1.7. Principais conclusões do ensaio

As estirpes tiveram um efeito significativo sobre a redução da a_w , com exceção dos paios inoculados com a estirpe *L. sakei* CV3C2 10⁶ células g/massa, contribuindo, portanto, para acelerar o processo produtivo. Sobre o pH a ação das estirpes não foi muito pronunciada.

As estirpes, de uma forma geral, não mostraram uma ação muito evidente sobre a microbiota dos paios. No produto acabado, quando *L. sakei* CV3C2 10⁶ células g/massa foi inoculado como cultura pura ou como cultura mista (*S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶) a eliminação de *L. monocytogenes* foi mais efetiva, contudo, esse efeito pareceu perder-se com a introdução da levedura 2RB4.

No que respeita aos teores de amins biogénicas, com exceção dos enchidos alocados à modalidade que continha levedura 2RB4, os paios inoculados apresentaram teores inferiores daqueles compostos. Os paios inoculados com a cultura mista *S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶, no produto acabado, apresentaram teores de amins vasoativas e teores totais daqueles compostos que foram significativamente inferiores aos dos paios controlo.

As estirpes tiveram efeito sobre alguns parâmetros reológicos dos paios, destacando-se o incremento na ligação das massas (valores mais elevados de coesividade) e a redução dos valores de mastigabilidade.

Em função do apresentado, a cultura mista composta *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, na concentração 10^6 células/g massa para cada estirpe, foi aquela que mostrou maior aptidão para ser inoculada como cultura de arranque em paios de porco preto, do Alentejo.

5.3.2. Inoculação com culturas mistas na concentração 10^8 células por grama de massa

Tendo como base os resultados obtidos no ensaio anterior e indicado no ponto 5.3.1., relativo às inoculações com culturas mistas nos paios de porco preto, concluiu-se que os mesmos não evidenciaram diferenças muito pronunciadas entre modalidades de inoculação, provavelmente devido às condições de fabrico adotadas. Posto isto, decidimos testar estirpes - patenteadas - que já tinham provado ter um papel melhorador nos enchidos de outras fábricas, estudados há alguns anos atrás. Para além disso, também reforçámos a concentração das estirpes bacterianas (10^8 células g/massa), no sentido de se perceber se esta variável estava a afetar a ação daquelas estirpes. Até porque as estirpes patenteadas haviam sido inoculadas com a concentração 10^8 células g/massa. A levedura 2RB4, como referido no capítulo materiais e métodos, foi sempre inoculada na concentração 10^6 células g/massa.

Relembramos que acrescentámos dois tempos de amostragem, que foram o T2 e o T25. Com a introdução do T2 (48 horas após o enchimento na antecâmara do fumeiro) o habitual T10 passou a T12, para se manterem os 10 dias de cura até aqui usados. Como consequência do abaixamento da a_w e do pH o efeito das estirpes inoculadas poderá não ser tão evidente no final da cura, pelo que optámos por introduzir um tempo de amostragem intermédio (T25 - 25 dias de cura) com o objetivo de avaliar o efeito redutor das culturas sobre os indicadores de segurança (*L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.) e de higiene (enterobactérias).

5.3.2.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)

Na Tabela 75 apresenta-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Tabela 75 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
pH	F=11,9400 P=0,0000***
a_w	F=3,5404 P=0,0293*

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: *Significativo para $p < 0,05$; ***significativo para $p < 0,001$

A observação da Tabela 75 permite inferir que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para o pH e significativo ($p < 0,05$) para a a_w .

Lotes produzidos em datas distintas com matérias-primas de porco preto, mas de lotes diferentes, poderão levar à variância patente na Tabela anterior.

Na Tabela 76 é apresentada a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 76 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=4	G.L.=16
pH	F=63,6632 P=0,0000***	F=1430,2307 P=0,0000***	F=14,5027 P=0,0000***
a_w	F=10,2662 P=0,0000***	F=7419,2988 P=0,0000***	F=2,6353 P=0,0042**

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 76 permite concluir que os dois fatores foram altamente significativos ($p < 0,001$) para as variáveis estudadas e a interação modalidade x tempo de amostragem foi muito significativa ($p < 0,01$) para a a_w e altamente significativa ($p < 0,001$) para o pH.

Na Tabela 77 são mostrados os valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 77 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros	
		pH	a_w
T0	1	5,87 ^{A,a} ±0,06	0,963 ^{A,a} ±0,010
	2	5,64 ^{A,b} ±0,24	0,959 ^{A,ab} ±0,012
	3	5,60 ^{A,b} ±0,28	0,961 ^{A,ab} ±0,007
	4	5,68 ^{A,b} ±0,27	0,956 ^{A,b} ±0,010
	5	5,68 ^{A,b} ±0,03	0,962 ^{A,a} ±0,007
T2	1	5,73 ^{B,a} ±0,10	0,957 ^{B,ab} ±0,012
	2	5,35 ^{B,b} ±0,11	0,955 ^{A,abc} ±0,009
	3	5,30 ^{B,b} ±0,11	0,952 ^{B,c} ±0,008
	4	5,33 ^{B,b} ±0,06	0,953 ^{A,bc} ±0,005
	5	5,35 ^{B,b} ±0,04	0,959 ^{A,a} ±0,011
T12	1	5,05 ^{CD,a} ±0,09	0,932 ^{C,a} ±0,006
	2	4,97 ^{C,b} ±0,04	0,934 ^{B,a} ±0,005
	3	5,00 ^{C,b} ±0,06	0,933 ^{C,a} ±0,007
	4	5,00 ^{C,b} ±0,03	0,927 ^{B,b} ±0,003
	5	5,00 ^{C,b} ±0,04	0,931 ^{B,bc} ±0,009

Tabela 77 (continuação) - Valores médios e desvios padrão para o pH e a aw obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros	
		pH	aw
T25	1	5,01 ^{D,a} ±0,03	0,903 ^D ±0,007
	2	4,95 ^{C,bc} ±0,02	0,905 ^C ±0,004
	3	4,97 ^{C,b} ±0,02	0,902 ^D ±0,004
	4	4,95 ^{C,c} ±0,03	0,904 ^C ±0,008
	5	4,96 ^{C,bc} ±0,05	0,906 ^C ±0,005
TFinal	1	5,06 ^{CD,a} ±0,09	0,856 ^{E,a} ±0,007
	2	5,02 ^{C,bc} ±0,04	0,852 ^{D,ab} ±0,005
	3	5,02 ^{C,bc} ±0,06	0,851 ^{E,b} ±0,004
	4	5,00 ^{C,c} ±0,03	0,852 ^{D,ab} ±0,005
	5	5,03 ^{C,b} ±0,04	0,855 ^{D,a} ±0,007

T0 (pré-enchimento); **T2** (48 h após o enchimento); **T12** (fase intermédia da cura); **T25** (25 dias de cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

A observação da Tabela 77 permite concluir que houve um abaixamento dos valores de pH ao longo da maioria do processo de cura, porém, no TFinal (produto acabado) observou-se um ligeiro incremento, em relação ao tempo que lhe antecedeu (T25 dias de cura). Os dois primeiros tempos (T0 e T2) de cura apresentaram valores médios significativamente superiores aos que lhes sucederam. Entre os tempos T0 (pré-enchimento) e T2 (48 horas após o enchimento na antecâmara do fumeiro) também se observaram diferenças significativas, cabendo aos primeiros valores médios significativamente superiores. Uma avaliação por tempo de amostragem permite concluir que no T0 foram os paios controlo (modalidade 1) que apresentaram o valor médio (5,87 ± 0,06) significativamente mais elevado e os da modalidade 3 (*S. equorum* S2M7 10⁸, *L. sakei* CV3C2 10⁸ e levedura 2RB4 10⁶) o valor médio (5,60 ± 0,28) mais baixo, apesar de não terem existido diferenças significativas entre os paios inoculados. No T2, mais uma vez, foi a modalidade 1 que apresentou o valor médio (5,73 ± 0,10) significativamente mais elevado, entre as demais não se observaram diferenças. Importa realçar que o facto dos enchidos ficarem expostos a temperaturas em torno dos 20,0 °C ± 2°C, durante 48 horas, promoveu um abaixamento mais evidente dos valores de pH. Posto isto, parece-nos que a introdução deste tempo de amostragem teve um efeito favorável sobre o parâmetro em análise. Nos restantes tempos de amostragem (T25 e TFinal) os enchidos controlo apresentaram sempre valores de pH significativamente superiores aos inoculados.

Para a a_w , como seria expectável, observaram-se diferenças ao longo do processo produtivo, existindo uma redução paulatina ao longo do mesmo. As diferenças significativas entre tempos de amostragem foram iguais às apontadas para o pH. Por tempo de amostragem, para o T0, os paios alocados à modalidade não inoculada ($0,963 \pm 0,010$) e à modalidade 5 ($0,962 \pm 0,010$) apresentaram valores médios significativamente mais elevados que os da modalidade 4 (*S. xylosus* CECT7057 10^8 e *L. sakei* CECT7056 10^8), que se cifrou em $0,956 \pm 0,010$.

Para o parâmetro em discussão não se esperava que as estirpes tivessem um efeito significativo 48 horas após o enchimento e, de uma forma geral, foi isso que se verificou. Apenas os paios inoculados com a modalidade 3 (*Staphylococcus equorum* S2M7 10^8 , *Lactobacillus sakei* CV3C2 10^8 e levedura 2RB4) apresentaram um valor médio ($0,952 \pm 0,008$) significativamente inferior aos paios controlo ($0,957 \pm 0,012$). Na fase intermédia da cura (T12) os paios alocados às modalidades 4 e 5 apresentaram valores médios ($0,927 \pm 0,003$ e $0,931 \pm 0,009$, respetivamente) significativamente mais reduzidos que os das restantes modalidades.

Como referido no capítulo materiais e métodos, considerámos os paios acabados quando atingiram 38% a 40% de perda de peso inicial. Naquela fase da cura, os valores da a_w seriam bastante baixos e as estirpes poderiam ter dificuldades em apresentar uma ação significativamente melhoradora (a_w inferiores) face aos paios não inoculados ou tê-la já perdido. Por conseguinte, optámos pela introdução do T25 (25 dias de cura), fase em que os valores ainda estariam acima de 0,90 e as estirpes poderiam mostrar o seu efeito. Mas neste caso também não se evidenciaram diferenças muito notórias, pelo menos para a a_w .

No produto acabado o valor médio mais elevado coube aos paios não inoculados ($0,856 \pm 0,007$) e o mais reduzido aos inoculados com a modalidade 3 ($0,851 \pm 0,004$), tendo existido diferenças significativas entre as modalidades.

Com base no acima indicado, podemos inferir que as inoculações, no produto acabado, tiveram efeito sobre a redução do pH dos enchidos inoculados, mas tal foi menos evidente sobre a a_w .

A introdução do T25 neste ensaio não mostrou nada de essencial para os dois parâmetros em análise.

A introdução das estirpes patenteadas e o incremento da concentração microbiana também não parecem ter tido um efeito notório nos resultados obtidos para os parâmetros em análise. Os resultados obtidos são semelhantes aos apresentados no ensaio anterior, também com inoculação de culturas mistas, mas sem as estirpes patenteadas e com a concentração 10^6 células/g de massa para as bactérias. Posto isto, julgamos que a discussão dos resultados apresentada no ensaio mencionado se pode aplicar a este ensaio.

5.3.2.2. Parâmetros microbiológicos

Relativamente aos parâmetros microbiológicos, para o T25 (25 dias de cura), efetuámos apenas contagens para enterobactérias *L. monocytogenes* e pesquisa de *Salmonella* spp. Esta medida deveu-se à necessidade de otimizar recursos, não deixando de efetuar as determinações microbianas indicadas. Como consequência do abaixamento da a_w e do pH, o efeito das estirpes poderá não ser tão evidente no final da cura, optámos por introduzir este tempo para percebermos até que ponto as estirpes conseguiriam ter um efeito redutor sobre, principalmente, os indicadores de segurança e enterobactérias.

Na Tabela 78 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Tabela 78 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Mesófilos	F=7,5362 P=0,0007***
Psicrotróficos	F=21,3705 P=0,0000 ***
Bactérias lácticas	F=3,3042 P=0,0390 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus</i> spp.	F=6,3033 P=0,0023**
Enterobactérias	F=7,1344 P=0,0010**
Bolores	F=7,8513 P=0,0005***
Leveduras	F=1,0540 P=0,3507 ^{N.S.}
<i>L. monocytogenes</i>	F=2,6013 P=0,0766 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo;***Significativo para $p < 0,001$

Relativamente aos resultados indicados na Tabela 78 conclui-se que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para as contagens de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e bolores, muito significativo para *Staphylococcus* spp. e enterobactérias e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis estudadas.

A microbiota dos enchidos está sujeita a múltiplos fatores, como tal, será comum existirem variações significativas entre lotes produzidos com matérias-primas distintas e em datas também distintas.

Na Tabela 79 mostra-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 79 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=4	G.L.=16
Mesófilos	F=21,6618 P=0,0000***	F=21,3295 P=0,0000***	F=3,2359 P=0,0003***
Psicrotróficos	F=3,3768 P=0,0257*	F=7,8728 P=0,0000***	F=1,2465 P=0,2557 ^{N.S.}
Bactérias lácticas	F=42,1098 P=0,0000***	F=31,7889 P=0,0000***	F=20,7752 P=0,0000***
<i>Staphylococcus</i> spp.	F=4,7178 P=0,0013**	F=34,7049 P=0,0000***	F=3,5832 P=0,0001***
Enterobactérias	F=6,9041 P=0,0104*	F=153,5923 P=0,0000***	F=2,0296 P=0,0133*
Bolores	F=1,7131 P=0,1496 ^{N.S.}	F=5,6741 P=0,0001***	F=1,4708 P=0,1402 ^{N.S.}
Leveduras	F=1,1666 P=0,3276 ^{N.S.}	F=31,1228 P=0,0000***	F=0,6307 P=0,8138 ^{N.S.}
<i>L. monocytogenes</i>	F=4,2977 P=0,0024**	F=4,0900 P=0,0034**	F=2,2801 P=0,0046**

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

Analisando a Tabela 79 verifica-se que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para as contagens de microrganismos mesófilos e bactérias lácticas, muito significativo ($p < 0,01$) para *Staphylococcus* spp. e *L. monocytogenes*, significativo ($p < 0,05$) para microrganismos psicrotróficos e enterobactérias e não significativo ($p \geq 0,05$) para bolores e leveduras. O fator tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as variáveis, com exceção das contagens de *L. monocytogenes* para o qual foi muito significativo ($p < 0,01$). A interação modalidade x tempo de amostragem foi altamente significativa ($p < 0,001$) para as contagens de microrganismos mesófilos, bactérias lácticas e *Staphylococcus* spp., muito significativa ($p < 0,01$) para *L. monocytogenes*, significativa ($p < 0,05$) para enterobactérias e não significativa ($p \geq 0,05$) para microrganismos psicrotróficos, bolores e leveduras.

Na Tabela 80 são apresentados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paços de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 80 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Parâmetros										
Tempo de amo.	Modalidade	Mesófilos	Psicrotróficos	Bactérias lácticas	<i>Staphylococcus</i> spp.	Enterobactérias	Bolores	Leveduras	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
T0	1	6,58 ^{B,b} ±0,38	6,66 ^{B,b} ±0,41	4,75 ^{C,b} ±0,36	4,55 ^{C,b} ±0,43	5,28 ^{B,b} ±0,50	0,44 ±0,88	4,58 ^A ±0,33	5,00 ^B ±7,07	6
	2	7,66 ^{B,a} ±0,30	7,58 ^a ±0,32	7,84 ^a ±0,41	5,88 ^{A,a} ±0,35	5,66 ^{A,ab} ±0,43	0,50 ±0,84	4,40 ^A ±0,37	20,00 ±34,91	6
	3	7,54 ^{B,a} ±0,37	7,61 ^a ±0,42	7,72 ^{B,a} ±0,49	5,73 ^{A,a} ±0,45	5,54 ^{A,ab} ±0,64	0,84 ±1,31	4,50 ^{AB} ±0,34	8,33 ±7,91	6
	4	7,94 ^a ±0,21	7,93 ^a ±0,21	8,17 ^a ±0,42	6,26 ^{A,a} ±0,41	5,92 ^{A,ab} ±1,00	0,45 ±0,90	4,29 ^{AB} ±0,63	23,88 ±32,86	7
	5	7,97 ^a ±0,49	7,92 ^a ±0,49	8,13 ^a ±0,72	5,80 ^{A,a} ±0,52	6,39 ^{A,a} ±0,94	0,57 ±1,17	4,54 ^{AB} ±0,57	26,67 ±40,23	6
T2	1	7,53 ^{A,b} ±0,70	7,47 ^A ±0,66	7,37 ^B ±0,69	5,41 ^{AB} ±0,66	6,48 ^{A,a} ±0,79	0,74 ±0,93	4,02 ^B ±0,35	145,00 ^{A,a} ±208,73	4
	2	8,07 ^{A,a} ±0,13	7,53 ±0,97	8,09 ±0,25	5,71 ^A ±0,51	5,77 ^{A,ab} ±0,44	1,28 ±1,80	3,84 ^B ±0,14	24,44 ^{ab} ±34,95	5
	3	8,07 ^{A,a} ±0,09	7,40 ±0,99	8,19 ^A ±0,20	5,59 ^{AB} ±0,32	5,70 ^{A,ab} ±0,35	0,11 ±0,33	3,77 ^C ±0,24	7,22 ^b ±10,03	6
	4	7,97 ^{ab} ±0,08	7,23 ±1,07	8,00 ±0,11	6,06 ^A ±0,50	5,46 ^{A,b} ±0,68	0,11 ±0,33	3,92 ^B ±0,25	6,11 ^b ±8,58	5
	5	8,09 ^a ±0,12	7,48 ±1,14	8,20 ±0,18	5,76 ^A ±0,45	6,13 ^{A,ab} ±0,17	0,37 ±0,56	4,08 ^B ±0,50	34,44 ^{ab} ±52,29	4
T12	1	7,76 ^{A,b} ±0,63	7,53 ^A ±0,86	8,14 ^A ±0,33	5,46 ^A ±0,60	5,59 ^{AB} ±0,89	0,94 ±1,50	4,71 ^A ±0,65	40,00 ^{AB,a} ±38,08	6
	2	8,04 ^{A,a} ±0,16	7,93 ±0,21	8,08 ±0,16	5,45 ^A ±0,53	5,02 ^B ±0,39	< 1	4,81 ^A ±0,33	12,78 ^{ab} ±16,60	4
	3	8,05 ^{A,a} ±0,11	7,85 ±0,17	8,11 ^{AB} ±0,11	5,11 ^B ±0,16	5,00 ^A ±0,48	0,22 ±0,67	4,47 ^B ±0,31	8,88 ^{ab} ±10,54	4
	4	8,19 ^{ab} ±0,22	7,65 ±0,99	8,20 ±0,26	5,19 ^B ±0,75	4,80 ^A ±0,91	0,22 ±0,67	4,53 ^{AB} ±0,76	5,55 ^b ±8,46	3
	5	8,25 ^a ±0,25	8,04 ±0,25	8,17 ±0,16	4,88 ^A ±0,70	5,56 ^A ±1,18	< 1	4,85 ^A ±0,50	22,22 ^{ab} ±30,01	5
T25	1	-	-	-	-	4,20 ^C ±0,51	-	-	22,50 ^{AB} ±24,65	5
	2	-	-	-	-	3,35 ^C ±0,81	-	-	4,17 ±6,65	4
	3	-	-	-	-	3,15 ^B ±0,80	-	-	5,83 ±7,36	4
	4	-	-	-	-	2,78 ^B ±1,11	-	-	6,67 ±9,83	3
	5	-	-	-	-	3,00 ^B ±0,96	-	-	12,50 ±28,24	3
TFinal	1	7,83 ^A ±0,30	7,78 ^A ±0,35	7,89 ^{AB} ±0,59	4,66 ^{BC} ±0,69	3,49 ^{C,a} ±0,72	< 1	4,75 ^A ±0,23	15,56 ^{AB,a} ±17,93	ND
	2	8,06 ^A ±0,27	8,13 ±0,54	8,06 ±0,60	4,75 ^B ±0,52	2,71 ^{C,ab} ±0,33	< 1	4,65 ^A ±0,43	<1 ^b	ND
	3	7,96 ^A ±0,34	8,03 ±0,51	8,12 ^{AB} ±0,50	4,33 ^C ±0,63	3,00 ^{B,a} ±0,48	< 1	4,88 ^A ±0,38	1,66 ^a ±2,50	ND
	4	8,27 ±0,59	8,13 ±0,69	8,25 ±0,79	4,67 ^B ±0,86	2,08 ^{B,b} ±0,94	< 1	4,67 ^A ±0,54	1,67 ^a ±5,00	ND
	5	8,08 ±0,38	8,14 ±0,54	8,14 ±0,51	4,69 ^A ±0,85	2,85 ^{B,ab} ±0,31	< 1	4,71 ^{AB} ±0,43	1,11 ^a ±2,20	ND

T0 (pré-enchimento); **T2** (48 h após o enchimento); **T12** (fase intermédia da cura); **T25** (25 dias de cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

Listeria monocytogenes apresenta-se em ufc/g. Os restantes parâmetros contáveis apresentam-se em log ufc/g. Os valores indicados para *Salmonella* spp. referem-se ao número de resultados positivos em 9 amostras.

<1 - Contagens inferiores a uma unidade formadora de colónia por grama (ufc/g).

ND - Não detetado (ausência em 25g).

- Parâmetro não determinado no tempo de amostragem T25.

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A análise da Tabela 80 permite concluir que para as contagens de microrganismos mesófilos foram ligeiramente inferiores no T0 (pré-enchimento), por comparação com os restantes três tempos de amostragem, e em todos os tempos de amostragem a modalidade 1 (controlo) foi a que apresentou o valor médio mais reduzido. Porém, apenas no T0 foi significativamente inferior a todas as modalidades inoculadas, com um valor médio de $6,58 \pm 0,38$ log ufc/g, indo ao encontro do referido por Essid & Assouna (2013) e Zhao *et al.* (2011) que referiram ser comum as contagens de microrganismos mesófilos, bactérias lácticas e *Staphylococcus* serem superiores nas fases iniciais da cura, depois da inoculação com culturas de arranque.

Para as contagens de microrganismos psicotróficos, ao longo do processo produtivo, também não se observaram diferenças muito evidentes entre modalidades. A par do discutido para mesófilos, os valores médios dos paios não inoculados apresentaram sempre valores médios inferiores aos inoculados e neste ensaio as contagens de microrganismos psicotróficos, no produto acabado, foram semelhantes às de microrganismos mesófilos (próximas de 8,0 log ufc/g).

Para as contagens de bactérias lácticas também não existiram diferenças muito evidentes ao longo do processo produtivo. No T0 foram, mais uma vez, aos paios controlo a apresentarem um valor médio ($4,75 \pm 0,36$ log ufc/g) significativamente inferior, cabendo o valor médio ($8,17 \pm 0,42$ log ufc/g) mais elevado aos paios inoculados com *S. xylosus* CECT7057 10^8 e *L. sakei* CECT7056 10^8 (modalidade 4). No presente ensaio, ao contrário do anterior em que inoculámos culturas mistas e do ensaio em que inoculámos culturas puras de *Lactobacillus*, as contagens parecem refletir os valores por nós inoculados (T0), isto é, próximos dos 8 log ufc/g, mostrando que as estirpes de *Lactobacillus* inoculadas se adaptaram bem às condições existentes nas massas dos paios de porco preto e às temperaturas baixas a que estiveram sujeitas durante as 72 horas de maturação. Os valores médios mantiveram-se praticamente constantes do T0 até ao produto acabado para os enchidos inoculados e, no produto

acabado, apesar de não existirem diferenças significativas entre modalidades, a modalidade que apresentou o valor médio inferior voltou a ser a não inoculada, cujo valor obtido foi de $7,89 \pm 0,59$ log ufc/g. Ao contrário do por nós observado, Banón *et al.* (2014) e Simion *et al.* (2014) observaram variações nas contagens de bactérias lácticas ao longo do processo produtivo.

Para as contagens de *Staphylococcus* spp. verificou-se uma redução da concentração principalmente no produto acabado, em relação aos tempos que lhe precederam. No que concerne à análise por tempos de amostragem, verificamos que no T0 a modalidade não inoculada, com um valor médio de $4,55 \pm 0,43$ log ufc/g, foi significativamente inferior às modalidades inoculadas. Nos restantes tempos de amostragem não existiram diferenças significativas entre modalidades. No T0, para os paios inoculados, os valores médios rondaram os 6 log ufc/g, quando tínhamos inoculado aproximadamente 8 log ufc/g. Como havíamos referido na análise e discussão referente às inoculações com culturas puras de *Staphylococcus*, provavelmente as temperaturas reduzidas e os valores de pH poderão ter tornado o meio adverso às estirpes de *Staphylococcus*, com conseqüente perda de viabilidade microbiana. No produto acabado, observaram-se contagens inferiores aos tempos que lhe antecederam, algo que também foi observado por Lorenzo *et al.* (2014), Essid & Assouna (2013) e Zhao *et al.* (2011) que apontarem como possíveis causas a menor capacidade de competirem com bactérias lácticas associada ao abaixamento do pH (produção de ácido).

Para as contagens de enterobactérias observaram-se diferenças ao longo do processo produtivo, com uma redução da concentração a ocorrer de forma paulatina à medida que a cura foi decorrendo. Os valores médios obtidos no T25 (25 dias de cura) e produto acabado foram significativamente inferiores aos que lhe antecederam. No que respeita à análise isolada de cada tempo de amostragem, o mais relevante foi o facto de, com exceção do T0, em todos os momentos de amostragem os paios não inoculados apresentarem contagens mais elevadas deste grupo bacteriano. O mais relevante, em termos estatísticos, terá sido, no produto acabado, os enchidos inoculados com modalidade 4 (estirpes patenteadas) terem apresentado um valor médio ($2,08 \pm 0,94$ log ufc/g) significativamente mais reduzido que os da modalidade não inoculada ($3,49 \pm 0,72$ log ufc/g).

Nada de relevante há a referir para as contagens de leveduras, apenas o facto de não terem existido diferenças muito evidente ao longo do processo produtivo e dos paios alocados às modalidades 3 e 5 (inóculo com levedura 2RB4 10^6) não se terem destacado (maior concentração) em relação às restantes modalidades, apesar das mesmas ter sido inoculadas na concentração aproximada de 10^6 células g/de massa os valores mantiveram-se próximos dos 4,5 log ufc/g. Andrade *et al.* (2010) produziram *salchichón* espanhol inoculado com diversas estirpes de *D. hansenii*, na concentração aproximada de 10^6 células/g de massa e adicionaram dextrina, dextrose e lactose, mas não referem as

percentagens porque os açúcares vinham preparados num *mix* comercial. Os autores obtiveram valores relativamente constantes - 3,0 log ufc/g a 6,0 log ufc/g - ao longo de todo o processo produtivo. De destacar que as concentrações menores couberam sempre aos enchidos controlo no estudo executado pelos autores citados e no início da cura contaram leveduras de 5,0 log ufc/g a 6,0 log ufc/g, indo ao encontro das concentrações inoculadas.

Para as contagens de *L. monocytogenes*, de uma forma geral, observou-se uma redução da concentração à medida que o processo produtivo avançou. Nos tempos T0, e T25 não se observaram diferenças significativas entre modalidades. De referir que no T2 (48 horas após o enchimento na antecâmara do fumeiro) os paios controlo apresentaram um valor médio (145,00 ± 208,73 ufc/g) tendencialmente mais elevado que os inoculados. No produto acabado, os paios controlo apresentaram um valor médio (15,56 ± 17,93 ufc/g) que se manteve mais elevado que os inoculados, e os únicos a apresentarem um valor (<1 ufc/g) inferior ao limite de deteção do método foram os alocados à modalidade 2, para o qual a modalidade controlo foi significativamente mais elevada. É de referir que, no produto acabado, os valores foram inferiores aos indicados na legislação vigente (100 ufc/g, segundo o Reg. 1441/2007) para alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitirem o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos.

Salmonella spp. foi positiva para todas as modalidades até ao T25, todavia, no produto acabado não foi detetada em nenhuma amostra.

Não esquecendo que as matérias-primas foram provenientes de lotes de porco preto distintos e que, apesar de tentarmos manter as condições de processamento o mais semelhantes possível, há sempre variações, por comparação com os resultados obtidos nas inoculações sem as estirpes patenteadas e com a concentração aproximada de 10⁶ células/g, verificamos que no produto acabado, o incremento da concentração para 10⁸ células/g parece ter tido efeito sobre *Salmonella* spp., uma vez que nos paios inoculados com *S. equorum* S2M7 10⁶ e *L. sakei* CV3C2 10⁶ a bactéria aludida esteve presente, porém, neste ensaio essa situação não se verificou. Todavia, nos controlo também não. Também foram os paios alocados à modalidade aludida que apresentaram contagens inferiores (<1 ufc/g) ao limiar de deteção do método para *L. monocytogenes*, o que também não se tinha verificado no primeiro ensaio com as mesmas culturas, mas com a concentração inoculada de 10⁶ células g/de massa. Desde o T2 (48 horas após o enchimento) até ao produto acabado os paios inoculados apresentaram contagens sempre inferiores para *L. monocytogenes*.

As estirpes patenteadas, além de uma ligeira redução nas contagens de enterobactérias, não evidenciaram nenhuma mais-valia por comparação com as habitualmente inoculadas.

5.3.2.3. Determinação de aminas biogénicas

Na Tabela 81 mostra-se a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Tabela 81 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Triptamina	F=8,2227 P=0,0003***
β -feniletilamina	F=1,3458 P=0,2616 ^{N.S.}
Putrescina	F=1,1579 P=0,3153 ^{N.S.}
Cadaverina	F=1,2423 P=0,2900 ^{N.S.}
Histamina	F=19,2557 P=0,0000***
Tiramina	F=13,7503 P=0,0000***
Espermidina	F=3,2422 P=0,0402*
Espermina	F=13,1703 P=0,0000***
Aminas vasoativas	F=8,7611 P=0,0002***
Total de aminas	F=3,9341 P=0,0022**

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

A observação da Tabela 81 permite inferir que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para triptamina, histamina, tiramina, espermina e aminas vasoativas, muito significativo ($p < 0,01$) para o total de aminas, significativo ($p < 0,05$) para espermidina e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis em estudo.

A análise de variância das aminas biogénicas segue a tendência observada para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Na Tabela 82 apresenta-se a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 82 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis (mg/kg de enchido)	Fatores		
	Modalidade G.L.=4	Tempo de amostragem G.L.=3	Modalidade x Tempo de amostragem G.L.=12
Triptamina	F=0,4241 P=0,7912 ^{N.S.}	F=98,3596 P=0,0000***	F=0,7462 P=0,7062 ^{N.S.}
β-feniletilamina	F=6,2149 P=0,0001***	F=23,1256 P=0,0000***	F=3,2407 P=0,0002***
Putrescina	F=175,7514 P=0,0000***	F=252,0558 P=0,0000***	F=66,5538 P=0,0000***
Cadaverina	F=36,6070 P=0,0000***	F=439,0101 P=0,0000***	F=12,9410 P=0,0000***
Histamina	F=35,2906 P=0,0000***	F=37,7803 P=0,0000***	F=7,5276 P=0,0000***
Tiramina	F=0,1739 P=0,1028 ^{N.S.}	F=25,5135 P=0,0000***	F=1,5562 P=0,1028 ^{N.S.}
Espermidina	F=1,3038 P=0,2683 ^{N.S.}	F=62,8624 P=0,0000***	F=1,6069 P=0,0878 ^{N.S.}
Espermina	F=4,5730 P=0,0013**	F=157,9053 P=0,0000***	F=1,2003 P=0,2812 ^{N.S.}
Aminas vasoativas	F=0,2246 P=0,9246 ^{N.S.}	F=106,8925 P=0,0000***	F=0,6873 P=0,7638 ^{N.S.}
Total de aminas	F=5,5361 P=0,0003***	F=249,4626 P=0,0000***	F=3,9139 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; **Significativo para $p < 0,01$; ***Significativo para $p < 0,001$

A observação da Tabela 82 permite verificar que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para os teores de β-feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e total de aminas, muito significativo ($p < 0,01$) para espermina e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis. O tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as aminas estudadas e a interação entre ambos os fatores foi altamente significativa ($p < 0,001$) para os teores de β-feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e teores totais de aminas e não foi significativa ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis estudadas.

Na Tabela 83 são mostrados os valores médios e desvios padrão para as aminas biogénicas obtidos nos paços de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 83 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Parâmetros (mg/kg de enchido)											
Tempo de amostragem	Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Aminasvascoativas	Totaldeaminas
T0	1	18,66 ^B ±12,45	10,84 ^{A,a} ±10,45	6,65 ^C ±0,62	9,89 ^{D,ab} ±1,91	ND ^{B,b}	2,17 ^A ±0,73	12,94 ^B ±4,03	47,69 ^{C,b} ±7,32	31,67 ^B ±10,98	108,83 ^{C,b} ±14,50
	2	33,49 ^B ±14,35	3,86 ^{B,b} ±1,12	5,86 ^C ±1,52	10,68 ^{D,ab} ±4,30	3,67 ^{B,a} ±6,35	1,58 ±0,74	10,63 ^B ±5,06	51,39 ^{C,ab} ±18,01	42,61 ^B ±15,74	121,17 ^{C,ab} ±35,03
	3	29,07 ^B ±14,30	5,57 ^{B,b} ±3,37	6,34 ^C ±0,33	11,89 ^{D,a} ±10,50	3,21 ^{B,ab} ±4,72	1,76 ^A ±0,88	13,10 ^B ±3,50	52,78 ^{B,ab} ±9,81	39,61 ^B ±11,44	123,72 ^{B,ab} ±19,44
	4	44,62 ^B ±23,75	5,27 ^{BC,b} ±3,50	6,23 ^C ±0,75	9,27 ^{B,b} ±2,55	ND ^{B,b}	1,65 ^A ±0,79	12,71 ^B ±3,96	53,46 ^{C,ab} ±10,86	51,54 ^B ±26,61	133,22 ^{B,a} ±28,69
	5	34,47 ^B ±17,26	4,46 ^{C,b} ±0,59	6,39 ^B ±0,66	10,36 ^{D,ab} ±2,14	ND ^{B,b}	2,09 ^A ±1,03	14,11 ^B ±4,04	60,80 ^{B,a} ±14,41	41,02 ^B ±17,94	132,69 ^{B,ab} ±26,07
T2	1	32,41 ^B ±23,55	5,06 ^B ±1,74	10,02 ^{C,a} ±4,50	54,39 ^{C,a} ±7,45	ND ^{B,b}	0,75 ^C ±0,55	9,19 ^B ±3,98	62,80 ^B ±7,45	38,22 ^B ±23,66	174,62 ^{B,ab} ±29,93
	2	31,20 ^B ±31,18	5,03 ^B ±1,90	7,62 ^{BC,ab} ±2,04	36,36 ^{C,b} ±12,30	8,83 ^{B,a} ±8,82	0,97 ±0,67	10,87 ^B ±3,82	64,72 ^B ±9,68	46,02 ^B ±38,75	165,60 ^{B,ab} ±32,54
	3	43,16 ^B ±39,40	4,68 ^B ±1,19	7,89 ^{BC,ab} ±1,93	37,78 ^{C,b} ±10,50	10,54 ^{B,a} ±8,54	0,93 ^B ±0,67	13,75 ^B ±6,41	61,90 ^B ±7,87	59,31 ^B ±47,09	180,63 ^{B,a} ±35,94
	4	37,49 ^B ±46,19	4,13 ^{BC} ±0,62	6,61 ^{C,b} ±0,64	23,51 ^{B,c} ±8,44	ND ^{B,b}	0,92 ^B ±0,77	12,24 ^B ±4,72	60,57 ^C ±6,17	42,53 ^B ±47,15	145,47 ^{B,b} ±42,12
	5	42,08 ^B ±41,94	4,32 ^C ±0,49	8,98 ^{B,ab} ±3,15	35,81 ^{C,b} ±15,13	ND ^{B,b}	0,96 ^B ±0,75	11,32 ^B ±6,00	60,99 ^B ±8,36	47,37 ^B ±42,71	164,46 ^{d,ab} ±45,58
T12	1	219,86 ^A ±218,19	9,77 ^{AB,a} ±2,14	79,61 ^{B,a} ±21,44	100,45 ^{B,a} ±9,19	ND ^{B,b}	1,35 ^B ±0,39	19,65 ^A ±3,23	74,65 ^B ±20,45	230,97 ^A ±218,17	505,32 ^B ±345,47
	2	192,35 ^A ±189,78	7,49 ^{A,b} ±2,78	13,11 ^{B,bc} ±5,14	56,25 ^{B,b} ±15,94	6,91 ^{B,a} ±9,56	1,25 ±0,77	19,24 ^A ±3,39	78,63 ^B ±20,51	208,00 ^A ±187,70	375,33 ^B ±199,30
	3	242,02 ^A ±156,04	8,31 ^{A,b} ±3,83	11,83 ^{B,bc} ±2,48	82,82 ^{B,b} ±7,69	5,93 ^{B,a} ±8,69	1,18 ^{AB} ±0,77	21,55 ^A ±3,89	81,02 ^A ±19,24	257,44 ^A ±154,26	454,66 ^A ±164,28
	4	261,65 ^A ±84,50	7,49 ^{A,b} ±2,83	10,76 ^{B,c} ±1,51	71,78 ^{A,b} ±14,67	ND ^{B,b}	0,95 ^B ±0,63	19,57 ^A ±5,75	82,26 ^B ±17,13	270,10 ^A ±85,59	454,46 ^A ±94,87
	5	230,66 ^A ±236,89	9,49 ^{A,b} ±2,79	39,13 ^{A,a} ±22,76	69,75 ^{B,b} ±30,27	ND ^{B,b}	0,89 ^B ±0,73	19,63 ^A ±5,53	92,38 ^A ±16,15	241,04 ^A ±237,82	461,93 ^A ±273,00

Tabela 83 (continuação) - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Parâmetros (mg/kg de enchido)											
Tempo de amostragem	Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Aminas vasoativas	Total de aminas
TFinal	1	269,77 ^A ±131,28	7,02 ^{AB} ±1,86	149,61 ^{A,a} ±33,01	191,75 ^{A,a} ±98,35	1,37 ^{A,b} ±2,10	0,95 ^{BC} ±0,85	19,56 ^A ±6,67	91,91 ^A ±14,93	279,11 ^A ±131,94	731,95 ^{A,a} ±206,23
	2	224,96 ^A ±57,06	7,02 ^A ±2,63	29,89 ^{A,bc} ±13,22	118,59 ^{A,bc} ±32,70	31,58 ^{A,a} ±23,97	1,47 ±0,85	19,04 ^A ±6,40	101,41 ^A ±19,54	265,03 ^A ±59,50	533,96 ^{A,b} ±63,65
	3	196,65 ^A ±116,26	6,75 ^{AB} ±2,17	33,63 ^{A,bc} ±11,19	102,29 ^{A,bc} ±34,86	29,99 ^{A,a} ±25,91	1,28 ^{AB} ±0,81	16,47 ^A ±7,12	90,98 ^A ±16,07	234,66 ^A ±110,36	478,03 ^{A,b} ±156,31
	4	221,71 ^A ±47,98	6,80 ^{AB} ±1,13	13,13 ^{A,cb} ±1,72	82,00 ^{A,c} ±18,05	5,22 ^{A,b} ±6,16	1,38 ^{AB} ±0,81	22,17 ^A ±7,53	100,17 ^A ±20,56	235,10 ^A ±48,68	452,58 ^{A,b} ±55,11
	5	198,98 ^A ±85,30	7,42 ^B ±2,21	47,35 ^{A,a} ±35,22	128,44 ^{A,b} ±45,48	3,59 ^{A,b} ±4,75	1,26 ^B ±0,77	19,71 ^A ±6,88	103,73 ^A ±18,86	211,24 ^A ±84,66	510,47 ^{A,b} ±114,85

T0 (pré-enchimento); **T2** (48 h após o enchimento); **T12** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina.

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

ND - Não detetado

A análise da Tabela 83 permite concluir que, com exceção de β -feniletilamina e tiramina, de uma forma geral, os teores de amins biogénicas sofreram um incremento à medida que a cura se foi consumando, indo ao encontro do evidenciado por Xie *et al.* (2015), Stadnik & Dolatowski (2010), Lu *et al.* (2010) e Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmonero (2004). Relembramos que no ensaio anteriormente analisado e discutido, também com a inoculação de culturas mistas, os teores por nós determinados, de uma forma geral, foram-se minorando. O facto da descarboxilação estar dependente de múltiplos fatores que se vão modificando à medida que a cura vai decorrendo, cria, inevitavelmente, variações nos teores de amins biogénicas.

A histamina não foi detetada em alguns enchidos e tempos de amostragem, porém, no produto acabado todas as modalidades apresentaram teores detetáveis, mas foram os paios controlo que apresentaram o valor médio ($1,37 \pm 2,10$ mg/kg) mais reduzido - apesar de não ser significativo para as modalidades 4 e 5 - e os enchidos inoculados com as modalidades 2 e 3 que apresentaram concentrações significativamente mais elevadas ($31,58 \pm 23,97$ mg/kg e $29,99 \pm 25,91$ mg/kg, respetivamente).

A tiramina apresentou teores baixos ao longo de todo o processo produtivo, notando-se uma muito ligeira redução do T2 (48 horas após o enchimento na antecâmara do fumeiro) em diante para algumas modalidades. No produto acabado não existiram diferenças entre modalidades de inoculação, todavia, foram os paios não inoculados que voltaram a apresentar teores ($0,95 \pm 0,85$ mg/kg) ligeiramente inferiores. Talvez porque, como já referimos várias vezes e em vários pontos deste trabalho, tiramina resulta da ação descarboxilativa das bactérias lácticas (incluindo *Lactobacillus* e *Enterococcus*) e mais raramente de ECN (Vidal-Carou *et al.*, 2015; Aymerich *et al.*, 2006; Suzzi & Gardini *et al.*, 2003).

Neste ensaio entre as poliaminas naturais, mais uma vez, os teores de espermina foram bastante superiores aos de espermidina.

Para o grupo das amins vasoativas (triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina) existiram diferenças significativas entre os T0 e T2 e T12 e o produto acabado, cabendo aos últimos tempos de amostragem valores médios significativamente mais elevados. Porém, entre modalidades não se observaram diferenças em nenhum dos quatro tempos de amostragem. Todavia, no produto acabado, o valor médio ($279,11 \pm 131,94$ mg/kg) mais elevado coube aos paios controlo.

Para o total de amins presentes nos paios, o mais importante prende-se com o facto de a partir da fase intermédia da cura (T12) os paios controlo apresentarem concentrações, sem significado estatístico, mais elevadas para os teores totais de amins biogénicas. No produto acabado as estirpes

mostraram ter um efeito sobre a redução dos teores de amins biogénicas, teores esses que foram significativamente inferiores aos dos paios controlo, que apresentaram uma concentração de $731,95 \pm 206,23$ mg/kg, enquanto as concentrações dos paios inoculados se situaram entre $452,58 \pm 55,11$ mg/kg e $533,96 \pm 63,65$ mg/kg, destacando-se pela positiva os paios inoculados com *S. xyloso* CECT7057 10^8 e *L. sakei* CECT7056 10^8 (modalidade 4).

Dos ensaios que envolveram os paios de porco preto este foi aquele onde obtivemos os teores de amins biogénicas mais reduzidos. Tendo em conta o facto de muitos autores apontarem enterobactérias, bactérias lácticas e até ECN (em menor grau) como tendo capacidade para incrementar a aminogénese (Mainar *et al.*, 2017; Latorre-Moratalla *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2006; Suzzi & Gardini, 2003), verificámos que neste caso essa conclusão não foi linear, porque quantificámos concentrações ligeiramente superiores do primeiro grupo microbiano e semelhantes para bactérias lácticas aos obtidos no primeiro ensaio com culturas mistas, mas com concentrações 10^6 células/g de massa, e no ensaio com *Lactobacillus* e ligeiramente superiores aos obtidos quando inoculámos culturas puras de *Staphylococcus*. Mais uma vez, a heterogeneidade evidenciada nestes resultados não é inédita, tendo sido reportada por vários autores (Papavergou *et al.*, 2012; Roseiro *et al.*, 2010), o que vai de encontro ao que também já escrevemos neste trabalho, isto é, a microbiota (incluindo, obviamente, as culturas de arranque) e a qualidade das matérias-primas são primordiais, todavia, fatores como o pH, temperatura, utilização de aditivos, diâmetro dos enchidos, entre outros, podem igualmente influenciar os teores daqueles compostos.

É de salientar que as amins que apresentaram teores mais elevados no produto acabado, por ordem decrescente, foram triptamina, cadaverina, espermina e putrescina. Em sentido oposto surgiram tiramina e histamina. Relembramos que muitos autores apontam a tiramina como a amina que maiores concentrações apresentou nos estudos por eles executados (Latorre-Moratalla *et al.*, 2017; Simion *et al.*, 2014; Papavergou, 2011; Kameník *et al.*, 2012; Talon *et al.*, 2008). Kurt & Zorba (2010) e Suzzi & Cardini (2003) verificaram que a produção de β -feniletilamina muitas vezes está associada a teores elevados de tiramina e como neste caso os teores de tiramina foram reduzidos parece que o descrito pelos autores se aplica. Latorre-Moratalla *et al.* (2017) e Vidal-Carou *et al.* (2015) referem que tiramina, histamina e β -feniletilamina, ainda que em menor grau, são as principais responsáveis por efeitos adversos nos consumidores, neste estudo, as três amins referidas foram das amins que apresentaram teores mais reduzidos, o que é bastante positivo em termos de segurança alimentar.

A triptamina também tinha apresentado concentrações elevadas nos paios inoculados com culturas puras de *Lactobacillus*. Como havíamos referido na análise e discussão dos resultados obtidos no ensaio onde foram inoculadas culturas puras de *Lactobacillus*, Laranjo *et al.* (2016) e Claro (2009)

identificaram teores elevados de triptamina, mas, mais uma vez referimos que não há uma razão aparente para tal ter sucedido. Até porque Vidal-Carou *et al.* (2015) referem que triptamina e β -feniletilamina, de uma forma geral, apresentam teores relativamente baixos e Vidal-Carou *et al.* (2007) indicam que sua acumulação parece dependente da ocorrência de altos teores de tiramina associados a algumas estirpes de bactérias lácticas ou ECN, porém, Vidal-Carou *et al.* (2015) acrescentam que a ocorrência de triptamina também poderá estar associada a diaminas (putrescina e/ou cadaverina) o que também não nos parece muito linear no corrente ensaio.

O conjunto das aminas vasoativas, no produto acabado, apresentou valores superiores a 200 mg/kg, principalmente pelo contributo da triptamina, mas inferiores a 1000 mg/kg para o somatório dos teores deste composto. O primeiro valor, como já foi sobejamente referido, fica acima do recomendado, todavia, os teores totais podem ser considerados bastante aceitáveis, isto se tivermos em conta os resultados obtidos por Roseiro *et al.* (2010); Claro (2009) e Roseiro *et al.* (2006) que não inocularam culturas de arranque nos enchidos Alentejanos que produziram.

Na Tabela 84 apresenta-se a percentagem de redução de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paíes controlo e os inoculados.

Tabela 84 - Percentagem de redução de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os paíes controlo e os inoculados.

Modalidade	% de Redução									
	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Aminas vasoativas	Totalde aminas
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	16,61	=	80,02	38,15	NR	NR	2,66	NR	5,05	27,05
3	27,11	3,85	77,52	46,65	NR	NR	15,80	1,01	15,93	34,69
4	17,82	3,13	91,22	57,24	NR	NR	NR	NR	15,77	38,17
5	26,24	NR	68,35	33,01	NR	NR	NR	NR	24,32	30,26

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g); 4 - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g); 5 - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina.

NR - Não ocorreu redução

= - Valor médio igual ao do controlo com dextrose

As inoculações não promoveram redução dos teores de histamina e tiramina, porém, para as restantes aminas pelo menos uma das modalidades promoveu a dita redução.

Ressalvamos que as estirpes conseguiram promover uma redução de cadaverina entre 33,01% e 57,24%, mas para putrescina os valores atingiram os 91,22% e o menor valor foi de 68,35% o que nos

parece bastante considerável. Sendo reduções que vão ao encontro das obtidas por Casquete *et al.* (2011b) e Gücükoglu & Küplülü (2010).

A cultura mistas *S. xylosus* CECT7057 10⁸ e *L. sakei* CECT7056 10⁸ (modalidade 4) foi aquela que promoveu a maior redução, isto se tivermos em conta os valores médios de putrescina, cadaverina e os valores totais, relembramos que a modalidade referida foi composta pelas estirpes patenteadas e que já tinham tido um efeito melhorador noutros estudos para parâmetros físico-químicos, microbiológicos e redução dos teores de amins biogénicas.

Para o conjunto das amins vasoativas também foram as estirpes patenteadas, mas apenas da levedura 2RB4, a mostrar o efeito mais notório na redução daqueles compostos.

As percentagens globais de redução dos teores de amins biogénicas foram as mais elevadas por comparação com todas as que lhes antecederam, isto é, nos ensaios com culturas puras de *Staphylococcus*, *Lactobacillus* e culturas mistas, mas sem a inoculação das estirpes patenteadas e também com concentrações inferiores às inoculadas neste ensaio. Provavelmente, o facto das estirpes terem sido inoculadas numa concentração superior (10⁸ células/g de massa) promoveu uma redução a atividade aminogénica, resultante da competição entre as culturas inoculadas e as estirpes microbianas presentes naturalmente nas matérias-primas e no ambiente da fábrica do Alentejo.

5.3.2.4. Parâmetros da cor

Na Tabela 85 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Tabela 85 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
L*	F=10,3990 P=0,0000***
a*	F=3,7030 P=0,0262*
b*	F=15,4494 P=0,0000***
C*	F=10,9762 P=0,0000***
H°	F=11,2749 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: * Significativo para p<0,05; ***Significativo para p<0,001

Analisando a Tabela 85 infere-se que o fator lote foi altamente significativo (p<0,001) para todos as variáveis estudadas, com exceção de a* para qual foi apenas significativo (p<0,05).

O acima indicado segue o padrão habitual para a maioria dos parâmetros e ensaios realizados até ao momento, apesar das modalidades e as condições de cura serem idênticas, o facto dos lotes terem sido produzidos em datas diferentes e com matérias-primas distintas poderá originar aquele tipo de variância.

Na Tabela 86 apresenta-se a análise de variância para os parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Tabela 86 - Análise de variância para os parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
L*	F=0,4193 P=0,7946 ^{N.S.}
a*	F=1,5985 P=0,1757 ^{N.S.}
b*	F=1,9954 P=0,0962 ^{N.S.}
C*	F=1,3399 P=0,2561 ^{N.S.}
H°	F=3,6771 P=0,0064**

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ** Significativo para p<0,01

A análise da Tabela 86 permite concluir que o fator modalidade foi muito significativo (p<0,01) para o parâmetro H° e não significativo (p≥0,05) para as restantes variáveis.

Na Tabela 87 são apresentados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 87 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros				
		L*	a*	b*	C*	H°
T _{Final} (produto acabado)	1	37,80±4,09	14,59±2,97	14,18±4,57	20,43±5,11	43,44 ^a ±5,37
	2	37,10±4,52	13,62±2,12	12,53±3,09	18,61±3,19	42,17 ^{ab} ±6,19
	3	37,35±4,31	14,50±2,47	13,62±3,43	20,00±3,75	42,79 ^{ab} ±5,62
	4	36,96±2,66	14,69±2,53	12,41±2,77	19,30±3,40	39,92 ^b ±4,67
	5	36,82±4,08	13,74±3,19	13,46±3,80	19,35±4,49	44,11 ^a ±6,12

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g); 4 - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g); 5 - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g).

Na mesma coluna, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

Os resultados apresentados na Tabela 87 permitem inferir que apenas o parâmetro H° apresentou diferenças significativas entre modalidades. Os paios alocados às modalidades 1 (controle) e 5 (*S. xylosus* CECT7057 10⁸, *L. sakei* CECT7056 10⁸ e levedura 2RB4 10⁶) apresentaram valores médios (43,44 ± 5,37 e 44,11 ± 6,12, respetivamente) significativamente mais elevados que os da modalidade 4 (*S. xylosus* CECT7057 10⁸ e *L. sakei* CECT7056 10⁸), cujo valor médio foi de 39,92 ± 4,67, isto significa que os paios alocados à modalidade 4 apresentaram tonalidades mais vermelhas que os associados às outras modalidades mencionadas.

Os resultados apresentados indicam que o efeito das estirpes, ao nível estatístico, apenas se fez sentir sobre o parâmetro H° e que a modalidade 4 parece ter tido um efeito positivo na fixação da cor vermelha dos paios. Os paios alocados às estirpes patenteadas também foram ligeiramente mais escuros (< L*) que os restantes.

Por outro lado, Bañón *et al.* (2014) obtiveram valores médios de L* e C* semelhantes para salames controle e inoculados, enquanto o H° médio foi menor nos primeiros. Significa, portanto, que os salames inoculados apresentaram uma tonalidade mais vermelha amarelada (C* semelhante e maior H°) que os controle. Diferentes valores de H° foram relatados em salame, em função dos tipos de culturas de arranque inoculados (Bedia *et al.*, 2011; Casquete *et al.*, 2011; Gøtterup *et al.*, 2008), no entanto, como já foi referido ao longo do presente trabalho, os valores dos parâmetros da cor dos enchidos podem variar amplamente, dependendo de fatores como adição de ingredientes com capacidade corante, pigmentação muscular, gordura, nitrato/nitrito, humidade, entre outros. Por exemplo, Bedia *et al.* (2012) adicionaram *Ponceau vermelho 4R* - corante vermelho - em salames e a consequência foi um incremento da cor vermelha amarelada bastante estável, o que pode explicar a estabilização de C* observada durante o processo de cura. A taxa de formação de nitrosilmoglobina aumenta exponencialmente no início da cura como resultado da atividade nitrato-redutora de *Staphylococcus* e outras bactérias, e está associada a um aumento dos valores de C* em enchidos (Gøtterup *et al.*, 2008). Porém, Pérez-Alvarez *et al.* (1999) indicam que os valores médios de C* podem regredir à medida que o processo vai de cura vai evoluindo, devido ao ácido láctico presente nos diferentes estados da mioglobina.

5.3.2.5. Parâmetros reológicos

Na Tabela 88 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Tabela 88 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Dureza (N)	F=7,4797 P=0,0007***
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=21,1056 P=0,0000***
Coesividade	F=2,3542 P=0,0974 ^{N.S.}
Elasticidade	F=9,9862 P=0,0000***
Resiliência	F=2,0778 P=0,1276 ^{N.S.}
Mastigabilidade (N)	F=13,5877 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *** Significativo para p<0,001

Observando a Tabela 88 conclui-se que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para dureza, adesividade, elasticidade e mastigabilidade e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

Os parâmetros reológicos dependem em grande parte dos parâmetros físico-químicos e da microbiota, como tal, seguem a tendência obtida para aqueles parâmetros.

Na Tabela 89 mostra-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Tabela 89 - Análise de variância para resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Dureza (N)	F=2,0906 P=0,0830 ^{N.S.}
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=2,6623 P=0,0335*
Coesividade	F=2,7559 P=0,0288*
Elasticidade	F=1,0582 P=0,3781 ^{N.S.}
Resiliência	F=2,9576 P=0,0208*
Mastigabilidade (N)	F=2,7295 P=0,2901 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para p<0,05

Analisando a Tabela 89 verifica-se que o fator modalidade foi significativo ($p < 0,05$) para adesividade, coesividade e resiliência e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis.

Na Tabela 90 estão apresentados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 90 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

T_{Final} (produto acabado)					
Modalidade					
Parâmetros	1	2	3	4	5
Dureza (N)	39,025±11,67	44,446±9,724	42,188±14,842	45,221±12,655	40,556±10,633
Adesividade (N.s⁻¹)	- 1,685 ^{ab} ±1,282	- 2,228 ^a ±1,557	- 2,037 ^{ab} ±1,325	- 1,641 ^{ab} ±1,201	- 1,484 ^b ±0,841
Coesividade	0,587 ^{ab} ±0,083	0,599 ^a ±0,047	0,570 ^{ab} ±0,047	0,566 ^b ±0,051	0,571 ^{ab} ±0,046
Elasticidade	0,858±0,186	0,904±0,262	0,840±0,070	0,930±0,324	0,893±0,248
Resiliência	0,135 ^a ±0,032	0,133 ^{ab} ±0,019	0,124 ^{ab} ±0,023	0,121 ^b ±0,021	0,126 ^{ab} ±0,022
Mastigabilidade (N)	20,016±9,241	23,957±7,857	20,369±8,244	23,885±10,971	19,970±4,916

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

A análise da Tabela 90 permite concluir que existiram diferenças significativas para os parâmetros adesividade, coesividade e resiliência. Relativamente ao primeiro parâmetro, observou-se que os paios inoculados com a modalidade 2 (*S. equorum* S2M7 10⁸ e *L. CV3C2* 10⁸) foram significativamente (-2,228 ± 1,557 N.s⁻¹) mais adesivos que os alocados à modalidade 5 (*S. xylosus* CECT7057 10⁸, *L. sakei* CECT7056 10⁸ e levedura 2RB4 10⁶) que apresentaram um valor médio de - 1,484 ± 0,841 N.s⁻¹. Os paios alocados à modalidade 2 também foram significativamente (0,599 ± 0,047) mais coesos que os alocados à modalidade 4 (*S. xylosus* CECT7057 10⁸ e *L. sakei* CECT7056 10⁸), que apresentaram o valor médio 0,566 ± 0,051.

No que concerne à resiliência, os paios não inoculados apresentaram um valor médio (0,135 ± 0,032) significativamente mais elevado que os inoculados com a modalidade 4 (0,121 ± 0,021).

Neste ensaio, por comparação com o anterior em que usámos concentrações distintas e não recorremos às estirpes patenteadas, os paios foram menos duros, menos adesivos e também apresentaram valores inferiores para a mastigabilidade; o que seria natural visto a mastigabilidade resultar da multiplicação dos valores da dureza pelos da coesividade e elasticidade. Como os valores de dureza foram, de uma forma geral, menores em 10 N, foi este o parâmetro que influenciou mais os valores da mastigabilidade.

Este foi o ensaio onde os valores médios para dureza foram inferiores, por comparação com os ensaios que lhe antecederam. Como havíamos referido na análise e discussão de resultados referentes aos parâmetros de textura obtidos nos ensaios que antecederam este, são inúmeros os fatores que podem influir sobre a textura dos enchidos. No entanto, a redução da humidade, os valores de pH, concentração de sal e os processos de desnaturação proteica e proteólise são dos mais relevantes. Para além da dureza - parâmetro de extrema importância para o consumidor -, este também foi o ensaio onde os teores de aminos biogénicas foram mais reduzidos no produto acabado. Uma hipótese para os valores de dureza serem mais reduzidos poderá estar associada à proteólise menos extensa, até porque os valores médios obtidos para o pH e a_w são semelhantes aos obtidos nos ensaios anteriores e as formulações foram iguais para todos os ensaios levados a cabo na empresa do Alentejo, todavia, não temos forma de confirmar esta hipótese porque não efetuámos determinações que nos permitam tirar conclusões sobre esta temática. No entanto, proteólises mais extensas poderão contribuir para aumentar os teores de aminos biogénicas e, efetivamente, no presente ensaio os valores médios das mesmas, no produto acabado, foram inferiores aos obtidos nos ensaios anteriores, podendo indicar menor extensão da proteólise.

5.3.2.6. Análise sensorial

Na Tabela 91 pode observar-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da análise sensorial, considerando o fator lote.

Tabela 91 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Intensidade da cor	F=4,9328 P=0,0080**
Cores estranhas	F=0,6506 P=0,5228 ^{N.S.}
Marmoreado	F=5,1181 P=0,0067**
Intensidade do aroma	F=2,0971 P=0,1253 ^{N.S.}
Aromas estranhos	F=0,33071 P=0,7188 ^{N.S.}
Dureza	F=4,4600 P=0,0126*

Tabela 91 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator	
	Lote	
	G.L.=2	
Fibrosidade	F=4,2158 P=0,0160*	
Suculência	F=7,3681 P=0,0008***	
Intensidade do sabor	F=2,573 P=0,0786 ^{N.S.}	
Sabores negativos	F=1,9015 P=0,1518 ^{N.S.}	
Intensidade da salga	F=1,6126 P=0,2018 ^{N.S.}	
Apreciação global	F=14,5583 P=0,0000***	

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$;
*** Significativo para $p < 0,001$

Avaliando a Tabela 91 verifica-se que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para suculência e apreciação global, muito significativo ($p < 0,01$) para intensidade da cor e marmoreado, significativo ($p < 0,05$) para dureza e fibrosidade e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis.

Na Tabela 92 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Tabela 92 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator	
	Modalidade	
	G.L.=4	
Intensidade da cor	F=0,7059 P=0,5887 ^{N.S.}	
Cores estranhas	F=2,6087 P=0,0366*	
Marmoreado	F=1,0457 P=0,3846 ^{N.S.}	
Intensidade do aroma	F=0,8138 P=0,5175 ^{N.S.}	
Aromas estranhos	F=1,4206 P=0,2282 ^{N.S.}	
Dureza	F=1,662 P=0,1601 ^{N.S.}	
Fibrosidade	F=0,2736 P=0,8948 ^{N.S.}	
Suculência	F=1,6961 P=0,1520 ^{N.S.}	

Tabela 92 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	Modalidade
	G.L.=4
Intensidade do sabor	F=1,5845 P=0,1795 ^{N.S.}
Sabores negativos	F=2,0492 P=0,0486*
Intensidade da salga	F=0,4242 P=0,7911 ^{N.S.}
Apreciação global	F=3,4042 P=0,0101*

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$

Relativamente aos resultados indicados na Tabela 92 constata-se que o fator modalidade foi significativo ($p < 0,05$) para cores estranhas, sabores negativos e apreciação global e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis estudadas.

Na Tabela 93 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Tabela 93 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos dos paios de porco preto inoculados com culturas mistas.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidades inoculadas				
	1	2	3	4	5
Intensidade da cor	74,51±11,16	78,69±11,95	77,00±11,59	77,39±12,02	77,63±12,56
Cores estranhas	0,00 ^b ±0,00	0,56 ^{ab} ±3,06	0,47 ^{ab} ±2,01	1,27 ^{ab} ±4,34	3,90 ^a ±12,63
Marmoreado	59,82±20,62	63,44±19,42	63,92±19,82	63,22±17,13	56,96±21,71
Intensidade do aroma	70,49±11,25	70,98±12,95	73,17±9,66	69,12±12,95	68,67±15,96
Aromas estranhos	0,26±1,60	1,33±4,45	0,67±2,34	1,35±3,77	2,58±8,33
Dureza	52,26±6,56	55,42±8,65	56,86±9,85	53,51±10,34	53,15±9,14
Fibrosidade	29,13±22,28	30,31±24,96	34,19±24,08	29,82±22,91	31,83±25,33
Suculência	62,72±15,02	58,80±13,91	58,47±16,02	56,65±15,33	54,71±14,62
Intensidade do sabor	69,00±10,81	70,07±9,77	69,31±15,86	65,47±11,00	64,85±15,89
Sabores negativos	1,21 ^b ±3,78	2,91 ^{ab} ±4,77	3,39 ^{ab} ±6,63	3,55 ^{ab} ±5,50	5,10 ^a ±9,41
Intensidade da salga	56,26±9,09	57,24±8,19	57,97±8,12	55,84±6,46	57,42±11,53
Apreciação global	67,72 ^a ±11,14	62,98 ^{ab} ±11,98	64,92 ^{ab} ±13,58	59,33 ^b ±15,40	58,73 ^b ±14,23

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g) +

levedura 2RB4 (10^6 células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A observação da Tabela 93 permite concluir que apenas existiram diferenças significativas para os parâmetros cores estranhas, sabores negativos e apreciação global. Para o primeiro parâmetro referido, os paios alocados à modalidade 1 (controlo) foram os únicos em que o painel não identificou ($0,00 \pm 0,00$) cores estranhas, todavia, só foi significativamente inferior para os paios da modalidade 5 (*S. xylosus* CECT7057 10^8 , *L. sakei* CECT7056 10^8 e levedura 2RB4 10^6), que apresentaram o valor médio $3,90 \pm 12,63$. Para sabores negativos, mais uma vez, os paios alocados à modalidade não inoculada apresentaram um valor médio ($1,21 \pm 3,78$) significativamente mais reduzido que o obtido pelos paios da modalidade 5 ($5,10 \pm 9,41$).

Em virtude do referido nos parágrafos anteriores, os paios não inoculados foram os mais apreciados (apreciação global) pelo painel, no entanto, só apresentaram um valor médio ($67,72 \pm 11,14$) significativamente mais elevado que os das modalidades 4 (*S. xylosus* CECT7057 10^8 e *L. sakei* CECT7056 10^8) e 5 que apresentaram valores médios de $59,33 \pm 15,14$ e $58,73 \pm 14,23$, respetivamente.

O descrito nos parágrafos anteriores indica que o painel preferiu os paios não inoculados. Ao nível sensorial, parece-nos que as estirpes habitualmente inoculadas neste estudo tiveram um efeito, ainda assim, mais positivo que as estirpes patenteadas. A levedura 2RB4 não pareceu contribuir para melhorar as características sensoriais dos paios, contrariamente ao referido por Corral *et al.* (2015); Flores *et al.* (2015); Vignolo *et al.* (2010); Bolumar *et al.* (2005) e Durá *et al.* 2004 que realçaram a capacidade de estirpes de levedura contribuírem para a qualidade sensorial dos enchidos.

5.3.2.7. Principais conclusões do ensaio

A introdução das estirpes patenteadas e o incremento da concentração microbiana não tiveram um efeito notório sobre os resultados obtidos para a a_w no produto acabado. Porém, para o pH os valores médios dos enchidos inoculados foram sempre significativamente inferiores aos dos enchidos controlo. A criação do T25 (25 dias de cura) não evidenciou nenhum efeito substancial relativo à ação das culturas de arranque.

As culturas de arranque contribuíram para a higiene e segurança dos paios, pois os valores médios obtidos para *L. monocytogenes* e enterobactérias foram inferiores do T2 em diante, destacando-se, no produto acabado, a cultura mista *S. equorum* S2M7 10^8 e *L. sakei* CV3C2 10^8 para as contagens de

L. monocytogenes (valor inferior ao limite de deteção do método <1 ufc/g) e a cultura mista composta pelas estirpes *S. xylosus* CECT7057 10⁸ e *L. sakei* CECT7056 10⁸ para as contagens de enterobactérias (valor inferior). O facto das contagens dos microrganismos referidos serem inferiores logo nas fases iniciais da cura poderá ser relevante em termos sanitários, porque alguns produtores colocam os seus enchidos no mercado com curas inacabadas.

No produto acabado, os paios inoculados apresentaram teores totais de aminas biogénicas significativamente inferiores, destacando-se a cultura mista *S. xylosus* CECT7057 10⁸ e *L. sakei* CECT7056, 10⁸ células g/massa, porque promoveu a maior redução daqueles compostos.

As percentagens globais de redução dos teores de aminas biogénicas foram as mais elevadas por comparação com todas as que lhes antecederam, isto é, nos ensaios com culturas puras de *Staphylococcus*, *Lactobacillus* e culturas mistas, mas sem a inoculação das estirpes patenteadas e também com concentrações (10⁶ células g/massa) inferiores às inoculadas neste ensaio.

No respeito aos parâmetros de análise sensorial, a cultura *S. equorum* S2M7 10⁸ e *L. sakei* CV3C2 10⁸ teve um efeito positivo superior ao da cultura composta pelas estirpes patenteadas, nomeadamente ao nível da intensidade da cor e do sabor e menores cores estranhas, aromas estranhos e sabores negativos. A levedura 2RB4 não pareceu contribuir para melhorar as características sensoriais dos paios.

Em função da informação constante ao longo do presente ensaio, a cultura de arranque que se mostrou mais capaz no que respeita a melhorar as características gerais dos paios de porco preto, do Alentejo, foi *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, na concentração 10⁸ células g/massa para cada estirpe.

5.4. Ensaio de inoculação em painhos da Beira Baixa com culturas puras de *Staphylococcus*

5.4.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)

Na Tabela 94 mostra-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Tabela 94 - Análise de variância para os resultados do pH e a_w , considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
pH	F=0,2165 P=0,8054 ^{N.S.}
a_w	F=3,8108 P=0,0229*

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *significativo para $p < 0,05$

Relativamente aos resultados indicados na Tabela 94 verifica-se que o fator lote foi significativo ($p < 0,05$) para a a_w e não significativo ($p \geq 0,05$) para o pH.

Conclui-se que houve alguma variação entre lotes, que culminou em diferenças significativas para a a_w .

Na Tabela 95 é mostrada a análise de variância para os resultados do pH e da a_w dos painhos da Beira Baixa, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 95 - Análise de variância para os resultados do pH e a a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=2	G.L.=8
pH	F=49,8898 P=0,0000***	F=11360,9901 P=0,0000***	F=23,2500 P=0,0000***
a_w	F=10,4883 P=0,0000***	F=1147,7829 P=0,0000***	F=5,3860 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: *** Significativo para $p < 0,001$

Observando a Tabela 95 pode inferir-se que os dois fatores foram altamente significativos ($p < 0,001$) para as variáveis estudadas e o mesmo se passou para a interação entre os fatores.

Na Tabela 96 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 96 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros	
		pH	a_w
T0	1	5,97 ^{A,b} ± 0,02	0,971 ^{A,a} ± 0,008
	2	5,88 ^{A,d} ± 0,02	0,975 ^{A,a} ± 0,008
	3	6,03 ^{A,a} ± 0,02	0,971 ^{A,a} ± 0,004
	4	5,95 ^{A,c} ± 0,02	0,959 ^{A,b} ± 0,008
	5	5,97 ^{A,b} ± 0,02	0,959 ^{A,b} ± 0,003
T5	1	5,17 ^{B,c} ± 0,08	0,936 ^{B,abc} ± 0,017
	2	5,12 ^{B,d} ± 0,06	0,931 ^{B,bc} ± 0,005
	3	5,18 ^{B,c} ± 0,05	0,941 ^{B,ab} ± 0,021
	4	5,31 ^{B,a} ± 0,06	0,928 ^{B,c} ± 0,007
	5	5,26 ^{B,b} ± 0,04	0,945 ^{B,a} ± 0,026
TFinal	1	5,00 ^{C,ab} ± 0,09	0,894 ^{C,a} ± 0,016
	2	4,96 ^{C,bc} ± 0,07	0,892 ^{C,ab} ± 0,017
	3	5,00 ^{C,ab} ± 0,06	0,888 ^{C,ab} ± 0,014
	4	5,04 ^{C,a} ± 0,10	0,881 ^{C,b} ± 0,012
	5	4,94 ^{C,c} ± 0,06	0,897 ^{C,a} ± 0,016

T0 (pré-enchimento); **T5** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^5 células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^8 células/g); **4** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^5 células/g); **5** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

Após análise da Tabela 96 conclui-se que relativamente aos valores médios obtidos para o pH houve diferenças significativas ao longo do tempo de amostragem e entre modalidades, verificando-se uma redução dos mesmos à medida que a cura se foi consumando. No T0 (pré-enchimento) os painhos atribuídos à modalidade 2 (*S. equorum* 5MSA4 10^5) apresentaram um valor médio significativamente inferior ($5,88 \pm 0,02$) aos restantes. A sua congénere inoculada com 10^8 células/g de massa apareceu em sentido oposto, sendo significativamente superior ($6,03 \pm 0,02$) às demais modalidades. Na fase intermédia da cura (T5) os valores de pH reduziram-se de forma considerável em todas as modalidades e só não existiram diferenças significativas entre os painhos das modalidades 1 (controlo) e 3 (*S. equorum* 5MSA4 10^8). A modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10^5) apresentou um valor médio ($5,31 \pm 0,06$) significativamente superior às restantes modalidades e a número 2 um valor médio ($5,12 \pm 0,06$) significativamente inferior. No produto acabado (TFinal) os painhos atribuídos à modalidade 5 (*S. equorum* S2M7 10^8) apresentaram um valor médio ($4,94 \pm 0,06$) significativamente inferior aos restantes, com exceção dos da modalidade 2 ($4,96 \pm 0,07$). Ao contrário do observado

para as inoculações com *Staphylococcus* nos paios de porco preto o pH manteve-se em tendência decrescente do T5 para o produto acabado, provavelmente, porque as bactérias lácticas naturalmente presentes no meio tiveram capacidade para continuarem a multiplicar-se, utilizado como substrato fermentescível a dextrose adicionada, uma vez que não havíamos adicionado o referido açúcar fermentescível aos paios de porco preto inoculados com culturas puras de *Staphylococcus*.

Prpich *et al.* (2015) produziram enchidos argentinos e obtiveram valores médios de 5,4 e 5,7 no início da cura, para os enchidos inoculados com *L. sakei* 442 e *S. xylosus* C8 e para os controlo, respetivamente. Na fase intermédia da cura os valores baixaram para próximos de 5,4 e culminaram em torno de 5,5 para os enchidos controlo e inoculados, ou seja, não existiram diferenças significativas entre os enchidos inoculados e os controlo. É de referir que a concentração inoculada pelos autores foi de aproximadamente 10^6 células/g de massa e foi adicionado 1,5% de açúcar (os autores não referem o tipo de açúcar que adicionaram).

Mauriello *et al.* (2002) inocularam salames italianos com três estirpes de *S. xylosus* (AS27, DS18 e ES1), todas elas com uma concentração aproximada de 10^7 células/g de massa, com dextrose adicionada, mas os autores não referem a percentagem adicionada e os enchidos estiveram sujeitos à fumagem tradicional apenas durante 4 horas. No início da cura, os valores foram iguais para enchidos inoculados e controlo e cifraram-se em 5,94, na fase intermédia da cura reduziram-se para valores próximos de 4,85 e culminaram em torno dos 6,0. Significando que, de uma forma geral, não existiram diferenças muito pronunciadas entre enchidos inoculados e controlo.

Ferreira *et al.* (2009) estudaram o perfil microbiológico do salpicão e chouriça de Vinhais fumados, produzidos por três produtores locais em condições semelhantes e não foram inoculados. Os resultados que vamos citar são referentes ao produtor A, optámos por este como poderíamos ter optando por qualquer um dos outros dois produtores envolvidos naquele estudo. O referido produtor obteve, para salpicão, o valor médio de 5,7 para o pH imediatamente antes do enchimento, a meio da cura reduziu-se para 5,3, valor que se manteve no produto acabado. Para chouriça não inoculada os resultados foram semelhantes, iniciaram-se com o mesmo valor de 5,7, baixaram para 5,4 na fase intermédia e mantiveram aquele valor no produto acabado.

Roseiro *et al.* (2008) produziram painhos de Portalegre também com recurso à fumagem tradicional, não inoculados e sem açúcar adicionado, com as concentrações habituais de sal (6%) e com teores reduzidos (3%) daquele ingrediente. Os resultados que vamos citar são referentes aos enchidos com o teor de sal habitual. Os valores obtidos pelos autores foram de 5,87, 5,13 e 5,36 imediatamente antes do enchimento, na fase intermédia da cura e no produto acabado, respetivamente.

Os resultados obtidos pelos autores citados ao longo dos últimos quatro parágrafos foram semelhantes aos por nós obtidos na fase inicial da cura e ligeiramente superiores na fase intermédia e no produto acabado. Apenas Roseiro *et al.* (2008) e Mauriello *et al.* (2002) obtiveram, na fase intermédia da cura, valores próximos dos obtidos neste estudo. O facto de alguns autores não adicionarem açúcares fermentescíveis poderá ter contribuído para valores de pH superiores, todavia, as bactérias lácticas naturalmente presentes nas massas dos painhos também poderão ter uma ação mais acidificante que as dos autores citados. A inoculação com *Staphylococcus* provavelmente não terá contribuído de forma muito efetiva para a redução do pH.

Para a a_w também se observaram diferenças ao longo do processo produtivo e entre modalidades, verificando-se a mesma tendência que evidenciámos para o pH, isto é, os valores foram-se reduzindo à medida que a cura se foi completando. No T0 os painhos alocados às modalidades 4 (*S. equorum* 5MSA4 10^5) e 5 (*S. equorum* 5MSA4 10^8) apresentaram valores médios de $0,959 \pm 0,008$ e $0,959 \pm 0,003$, respetivamente, que foram significativamente inferiores as das modalidades 1, 2 e 3. Na fase intermédia da cura a modalidade 4 apresentou painhos com um valor médio ($0,928 \pm 0,007$) significativamente inferior aos painhos das modalidades 3 ($0,941 \pm 0,021$) e 5 ($0,945 \pm 0,026$). No produto acabado os painhos alocados à modalidade 4 apresentaram um valor médio ($0,881 \pm 0,012$) significativamente inferior aos das modalidades 1 ($0,894 \pm 0,016$) e 5 ($0,897 \pm 0,016$).

Prpich *et al.* (2015) obtiveram valores médios, em todos os momentos da cura, inferiores aos por nós determinados e nunca identificaram diferenças significativas entre os enchidos controlo e inoculados. No produto acabado os valores cifraram-se entre 0,796 e 0,819. Mauriello *et al.* (2002) obtiveram valores de 0,956 no início da cura, independentemente dos enchidos serem ou não inoculados, na fase intermédia da cura baixaram, mas foram bastante heterogéneos - 0,901 a 0,946 - e no produto acabado acabaram por serem os enchidos controlo a apresentarem o valor médio (0,856) mais baixo, enquanto os inoculados foram todos superiores a 0,880. Roseiro *et al.* (2008) obtiveram valores médios de 0,95, 0,92 e 0,83 antes do enchimento, na fase intermédia da cura e no produto acabado, respetivamente.

Em função do exposto, concluímos que, de uma forma geral, os enchidos produzidos neste estudo apresentaram valores médios ligeiramente superiores em todos os momentos de análise, por comparação com os autores citados. Este foi o ensaio, independentemente do tipo de enchido fabricado, onde obtivemos valores médios de a_w mais elevados, o que pode parecer estranho, porque os enchidos foram considerados como acabados sempre com a mesma percentagem de perda de peso (38% a 40%). Porém, no produto acabado, os valores obtidos para os dois parâmetros

em análise permitirão manter os produtos à temperatura ambiente, sem prejuízo para a segurança sanitária dos mesmos (Hierro *et al.*, 2015; Leistner & Rodel, 1975).

5.4.2. Parâmetros microbiológicos

Para algumas das variáveis em estudo não foi feita análise de variância, porque os resultados foram inferiores ao limiar de detecção dos métodos utilizados.

Na Tabela 97 pode observar-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Tabela 97 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Mesófilos	F=5,8973 P=0,0040**
Psicrotróficos	F=0,3253 P=0,7232 ^{N.S.}
Bactérias lácticas	F=0,1954 P=0,8229 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus spp.</i>	F=0,1026 P=0,9027 ^{N.S.}
Enterobactérias	F=0,3747 P=0,6886 ^{N.S.}
Bolores	F=2,1928 P=0,1177 ^{N.S.}
Leveduras	F=0,0142 P=0,9859 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; **significativo para $p < 0,01$

Relativamente aos resultados indicados na Tabela 97 conclui-se que o fator lote foi muito significativo ($p < 0,01$) para microrganismos mesófilos e não significativo para as demais variáveis ($p \geq 0,05$).

Os parâmetros microbiológicos, o pH e a a_w são fortemente condicionados pelas matéria-primas e, consequentemente, por todos os processos desde o abate dos animais até ao produto acabado. Posto isto, será aceitável a variação indicada na Tabela 97.

Na Tabela 98 apresenta-se a análise de variância para os parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 98 - Análise de variância para os parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=2	G.L.=8
Mesófilos	F=4,6492 P=0,0021**	F=20,5536 P=0,0000***	F=4,0802 P=0,0004***
Psicrotróficos	F=11,1275 P=0,0000***	F=8,3990 P=0,0005***	F=24,3067 P=0,0000***
Bactérias lácticas	F=1,5235 P=0,2040 ^{N.S.}	F=706,9960 P=0,0000***	F=1,7536 P=0,1000 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus</i> spp.	F=36,9804 P=0,0000***	F=7,5677 P=0,0010**	F=37,3520 P=0,0000***
Enterobactérias	F=1,7911 P=0,1395 ^{N.S.}	F=665,6720 P=0,0000***	F=1,7911 P=0,0921 ^{N.S.}
Bolores	F=1,1222 P=0,3525 ^{N.S.}	F=1,5518 P=0,2186 ^{N.S.}	F=1,2260 P=0,2958 ^{N.S.}
Leveduras	F=5,7014 P=0,0005***	F=1342,0255 P=0,0000***	F=5,7014 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S.= Não significativo; ** Significativo para $p < 0,05$; *** Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 98 leva-nos a concluir que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para microrganismos psicrotróficos, *Staphylococcus* spp. e leveduras, muito significativo ($p < 0,01$) para microrganismos mesófilos e não foi significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis. Entre tempos de amostragem, apenas a contagem de bolores não apresentou diferenças significativas ($p \geq 0,05$), para as restantes variáveis aquele fator foi altamente significativo ($p < 0,001$), com exceção de *Staphylococcus* spp. para os quais foi muito significativo ($p < 0,01$). A interação modalidade x tempo de amostragem foi altamente significativa ($p < 0,001$) para as contagens de microrganismos mesófilos, psicrotróficos, *Staphylococcus* spp. e leveduras e não significativa ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis estudadas.

Na Tabela 99 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 99 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Parâmetros										
Tempo de amo.	Modalidade	Mesófilos	Psicrotróficos	Bactérias lácticas	<i>Staphylococcus</i> spp.	Enterobactérias	Bolores	Leveduras	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
T0	1	4,36 ^{B,b} ±0,24	3,68 ^{B,b} ±0,47	3,10 ^C ±0,58	2,89 ^{B,b} ±0,19	2,76 ^A ±0,56	< 1	2,22 ^{A,ab} ±0,28	< 1	ND
	2	4,29 ^{B,b} ±0,53	3,36 ^{B,b} ±0,56	2,75 ^C ±0,10	2,89 ^{B,b} ±0,19	2,57 ^A ±0,32	< 1	2,17 ^{A,b} ±0,39	< 1	ND
	3	6,51 ^{AB,a} ±0,45	6,51 ^{A,a} ±0,50	3,04 ^B ±0,31	6,50 ^{A,a} ±0,77	2,72 ^A ±0,96	< 1	1,96 ^{A,b} ±0,47	< 1	ND
	4	4,63 ^{B,b} ±0,18	4,01 ^{B,b} ±0,80	2,92 ^B ±0,41	3,18 ^{C,b} ±0,46	3,43 ^A ±0,56	< 1	2,76 ^{A,a} ±0,27	< 1	ND
	5	6,86 ^{AB,a} ±0,51	6,85 ^{A,a} ±0,41	2,88 ^B ±0,34	6,91 ^{A,a} ±0,82	2,80 ^A ±0,43	0,28 ±0,69	1,98 ^{A,b} ±0,17	< 1	ND
T5	1	6,50 ^A ±0,63	4,21 ^{B,ab} ±0,77	6,83 ^B ±0,02	5,09 ^{A,ab} ±0,43	< 1 ^B	1,88 ±4,01	< 1 ^B	< 1	ND
	2	6,49 ^A ±1,03	4,28 ^{A,ab} ±0,60	6,87 ^B ±0,04	5,09 ^{A,ab} ±0,93	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	3	6,85 ^A ±1,11	3,60 ^{B,b} ±0,43	6,85 ^A ±0,03	4,28 ^{B,b} ±0,12	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	4	6,87 ^A ±1,36	4,96 ^{A,a} ±0,19	6,87 ^A ±0,04	4,87 ^{A,ab} ±0,22	< 1 ^B	0,16 ±0,40	< 1 ^B	< 1	ND
	5	7,60 ^A ±1,79	4,24 ^{B,ab} ±0,75	6,86 ^A ±0,05	5,34 ^{B,a} ±0,37	< 1 ^B	0,17 ±0,41	< 1 ^B	< 1	ND
TFinal	1	6,41 ^A ±0,97	5,59 ^{A,a} ±0,89	7,81 ^A ±0,43	5,22 ^{A,a} ±0,23	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	2	5,78 ^{AB} ±1,41	4,45 ^{A,b} ±0,63	7,68 ^A ±0,49	4,24 ^{A,b} ±0,24	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	3	5,05 ^B ±1,24	3,83 ^{B,b} ±0,28	6,94 ^A ±0,90	4,12 ^{B,b} ±0,43	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	4	5,17 ^B ±0,76	4,11 ^{AB,b} ±0,64	6,84 ^A ±1,08	4,11 ^{B,b} ±0,53	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	5	5,69 ^C ±0,90	4,75 ^{B,a} ±0,44	7,36 ^A ±0,75	4,96 ^{B,a} ±0,54	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND

T0 (pré-enchimento); **T5** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10⁵ células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10⁸ células/g); **4** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁵ células/g); **5** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g).

Listeria monocytogenes apresenta-se em ufc/g. Os restantes parâmetros contáveis apresentam-se em log ufc/g.

Os valores indicados para *Salmonella* spp. referem-se ao número de resultados positivos em 6 amostras.

<1 - Contagens inferiores a uma unidade formadora de colónia por grama (ufc/g).

ND - Não detetado (ausência em 25g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

A análise da Tabela 99 permite inferir que para a contagem de microrganismos mesófilos não existiram diferenças muito pronunciadas ao longo do processo produtivo, principalmente entre os painhos inoculados. No T0 (pré-enchimento) os painhos alocados às modalidades 5 (*S. equorum*

S2M7 10⁸) e 3 (*S. equorum* 5MSA4 10⁸), que tinham sido inoculados com a concentração 10⁸ células/g de massa, apresentaram valores médios mais elevados que foram significativos para os painhos controlo e para os inoculados com *S. equorum* 5MSA4 10⁵ (modalidade 2). Aquela diferença dever-se-á à introdução das culturas de arranque. A diferença entre o grupo controlo e os outros grupos não é maior por razões competitivas, as culturas introduzidas não se vão adicionar às já instaladas, mas sobretudo substituí-las, como havíamos referido para os ensaios anteriormente analisados e discutidos.

Nas inoculações levadas a cabo na empresa do Alentejo os valores médios de microrganismos mesófilos, independentemente de serem ou não inoculados, rondaram os 6,0 a 7,0 log ufc/g. Neste ensaio os painhos controlo apresentaram o valor médio $4,36 \pm 0,24$ log ufc/g, parecendo-nos que a microbiota da matéria-prima apresentava concentrações microbianas mais reduzidas que o habitual para este tipo de produto. Como já foi referido no capítulo revisão bibliográfica do presente trabalho, de acordo com a *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (2005) os níveis habituais de bactérias à superfície das carnes de suíno superam as 10.000 unidades formadoras de colónias por cada g (10⁴ ufc/g), ou como indicam Carrascosa *et al.* (1988), e Cornejo *et al.* (1988) valores entre 10² e 10⁵ ufc/g. Blesa *et al.* (2008) apontam valores entre 10⁴ e 10⁵ ufc/g. Todavia, não temos argumentos sólidos que atestem o que escrevemos porque não realizámos análises microbiológicas após a mistura das massas.

Outros autores como Roseiro *et al.* (2010) produziram chouriços grossos de Estremoz e Borba, IGP, fumados e não inoculados, tendo obtido valores médios de 7,41 log ufc/g no início da cura, 8,69 log ufc/g na fase intermédia da cura e 8,80 log ufc/g no produto acabado. Já tínhamos citado os resultados obtidos por este autor, mas foram os relativos aos enchidos curados em câmara de cura e não com recurso à fumagem tradicional.

Ferreira *et al.* (2009) obtiveram valores médios para salpicão de $5,7 \pm 0,01$ log ufc/g no início da cura, $9,0 \pm 0,19$ log ufc/g na fase intermédia da cura e $9,0 \pm 0,03$ log ufc/g no produto acabado. Para chouriça os três valores foram ligeiramente superiores, iniciando-se em $10,3 \pm 0,01$ log ufc/g, $9,9 \pm 0,02$ log ufc/g e $9,4 \pm 0,40$ log ufc/g, respetivamente.

Posto isto, concluímos que os valores médios obtidos no presente ensaio foram inferiores aos dos autores citados e da maioria dos autores que inocularam culturas de arranque em enchidos, provavelmente porque as estirpes tiveram dificuldade em multiplicar-se devido às condições adversas decorrentes do processo de cura em geral e do processo de fumagem em particular.

Para as contagens de microrganismos psicrotróficos não se observaram diferenças muito evidentes ao longo do processo produtivo. As contagens deste grupo microbiano foram sempre

aproximadamente 2,0 log ufc/g inferiores às dos microrganismos mesófilos e no produto acabado foram os painhos controlo que apresentaram o valor médio ($5,59 \pm 0,89$ log ufc/g) mais elevado.

Elias (2004) realizou dois ensaios independentes, mas com as condições de processamento o mais semelhantes possível e inoculou *Staphylococcus xylosus* 8M em paios de porco Alentejano fumados, numa concentração próxima de 10^8 células/g de massa e sem açúcar fermentescível adicionado, e em todos os momentos da cura obteve valores médios de 1,0 log ufc/g a 2,0 log ufc/g superiores aos obtidos no corre estudo. O autor havia verificado o mesmo para as contagens de microrganismos mesófilos.

Para as contagens de bactérias lácticas observaram-se diferenças significativas do T0 para os restantes tempos de amostragem, tendo as contagens obtidas no tempo mencionado sido significativamente inferiores às obtidas para os restantes tempos de amostragem. Porém, entre modalidades não existiram diferenças significativas em nenhum dos tempos de amostragem. No T0, os valores médios ficaram próximos dos 3 log ufc/g para todas as modalidades, todavia, os mesmos sofreram um incremento para próximos dos 7 log ufc/g nos tempos que lhe sucederam. Este incremento é natural, até pelo aumento das temperaturas usadas na fumagem tradicional que facilitam a multiplicação daquelas bactérias.

Elias (2004), num primeiro ensaio realizado, e Ferreira *et al.* (2009) em salpicão obtiveram resultados semelhantes em todas as fases do processo. Porém, Ferreira *et al.* (2009), em chouriça, e Roseiro *et al.* (2010), chouriços grossos de Estremoz e Borba, IGP, obtiveram valores médios, em todas as fases do processo, sempre superiores em aproximadamente 1,0 log ufc/g. Todavia, como referido por Paramithiotis *et al.* (2010), no produto acabado - dependendo da carga microbiana inicial das matérias-primas e das condições de cura - as bactérias lácticas, geralmente, apresentam-se em concentrações que variam entre 10^7 e 10^9 ufc/g, indo os resultados obtidos no corrente ensaio ao encontro do intervalo apontado por aqueles autores.

Relativamente às contagens de *Staphylococcus* spp., mais uma vez, observaram-se diferenças significativas do T0 (pré-enchimento) para os restantes tempos de amostragem, de uma forma geral os valores médios foram superiores no T5 (fase intermédia da cura) e no produto acabado, com exceção dos painhos que foram inoculados com a concentração 10^8 células/g de massa que apresentam valores mais elevados na fase inicial da cura. No T0 os painhos alocados às modalidades 3 ($6,50 \pm 0,77$ log ufc/g) e 5 ($6,91 \pm 0,82$ log ufc/g) apresentaram valores médios significativamente superiores aos das restantes modalidades. No T5 foram os alocados à modalidade 5 ($5,34 \pm 0,37$ log ufc/g) que foram significativamente superiores aos da modalidade 3 ($4,28 \pm 0,12$ log ufc/g) e no produto acabado os painhos controlo ($5,22 \pm 0,23$ log ufc/g) apresentaram concentrações

significativamente superiores aos associados às modalidades 2 ($4,24 \pm 0,24$ log ufc/g), 3 ($4,12 \pm 0,43$ log ufc/g) e 4 ($4,11 \pm 0,53$ log ufc/g).

Em suma, as inoculações - só com 10^8 células/g de massa - tiveram um efeito positivo no início da cura; efeito esse que se foi dissipando no decorrer da mesma, por comparação com a modalidade controlo. Podendo estar associado ao abaixamento do pH e, claramente, à ação do fumo. Apesar de termos inoculado concentrações aproximadas de 10^5 e 10^8 células/g de massa, as contagens não atingiram os 7 log ufc/g em nenhum dos tempos de amostragem. No T0 (pré-enchimento), com temperaturas inferiores a 5°C a que as estirpes estiveram sujeitas durante a etapa de maturação (72 horas) e com a competição inicial entre microrganismos, parece-nos natural que algumas células de *Staphylococcus* inoculadas apresentem alguma dificuldade em se multiplicar e até sobreviver, podendo essas dificuldades condicionar as suas contagens ao longo de todo o processo. Pareceu que o incremento aproximado de 10^3 células/g de massa da concentração mais elevada não teve um efeito muito notório na multiplicação deste grupo microbiano.

Mauriello *et al.* (2002) inocularam salames italianos com quatro estirpes de *S. xylosus* (AS27, DS18 e ES1), todas elas com uma concentração aproximada de 10^7 células/g de massa, com dextrose adicionada, mas os autores não referem a percentagem e os enchidos estiveram sujeitos à fumagem tradicional apenas durante 4 horas, obtiveram valores médios para *Staphylococcus* próximos de 5 log ufc/g e de 7 log ufc/g no início da cura para enchidos controlo e inoculados, respetivamente. Nas fases intermédias da cura as concentrações aumentaram para próximas de 6 log ufc/g e 7 log ufc/g, respetivamente. No produto acabado rondaram os 7 log ufc/g para os enchidos inoculados e controlo.

Elias (2004) obteve resultados semelhantes aos de Mauriello *et al.* (2002), no entanto, os enchidos não inoculados apresentaram sempre concentrações inferiores em aproximadamente 1 log ufc/g. Roseiro *et al.* (2010); Ferreira *et al.* (2009) e Papamanoli *et al.* (2002) obtiveram valores próximos dos por nós determinados, apesar dos autores referirem que determinaram *Micrococcaceae* e não *Staphylococcus*. Julgamos que as contagens inferiores de *Staphylococcus* se deveram principalmente à ação do fumo. *Staphylococcus* necessitam mais de oxigénio para se multiplicarem que, por exemplo, *Lactobacillus*, logo, multiplicar-se-ão primeiramente nas zonas mais externas dos enchidos, onde a exposição ao fumo é muito superior, conseqüentemente, pela deposição de compostos químicos do fumo, o meio torna-se quimicamente adverso para a multiplicação das bactérias em discussão.

A presença de enterobactérias no T5 e no produto acabado foi inferior ao limite de deteção do método (<1 ufc/g). Isto significa que não existiram diferenças significativas entre estes tempos de

amostragem, mas existiram em relação ao T0. Estas diferenças não representam nada em concreto no que diz respeito à ação das estirpes, uma vez que inoculámos *Staphylococcus* e estas bactérias não são reconhecidas principalmente pela sua ação bacteriostática ou bactericida, principalmente numa fase tão precoce do processo de cura.

Os resultados obtidos para enterobactérias no T0 vão ao encontro dos apresentados por Roseiro *et al.* (2010), Talon *et al.* (2007) e Elias (2004), no primeiro ensaio que o autor levou a cabo, e foram inferiores aos de Ferreira *et al.* (2009) e Elias (2004) no segundo ensaio delineado por aquele autor. Na fase intermédia da cura e no produto acabado os resultados obtidos neste estudo foram inferiores aos de todos os autores citados - foram os únicos inferiores ao limite de deteção do método-, representando elevada higiene e boas práticas durante o processo produtivo, concomitantemente revela um contributo importante para a segurança sanitária dos enchidos. O aquecimento associado à fumagem não promoveu o desenvolvimento deste grupo microbiano e o meio quimicamente adverso, criado, principalmente, à superfície do produto pelos compostos do fumo, não terá sido determinante na sua redução, dado tratarem-se de microrganismos com a capacidade para se desenvolver em meios pobres em oxigénio. Provavelmente foi o efeito conjunto da redução do pH, da a_w e fenómenos competitivos que conduziram à redução daquela microbiota Gram-negativo.

A presença de leveduras no T5 e no produto acabado foi inferior ao limite de deteção do método (<1 ufc/g), significa que não existiram diferenças significativas entre estes tempos de amostragem, mas existiram em relação ao T0. Neste último tempo, os painhos alocados à modalidade 4 ($2,76 \pm 0,27$ log ufc/g) apresentaram um valor médio significativamente superior aos que foram inoculados.

Elias (2004) obteve valores sempre superiores para os paios de porco Alentejano inoculados por comparação com os controlo. O autor obteve contagens em todos os momentos de análise. Roseiro *et al.* (2010) e Ferreira *et al.* (2009) obtiveram valores médios semelhantes entre si. Os mesmos foram próximos dos 4 log ufc/g, independentemente da fase do processo produtivo.

As contagens de *L. monocytogenes* foram < 1 ufc/g para todas as modalidades e em todos os tempos de amostragem. Esta bactéria é frequentemente encontrada em matérias-primas e ambientes de processamento de alimentos, sendo, portanto, frequentemente isolado durante as etapas iniciais do processo produtivo de enchidos. Todavia, a fumagem tem sido relatada como tendo um efeito positivo na redução das contagens desta bactéria (Hajmeer *et al.*, 2011; Kozačinski *et al.*, 2008).

Salmonella spp. foi negativa para todas as modalidades e em todos os tempos de amostragem.

Em termos microbiológicos, no produto acabado, não foi notório um efeito positivo nem prejudicial por parte das estirpes. No T0, como seria expectável, para microrganismos mesófilos, psicrotróficos e *Staphylococcus* spp. os painos inoculados com as modalidades 3 (*S. equorum* 5MSA4 10⁸) e 5 (*S. equorum* S2M7 10⁸) - concentrações mais elevadas - apresentaram valores significativamente mais elevados que as demais modalidades.

Relembramos que as condições em que os painhos foram produzidos envolveram a fumagem tradicional, processo que é sobejamente conhecido por ser mais limitativo no que concerne à viabilidade microbiana. Esta premissa ainda se acentua mais se considerarmos que as temperaturas de fumagem usadas na empresa da Beira Baixa situaram-se, durante a maior parte do tempo, acima dos 35°C, tendo mesmo atingido os 48,4°C como indicado no capítulo materiais e métodos.

De evidenciar a qualidade microbiológica das matérias-primas e ingredientes, que desde o T0 não apresentaram *Salmonella* spp. nem qualquer contagem para *L. monocytogenes*, ou seja os indicadores de segurança por nós avaliados neste estudo.

5.4.3. Determinação de amins biogénicas

Na Tabela 100 apresenta-se a análise de variância para os resultados das amins biogénicas, considerando o fator lote.

Tabela 100 - Análise de variância para os resultados das amins biogénicas, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Triptamina	F=7,068 P=0,0011**
β-feniletilamina	F=2,3152 P=0,1017 ^{N.S.}
Putrescina	F=1,5019 P=0,2255 ^{N.S.}
Cadaverina	F=5,0041 P=0,0077**
Histamina	F=1,1433 P=0,3211 ^{N.S.}
Tiramina	F=0,9248 P=0,3985 ^{N.S.}
Espermidina	F=10,7400 P=0,0000***
Espermina	F=3,8566 P=0,0229*
Amins vasoativas	F=6,8055 P=0,0014**
Total de amins	F=3,4616 P=0,0335*

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para p<0,05; **Significativo para p<0,01;
***Significativo para p<0,001

A análise da Tabela 100 permite concluir que o fator lote foi altamente ($p < 0,001$) significativo para espermidina, muito significativo ($p < 0,01$) para triptamina, cadaverina e aminas vasoativas, significativo ($p < 0,05$) para espermina e teores totais de aminas biogénicas e não foi significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis em análise.

Os teores de aminas biogénicas são influenciados por múltiplos fatores, como tal, será natural que lotes produzidos com matérias-primas e em datas distintas possam contribuir para a existência de variabilidade entre os mesmos.

Na Tabela 101 mostra-se a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 101 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis (mg/kg de enchido)	Fatores		
	Modalidade G.L.=4	Tempo de amostragem G.L.=2	Modalidade x Tempo de amostragem G.L.=8
Triptamina	F=2,3826 P=0,0536 ^{N.S.}	F=53,9974 P=0,0000***	F=1,9211 P=0,0600 ^{N.S.}
β-feniletilamina	F=4,2980 P=0,0025**	F=9,8437 P=0,0000***	F=2,1162 P=0,00369**
Putrescina	F=6,6237 P=0,0000***	F=150,6983 P=0,0000***	F=5,8350 P=0,0000***
Cadaverina	F=5,5634 P=0,0000***	F=16,8354 P=0,0000***	F=7,0217 P=0,0000***
Histamina	F=8,4495 P=0,0000***	F=155,5415 P=0,0000***	F=8,2679 P=0,0000***
Tiramina	F=1,2498 P=0,5002 ^{N.S.}	F=200,3696 P=0,0000***	F=2,7081 P=0,0000***
Espermidina	F=3,0285 P=0,0192*	F=75,1641 P=0,0000***	F=3,4940 P=0,0009***
Espermina	F=0,2696 P=0,8978 ^{N.S.}	F=121,9804 P=0,0000***	F=0,7627 P=0,6361 ^{N.S.}
Aminas vasoativas	F=2,5292 P=0,0425*	F=39,2463 P=0,0000***	F=2,0692 P=0,0416*
Total de aminas	F=3,5551 P=0,0082**	F=62,3556 P=0,0000***	F=2,8462 P=0,0055**

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 101 permite afirmar que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para putrescina, cadaverina e histamina, muito significativo ($p < 0,01$) para β-feniletilamina e total de aminas, significativo ($p < 0,05$) para espermidina e aminas vasoativas e não significativo ($p \geq 0,05$) para

as restantes aminos. O fator tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as aminos estudadas. A interaao entre os fatores mencionados foi altamente significativa ($p < 0,001$) para putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e espermidina, muito significativa ($p < 0,01$) para β -feniletilamina e total de aminos, significativa ($p < 0,05$) para aminos vasoativas e não significativa ($p \geq 0,05$) para triptamina e espermina.

Na Tabela 102 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para as aminos biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 102 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Parâmetros (mg/kg de enchido)											
Tempo de amostragem	Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Aminas vasoativas	Total de aminas
T0	1	377,93 ^A ±209,54	8,89 ±2,64	37,42 ^{B,a} ±33,74	50,01 ^{A,a} ±37,13	ND ^B	1,85 ^B ±0,56	19,46 ^{A,a} ±1,90	172,10 ^A ±44,31	388,67 ^A ±209,60	667,66 ^{A,a} ±166,02
	2	306,47 ^A ±143,26	6,54 ^A ±1,09	7,75 ^{C,b} ±0,87	31,18 ^{B,ab} ±5,06	ND ^B	1,71 ^C ±0,56	16,85 ^{B,a} ±1,87	172,60 ^A ±38,15	314,71 ^A ±143,45	543,10 ^{A,ab} ±159,63
	3	208,46 ^A ±147,84	6,65 ±1,46	7,77 ^{B,b} ±1,51	28,77 ^b ±11,06	ND ^B	1,60 ^B ±0,84	13,99 ^{A,ab} ±6,81	146,59 ^A ±71,69	216,70 ^A ±149,35	413,82 ^{A,b} ±219,76
	4	243,18 ^A ±136,89	6,47 ±1,65	6,62 ^{B,b} ±0,76	24,26 ^{AB,b} ±5,41	ND ^B	1,28 ^B ±0,56	11,02 ^{A,b} ±4,90	152,3 ^A ±73,18	250,93 ^A ±138,44	445,17 ^{A,ab} ±215,80
	5	319,55 ^A ±191,69	8,36 ±3,74	7,89 ^{B,b} ±1,04	24,94 ^{A,b} ±5,12	ND ^B	1,20 ^B ±0,62	14,01 ^{A,ab} ±6,62	151,2 ^A ±68,77	329,11 ^A ±193,62	527,24 ^{A,ab} ±262,48
T5	1	144,30 ^B ±49,35	6,52 ±0,46	13,66 ^{B,ab} ±1,05	19,17 ^{B,b} ±1,60	1,31 ^B ±2,02	0,13 ^C ±0,12	6,32 ^C ±0,37	64,81 ^B ±6,56	152,25 ^{B,ab} ±49,87	256,23 ^{B,ab} ±50,64
	2	147,87 ^B ±33,47	6,63 ^A ±0,87	14,93 ^{B,a} ±2,18	24,65 ^{B,a} ±4,51	0,52 ^B ±1,12	0,43 ^B ±0,34	7,48 ^B ±3,40	68,56 ^B ±7,56	155,46 ^{B,ab} ±34,47	271,07 ^{B,ab} ±40,05
	3	99,68 ^B ±51,63	6,07 ±0,34	12,22 ^{B,b} ±2,84	20,53 ^b ±4,57	1,07 ^B ±1,95	0,38 ^B ±0,42	7,15 ^B ±3,73	64,81 ^B ±8,81	107,20 ^{B,b} ±49,86	211,90 ^{B,b} ±42,60
	4	131,68 ^B ±49,93	6,13 ±1,04	11,87 ^{B,b} ±3,42	19,33 ^{B,b} ±1,48	1,83 ^B ±2,49	0,75 ^B ±0,99	5,29 ^B ±0,65	66,98 ^B ±11,62	140,39 ^{B,ab} ±49,87	243,87 ^{B,ab} ±46,06
	5	163,46 ^B ±63,92	6,70 ±0,90	11,36 ^{B,b} ±1,04	18,21 ^{B,b} ±2,66	2,10 ^B ±13,12	0,73 ^B ±0,74	6,05 ^B ±0,90	68,96 ^B ±16,25	172,99 ^{B,a} ±65,99	277,57 ^{B,a} ±75,46
TFinal	1	76,81 ^B ±18,65	5,96 ±0,90	78,04 ^{A,ab} ±20,21	20,23 ^{B,b} ±2,39	12,47 ^{A,c} ±7,28	4,10 ^A ±0,84	9,70 ^B ±1,76	58,40 ^B ±8,34	99,34 ^{B,b} ±18,94	265,71 ^{A,b} ±26,14
	2	69,27 ^B ±23,98	5,66 ^B ±0,62	88,47 ^{A,ab} ±6,58	48,12 ^{A,a} ±13,61	43,64 ^{A,ab} ±11,16	2,95 ^A ±0,68	10,48 ^A ±3,84	58,04 ^B ±18,17	121,51 ^{B,ab} ±26,80	326,62 ^{B,ab} ±47,24
	3	98,21 ^B ±29,87	6,76 ±1,22	49,40 ^{A,b} ±24,87	27,80 ^b ±11,32	33,90 ^{A,bc} ±29,89	4,48 ^A ±2,20	12,56 ^A ±4,90	65,09 ^B ±19,76	143,35 ^{AB,ab} ±50,32	298,19 ^{AB,b} ±85,95
	4	134,98 ^B ±62,12	5,46 ±1,32	54,02 ^{A,b} ±38,25	25,52 ^{A,b} ±7,38	27,04 ^{A,bc} ±13,12	3,62 ^A ±1,44	11,31 ^A ±3,46	64,16 ^B ±15,60	171,10 ^{AB,ab} ±68,59	326,11 ^{AB,ab} ±96,99
	5	127,02 ^B ±95,92	6,89 ±2,07	109,23 ^{A,a} ±57,84	31,19 ^{A,b} ±10,04	60,58 ^{A,a} ±32,87	3,75 ^A ±0,89	10,15 ^{AB} ±4,43	76,55 ^B ±34,48	198,25 ^{B,a} ±126,82	425,37 ^{AB,a} ±152,56

T0 (pré-enchimento); **T5** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado). **1** - Controlo com dextrose; **2** - *S. equorum* 5MSA4 (10^5 células/g); **3** - *S. equorum* 5MSA4 (10^8 células/g); **4** - *S. equorum* S2M7 (10^5 células/g); **5** - *S. equorum* S2M7 (10^8 células/g). O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina. Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. ND - Não detetado.

Tendo em conta a Tabela 102, para os teores de amins biogénicas não se observou um comportamento padronizado para todas as amins estudadas, mas, de uma forma geral, os teores de putrescina, cadaverina, tiramina e espermidina reduziram-se do T0 (pré-enchimento) para a fase intermédia da cura (T5) e voltaram a aumentar no produto acabado.

A histamina não foi detetada (ND) no T0, porém, os teores daquela amina foram aumentando gradualmente, até que no produto acabado atingiram os $60,58 \pm 32,87$ mg/kg nos painhos inoculados e $12,47 \pm 7,28$ mg/kg nos painhos controlo.

A tiramina apresentou teores bastante reduzidos, visto não terem atingido os 5,00 mg/kg em nenhum dos tempos de amostragem.

Para o conjunto das amins vasoativas (triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina) observou-se uma redução gradual para os enchidos controlo e para os inoculados com a modalidade 2 (*S. equorum* 5MSA4 10^5). Os enchidos alocados às restantes modalidades viram os teores deste grupo de amins reduzirem-se do T0 para o T5, todavia, voltaram a elevar-se, ainda que ligeiramente, no produto acabado. Ao contrário da estirpe *S. equorum* S2M7, não dispomos de nenhum estudo que tenha testado a atividade descarboxilase de *S. equorum* 5MSA4, porém, em função dos resultados obtidos, não parecem haver indícios da mesma ser elevada.

Para os teores totais das oito amins estudadas, observou-se uma redução do T0 para a fase intermédia da cura e um ligeiro incremento no produto acabado.

Como referido no decorrer do presente trabalho, a maioria dos autores concluiu que a amina que apresentou teores mais elevados nos estudos por eles executados foi tiramina (Bover-Cid *et al.*, 2014; Coloretti *et al.*, 2014; Simion *et al.*, 2014), porém, mais uma vez, neste ensaio não foi a conclusão a que chegámos. As amins biogénicas que apresentaram concentrações mais elevadas no produto acabado, por ordem decrescente, foram triptamina, putrescina e espermina. Em sentido oposto surgiram a tiramina e β -feniletilamina. De ressaltar que histamina apresentou concentrações que atingiram $60,58 \pm 32,87$ mg/kg nos painhos inoculados com *S. equorum* S2M7 10^8 células/g de massa, valores muito acima dos determinados nos paios de porco preto mas, ainda assim, muito inferiores aos apresentados por Gomes (2016) e Claro (2009) para enchidos Alentejanos, que chegaram a atingir, em termos médios, os 277,91 mg/kg e 591,70 mg/kg, respetivamente. Já Alves *et al.* (2017) quantificaram teores superiores a 100 mg/kg de histamina em dois paios produzidos em Portugal. A atividade descarboxilase da estirpe em causa foi avaliada por Alfaia *et al.* (2018) e os autores concluíram que a mesma não era produtora de histamina, como tal, julgamos que não será de excluir a possibilidade de durante à fermentação espontânea, principalmente como resultado da atividade

as bactérias lácticas (particularmente *Enterococcus*), que são os principais microrganismos envolvidos no processo de fermentação (EFSA, 2011), tenha havido a produção daquela amina. Relembramos que tiramina e histamina são as aminas mais importantes do ponto de vista toxicológico (Vidal-Carou *et al.*, 2015; Latorre-Moratalla *et al.*, 2012b; Shalaby, 1996).

Laranjo *et al.* (2016) também verificaram que a amina que apresentou teores mais elevados em catalão e salsichão prontos a consumir foi triptamina e Domínguez *et al.* (2016) quantificaram teores mais elevados de espermina. Amina que também quantificamos em concentrações consideráveis no produto acabado (≥ 70 mg/kg). Porém, Vidal-Carou *et al.* (2007) referem que triptamina e feniletilamina podem ser consideradas as aminas que apresentam teores mais reduzidos em enchidos fermentados, a sua acumulação parece dependente da ocorrência de altos teores de tiramina associados a algumas estirpes de bactérias lácticas ou ECN. O presente estudo não corrobora a teoria das duas aminas mencionadas estarem associadas a teores elevados de tiramina.

Simion *et al.* (2014) confirmaram a correlação existente entre contagens elevadas de LAB e teores superiores de triptamina em enchidos Romenos tipo Dacia. Aqueles autores referem que esta correlação parece indicar o papel daquele grupo microbiano na geração de triptofano livre ou na sua posterior descarboxilação para gerar aquela amina. Os valores de triptamina quantificados pelos autores citados, embora elevados, foram inferiores a 50 mg/kg, o que coincide com os valores relatados por outros autores (Papavergou *et al.*, 2012; Suzzi & Gardini, 2003), e os teores não foram afetados pelo uso de culturas de arranque. Os valores obtidos no presente ensaio foram superiores ao indicado e a estirpe *S. equorum* S2M7 parece ter tido efeito no aumento dos teores da amina em causa.

Em vários alimentos fumados são encontrados alcaloides de β -carbolina. Podendo ser formados na reação de L-triptofano com formaldeído ou acetaldeído. A concentração de todos os compostos referidos aumenta com a temperatura e duração da fumaça (Papavergou & Herraiz, 2003). Podendo, portanto, estar associada a teores elevados de triptamina, uma vez que a descarboxilação do triptofano originará aquela amina. Porém, se tivermos em conta os resultados obtidos no produto acabado para os paços de porco preto inoculados com culturas puras de *Lactobacillus* e culturas mistas esta premissa não se cumpre, porque as temperaturas ao longo do processo de cura não ultrapassaram os 12°C e os teores de triptamina foram elevados.

A presença das poliaminas naturais espermidina e espermina seguiu o padrão habitualmente encontrado em enchidos - como já referimos ao longo deste trabalho - com a prevalência da segunda sobre a primeira.

Lu *et al.* (2015) e Bover-cid *et al.* (1999) referem que as poliaminas naturais são predominantes nas matérias-primas dos enchidos e os seus teores não se alteram significativamente ao produto acabado. O presente estudo e os levados a cabo por Laranjo *et al.* (2017a); Laranjo *et al.* (2016) e Simion *et al.* (2014) não parecem corroborar a questão dos valores não se alterarem significativamente até se atingir o produto acabado.

Latorre-Moratalla *et al.* (2007) associaram histamina à presença de diaminas, especialmente cadaverina, no entanto, neste ensaio essa relação não foi muito evidente no presente ensaio.

Como as temperaturas atingidas durante o processo de fumagem na empresa da Beira Baixa foram bastante elevadas (atingiram os 48,4°C), se comparadas com as usadas quando a cura decorre exclusivamente em câmara de cura, aproveitamos para referir que Gücükoglu & Küplülü (2010) relataram que temperaturas superiores durante o processo de cura (26°C vs. 22°C) possibilitaram a redução de putrescina por diferentes culturas de arranque (*L. sakei* e *S. xylosus* B-FM, *L. plantarum* e *S. carnosus* TD66 e *L. curvatus*, *S. carnosus* e *S. xylosus* RM-10) em enchidos Turcos, contudo, as temperaturas de fermentação não tiveram nenhum efeito significativo na redução da tiramina. Similarmente, Casquete *et al.* (2011b) descreveram a influência das temperaturas no desenvolvimento e atividade de culturas de arranque autóctones, compostas por *P. acidilactici* MS200 e *S. vitulus* RS34 e *P. acidilactici* MS198 e *S. vitulus* RS34, neste caso, a temperatura mais elevada (12°C vs. 7°C) no início da cura contribuiu para redução dos teores de aminas, provavelmente devido à melhor adaptação das culturas autóctones ao ambiente de fermentação das massas.

As práticas usadas ao longo do processo produtivo condicionam tanto o desenvolvimento microbiano (atividade descarboxilase) como as alterações bioquímicas e físico-químicas que ocorrem durante a fermentação. O recurso à fumagem tradicional varia em função das tradições e dos hábitos de consumo. Na Beira Baixa, a cura dos enchidos decorre principalmente no fumeiro tradicional, contrariamente ao que se verifica no Alentejo, onde a utilização de câmaras de cura, com pequenos períodos de fumagem, constitui a prática mais comum. Roseiro *et al.* (2010) registaram maiores teores de aminas biogénicas quando a cura dos produtos decorreu por ação do fumo, por oposição aos sujeitos exclusivamente a câmaras de cura. Elias & Carrascosa (2010) também relacionaram maiores valores de azoto básico volátil total e proteólise com processos de fumagem mais intensos, concomitantemente teores superiores de aminas biogénicas.

No produto acabado, os valores médios obtidos para o conjunto das aminas vasoativas e para a concentração total de aminas biogénicas foram inferiores a 200 mg/kg e 1000 mg/kg, respetivamente, o que é positivo em termos higiénicos, visto estes serem os limites apresentados por vários autores e citados por Tasić *et al.* (2012).

Os teores totais de aminas biogénicas determinados neste ensaio, no produto acabado, foram inferiores aos determinados por Papavergou *et al.* (2012); Casquete *et al.* (2011b) e Ruiz-Moyano *et al.* (2011).

Os teores de aminas biogénicas determinados neste ensaio foram inferiores aos obtidos em todos os ensaios levados a cabo com os paios de porco preto. Se tivermos em conta os resultados obtidos para o pH e a a_w , facilmente percebemos que foram semelhantes em todos os ensaios dos dois tipos de enchido. No entanto, os parâmetros microbiológicos revelam que as matérias-primas dos painhos apresentavam teores menores, por exemplo, de enterobactérias e *L. monocytogenes* e no produto acabado também se aplicou o descrito. Aqui parece ter existido uma influência da microbiota sobre a aminogénese.

Na Tabela 103 apresenta-se a percentagem de redução dos teores de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os painhos controlo e os inoculados.

Tabela 103 - Percentagem de redução dos teores de aminas biogénicas no produto acabado, por comparação entre os painhos controlo e os inoculados.

% de Redução										
Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Aminas vasoativas	Total de aminas
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----
2	9,82	6,04	NR	NR	NR	28,05	NR	0,62	NR	NR
3	NR	NR	36,70	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4	NR	8,39	30,78	NR	NR	11,71	NR	NR	NR	NR
5	NR	NR	NR	NR	NR	8,54	NR	NR	NR	NR

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^5 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^8 células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^5 células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g).

O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina.

NR - Não ocorreu redução

Tendo como base o descrito na Tabela 103, verifica-se que as inoculações não promoveram um decréscimo dos teores de aminas biogénicas tão evidente como nos paios de porco preto. Todavia, neste ensaio os teores globais destes compostos foram bastante inferiores, o que poderá dificultar a ação das estirpes sobre a redução daqueles contaminantes químicos. Na maioria dos casos até promoveram um incremento, principalmente a estirpe *S. equorum* S2M7, na concentração 10^8 células/g de massa. Todavia, as estirpes não promoveram redução quer para os teores de aminas vasoativas quer para os teores totais de aminas. Como já havíamos referido nas discussões relativas aos paios de porco preto, a estirpe em causa apenas mostrou atividade descarboxilase moderada para tiramina não sendo produtora de nenhuma das restantes aminas estudadas (Alfaia *et al.*, 2018).

Como já havíamos escrito nas discussões supracitadas, vários autores atestam a ação das culturas de arranque na redução dos teores de aminas biogénicas (Baka *et al.*, 2011; Casquete *et al.*, 2011b), no entanto, neste ensaio, essa premissa não foi totalmente válida, indo ao encontro do evidenciado por Bozkurt & Erkmen (2002) e Parente *et al.* (2001).

5.4.4. Parâmetros da cor

Na Tabela 104 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Tabela 104 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
L*	F=2,6129 P=0,0767 ^{N.S.}
a*	F=0,2911 P=0,7479 ^{N.S.}
b*	F=0,3986 P=0,6720 ^{N.S.}
c*	F=0,3196 P=0,7269 ^{N.S.}
H°	F=0,2819 P=0,7547 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo

Analisando a Tabela 105 conclui-se que o fator lote não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas. Refletindo, possivelmente, o facto das estirpes manterem uma ação semelhante em todos os lotes ou essa ação ser reduzida ao ponto de não conseguir influir sobre a variância.

Na Tabela 105 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Tabela 105 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator	
	Modalidade	
	G.L.=4	
L*	F=8,7755 P=0,0000***	
a*	F=2,9982 P=0,0206*	
b*	F=1,0856 P=0,3659 ^{N.S.}	
C*	F=1,8952 P=0,1144 ^{N.S.}	
H°	F=1,4260 P=0,2283 ^{N.S.}	

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; *** Significativo para $p < 0,001$

Avaliando a Tabela 105 infere-se que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para L* e significativo ($p < 0,05$) para a*. Não tendo esse efeito ou outro estatisticamente significativo sobre as demais variáveis ($p \geq 0,05$).

Na Tabela 106 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 106 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros				
		L*	a*	b*	C*	H°
T _{Final} (produto acabado)	1	46,30 ^a ±3,60	17,15 ^a ±2,42	11,05±2,85	20,46±3,33	32,42±4,58
	2	46,48 ^a ±3,73	15,33 ^{ab} ±2,38	10,15±3,33	18,47±3,64	32,68±5,81
	3	41,77 ^b ±2,72	16,34 ^{ab} ±1,85	9,60±2,32	19,01±2,54	30,04±4,79
	4	44,39 ^a ±4,38	15,27 ^b ±3,70	9,75±3,64	18,22±4,81	31,95±6,06
	5	44,38 ^a ±2,91	16,70 ^{ab} ±2,50	10,14±2,41	10,14±2,41	30,90±3,78

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^5 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10^8 células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^5 células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g).

Na mesma coluna, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

Analisando a Tabela 106 verifica-se que apenas existiram diferenças significativas para os parâmetros L* e a*.

Para L* a modalidade 3 (*S. equorum* 5MSA4 10^8) apresentou painhos estatisticamente ($41,77 \pm 2,72$) mais escuros, por comparação com os alocados às demais modalidades. Relembramos que os teores de gordura poderão influenciar os valores de L*, sendo proporcionais e que muitos autores referem que os valores de L* são influenciados pela perda de água decorrente do processo de cura (Sanabria *et al.*, 2004; Pérez-Alvarez *et al.*, 1999).

Relativamente à coordenada a^* , verificamos que a modalidade 1 (controlo) apresentou painhos significativamente ($17,15 \pm 2,42$) mais vermelhos que os alocados à modalidade 4 (*S. equorum* S2M7 10³), com o valor médio $15,27 \pm 3,70$. Pérez-Alvarez *et al.* (1999) apontam uma possibilidade para os valores de a^* , de uma forma geral, se irem minorando ao longo da cura de enchidos - algo que não determinámos -, que se prende com a desnaturação da nitrosomioglobina devido à produção de ácido láctico. No produto acabado os valores médios do pH e as contagens de bactérias lácticas dos painhos inoculados foram semelhantes aos dos controlo, posto isto, neste ensaio não parece aplicar-se a hipótese dos autores citados.

Prpich *et al.* (2015) obtiveram valores ligeiramente inferiores para a coordenada de cor L^* , inferiores a 10 para a^* e inferiores a 6 para b^* . Os mesmos autores não determinaram C^* nem H° . Significado, portanto, que os painhos foram mais vermelhos e amarelos que os enchidos produzidos pelos autores citados. Estes autores concluíram que a inoculação dos enchidos com as estirpes *L. sakei* 487 e *S. vitulinus* C2, na concentração aproximada de 10⁶ células/g de massa, contribuíram para a formação da cor vermelha dos enchidos, por comparação com os controlo.

Como sabemos, a redução de nitratos a nitritos e de estes a óxido nítrico, que reage com o grupo heme da mioglobina da carne para dar lugar ao pigmento nitrosomioglobina e posteriormente ao nitrosoheme, pigmento responsável pela cor estável dos enchidos curados, é fundamental para manter a vulgarmente designada cor característica dos enchidos, cor essa que vai ao encontro do gosto dos consumidores. Gøtterup *et al.* (2008) concluíram que a ação de estirpes de *Staphylococcus* não foi significativa na formação dos pigmentos que mantêm a cor da carne estável, quando utilizaram nitritos e ácido ascórbico, todavia, quando recorreram a nitratos as estirpes conseguiram ter um efeito significativo, ou seja, a sua atividade nitrato-redutase contribuiu para a formação de nitrosomioglobina. É sabido que a adição de ácido ascórbico ou de algum dos seus sais - ascorbatos - e o abaixamento do pH poderão contribuir para acelerar a fixação da cor dos produtos cárneos.

5.4.5. Parâmetros reológicos

Na Tabela 107 apresenta-se a análise de variância para os resultados obtidos para os parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Tabela 107 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Dureza (N)	F=1,8718 P=0,1574 ^{N.S.}
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=4,4110 P=0,0138*
Coesividade	F=0,3798 P=0,6846 ^{N.S.}
Elasticidade	F=1,0869 P=0,3399 ^{N.S.}
Resiliência	F=2,3089 P=0,1030 ^{N.S.}
Mastigabilidade (N)	F=1,9775 P=0,1421 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para p<0,05

Após leitura da Tabela 107 podemos inferir que o fator lote foi significativo (p<0,05) para a adesividade e foi não significativo (p≥0,05) para as demais variáveis.

Na Tabela 108 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Tabela 108 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Dureza (N)	F=6,3119 P=0,0001***
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=7,6722 P=0,0000***
Coesividade	F=8,6056 P=0,0000***
Elasticidade	F=3,1499 P=0,0162*
Resiliência	F=3,1935 P=0,0151*
Mastigabilidade (N)	F=5,8598 P=0,0002***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: * Significativo para p<0,05;*** Significativo para p<0,001

Observando a Tabela 108 constata-se que o fator modalidade foi altamente significativo (p<0,001) para dureza, adesividade, coesividade e mastigabilidade e significativo (p<0,05) para elasticidade e resiliência.

Na Tabela 109 são apresentados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 109 - Valores médios e desvios padrão para a análise do perfil de textura obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Dureza (N)	39,948 ^c ±13,688	55,664 ^{ab} ±26,451	61,976 ^a ±19,567	49,054 ^{bc} ±14,518	49,281 ^{bc} ±11,357
Adesividade (N.s ⁻¹)	-0,189 ^c ±0,172	-0,396 ^{bc} ±0,436	-0,666 ^a ±0,470	-0,478 ^{ab} ±0,304	-0,388 ^{bc} ±0,218
Coabilidade	5,092 ^c ±1,557	7,564 ^{ab} ±3,020	8,955 ^a ±2,496	7,767 ^{ab} ±3,826	6,850 ^{bc} ±1,687
Elasticidade	0,805 ^b ±0,070	0,862 ^{ab} ±0,057	0,852 ^b ±0,074	0,996 ^a ±0,413	0,859 ^b ±0,660
Resiliência	0,193 ^a ±0,028	0,190 ^{ab} ±0,034	0,169 ^b ±0,039	0,183 ^{ab} ±0,028	0,195 ^a ±0,031
Mastigabilidade (N)	21,824 ^b ±7,493	32,974 ^a ±14,607	38,298 ^a ±11,647	32,487 ^a ±21,204	29,708 ^{ab} ±8,637

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10⁵ células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10⁸ células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁵ células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

Analisando a Tabela 109 conclui-se que os painhos alocados à modalidade 3 (*S. equorum* 5MSA4 10⁸) foram significativamente mais duros (61,976 ± 19,567 N) que os restantes, com exceção dos atribuídos à modalidade 2 (*S. equorum* 5MSA4 10⁵) que apresentaram um valor médio de 55,664 ± 26,451 N. Os painhos atribuídos a esta última modalidade também foram significativamente mais duros que os da modalidade 1 (controlo), que apresentaram um valor médio de 39,984 ± 13,688 N. O valor médio obtido pelos painhos controlo destaca-se por ser bastante reduzido, por comparação com resultados que obtivemos nos ensaios dos paços de porco preto e os levados a cabo por Elias (2004), todavia, são semelhantes aos obtidos por Alves *et al.* (2016). Como veremos nos resultados obtidos para os parâmetros de análise sensorial, o painel de provadores não percecionou este valor que parece ser reduzido para a dureza dos enchidos, tendo em conta os obtidos nos ensaios anteriores. Apesar das condições de processamento serem o mais semelhantes possível, as amostras utilizadas para estudar os parâmetros reológicos não foram as mesmas que o painel de provadores avaliou, como tal, pode ter existido alguma variabilidade entre amostras que conduziu às diferenças mencionadas.

Os enchidos inoculados apresentaram-se mais duros, coesos, adesivos e, conseqüentemente, apresentaram valores médios mais elevados para mastigabilidade e, de uma forma geral, menores para a resiliência. O parâmetro adesividade é que não parece ter uma razão objetiva para ter sido mais elevado nos enchidos inoculados, pois estando relacionado com as características da superfície da amostra, nomeadamente com a capacidade de adesão à superfície da sonda, parece-nos que deveria apresentar resultados inferiores, até porque os valores da a_w dos enchidos inoculados foram

próximos ou mais reduzidos que os dos enchidos controlo e não nos parece que o pH (exsudação) possa estar a influir neste ensaio, em função dos resultados obtidos.

5.4.6. Análise sensorial

Na Tabela 110 mostra-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Tabela 110 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Intensidade da cor	F=1,2767 P=0,2819 ^{N.S.}
Cores estranhas	F=0,4043 P=0,6681 ^{N.S.}
Marmoreado	F=3,8902 P=0,0225*
Intensidade do aroma	F=2,0958 P=0,1265 ^{N.S.}
Aromas estranhos	F=3,5223 P=0,0319*
Dureza	F=0,3032 P=0,7388 ^{N.S.}
Fibrosidade	F=1,0029 P=0,3692 ^{N.S.}
Suculência	F=2,9357 P=0,0561 ^{N.S.}
Intensidade do sabor	F=0,3985 P=0,6721 ^{N.S.}
Sabores negativos	F=1,6009 P=0,2050 ^{N.S.}
Intensidade da salga	F=4,9810 P=0,0080**
Apreciação global	F=0,3851 P=0,6810 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$

Relativamente aos resultados apresentados na Tabela 110 pode inferir-se que o fator lote foi muito significativo ($p < 0,01$) para a intensidade da salga, significativo ($p < 0,05$) para marmoreado e aromas estranhas e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

Apesar das modalidades e as condições de cura serem idênticas, o facto de os lotes terem sido produzidos em datas distintas e com matérias-primas provenientes também de lotes distintos, poderá culminar numa inevitável variância.

Na Tabela 111 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Tabela 111 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Intensidade da cor	F=2,041 P=0,0915 ^{N.S.}
Cores estranhas	F=0,6088 P=0,6569 ^{N.S.}
Marmoreado	F=1,0719 P=0,3725 ^{N.S.}
Intensidade do aroma	F=0,5836 P=0,6750 ^{N.S.}
Aromas estranhos	F=1,3116 P=0,2683 ^{N.S.}
Dureza	F=2,3411 P=0,0576 ^{N.S.}
Fibrosidade	F=2,2512 P=0,0562 ^{N.S.}
Suculência	F=1,7380 P=0,1445 ^{N.S.}
Intensidade do sabor	F=1,055 P=0,3809 ^{N.S.}
Sabores negativos	F=0,7609 P=0,5523 ^{N.S.}
Intensidade da salga	F=1,7289 P=0,1465 ^{N.S.}
Apreciação global	F=1,7537 P=0,1412 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo

Observando a Tabela 111 conclui-se que o fator modalidade não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas.

Na Tabela 112 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

Tabela 112 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Staphylococcus*.

TFinal (produto acabado)					
Modalidade					
Parâmetros	1	2	3	4	5
Intensidade da cor	62,49 ± 8,10	61,56 ± 8,20	67,61 ± 9,78	63,82 ± 10,11	62,25 ± 9,56
Cores estranhas	0,20 ± 1,18	0,37 ± 1,26	0,71 ± 3,78	0,36 ± 0,98	0,00 ± 0,00
Marmoreado	55,60 ± 21,55	53,97 ± 20,49	50,07 ± 18,22	53,53 ± 17,83	59,91 ± 15,90
Intensidade do aroma	65,91 ± 15,65	65,94 ± 8,08	69,04 ± 7,19	65,39 ± 7,36	68,38 ± 15,69
Aromas estranhos	1,74 ± 4,31	5,97 ± 9,59	5,18 ± 9,57	2,32 ± 4,58	5,15 ± 14,70
Dureza	66,48 ± 8,51	61,09 ± 8,29	61,29 ± 16,94	61,75 ± 10,24	61,18 ± 10,18
Fibrosidade	45,40 ± 22,40	33,06 ± 20,70	40,71 ± 24,22	39,82 ± 21,11	48,68 ± 23,86
Suculência	50,46 ± 16,95	47,31 ± 18,88	47,64 ± 17,47	54,50 ± 14,19	56,22 ± 16,02
Intensidade do sabor	65,49 ± 9,21	61,69 ± 11,00	60,36 ± 11,48	64,25 ± 9,74	64,44 ± 15,16
Sabores negativos	4,77 ± 7,01	8,12 ± 8,76	7,57 ± 9,39	7,75 ± 9,22	8,38 ± 13,39
Intensidade da salga	57,26 ± 6,51	59,09 ± 7,73	60,96 ± 9,08	61,78 ± 7,96	59,75 ± 6,10
Apreciação global	53,74 ± 11,80	50,00 ± 14,30	50,82 ± 12,55	58,39 ± 15,15	53,31 ± 13,78

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10⁵ células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* 5MSA4 (10⁸ células/g); 4 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁵ células/g); 5 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

Avaliando a Tabela 112 percebe-se que não existiram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros avaliados pelo painel.

Como referimos nos resultados obtidos para os parâmetros reológicos, a dureza dos painhos (próxima dos 40 N) não inoculados tinha sido reduzida por comparação com outros autores e com os resultados por nós obtidos nos ensaios que antecederam este. No entanto, essa diferença de valores não foi percebida pelo painel de provadores.

Pensamos ser importante referir que, apesar de não terem existido diferenças significativas, a modalidade 5 foi a única onde o painel não detetou cores estranhas e em termos de apreciação global a modalidade preferida foi a inoculada com *S. equorum* S2M7 10⁵ que apresentou um valor médio de 58,39 ± 15,15, enquanto a modalidade não inoculada apresentou um valor médio de 53,74 ± 11,80.

Prpich *et al.* (2015) observaram um contributo das culturas de arranque ao nível da dureza e da intensidade da cor em enchidos argentinos. Aqueles autores atribuíram valores mais elevados de dureza à produção de ácido por parte das estirpes de *Lactobacillus*. A predominância de LAB, face a *Staphylococcus*, resultará em enchidos mais ácidos e com menores intensidades de cor e aromática,

porque o último género bacteriano é conhecido por ter um efeito melhorador nas características sensoriais dos enchidos, enquanto o primeiro género é mais conhecido pelo seu efeito protetor.

5.4.7. Principais conclusões do ensaio

As inoculações tiveram um efeito positivo na redução dos valores da a_w no produto acabado, com exceção dos enchidos inoculados com a estirpe *S. equorum* S2M7 10^8 células/g de massa, tendo os painhos alocados à estirpe *S. equorum* S2M7 10^5 células/g de massa apresentado valores daquele parâmetro significativamente inferiores aos painhos controlo. Para o pH o efeito não foi tão notório, todavia, os painhos inoculados com a estirpe *S. equorum* S2M7 10^8 células/g de massa apresentaram um valor médio significativamente inferior aos enchidos controlo.

De destacar a qualidade microbiológica das matérias-primas e ingredientes que desde o T0 (pré-enchimento) não apresentaram *Salmonella* spp. nem qualquer contagem para *L. monocytogenes*. Porém, as estirpes não tiveram um efeito muito pronunciado sobre a microbiota dos painhos.

As inoculações não promoveram um decréscimo dos teores de amins biogénicas tão evidente como nos paios de porco preto. Na maioria dos casos até promoveram um incremento, principalmente a estirpe *S. equorum* S2M7, na concentração 10^8 células/g de massa. De referir que nenhum valor atingiu os 200 mg/kg e 1000 mg/kg, respetivamente, para amins vasoativas e teores totais de amins, isto é, não ultrapassaram os limites de segurança mencionados na bibliografia.

De uma forma geral as inoculações não depreciaram as características sensoriais dos painhos. Parece-nos que a estirpe *S. equorum* S2M7 se destacou ligeiramente, tendo em conta os resultados da apreciação global, porque para os restantes parâmetros não houve uma estirpe que se tenha destacado claramente.

Essa ponderação leva-nos a considerar que a estirpe *S. equorum* S2M7 foi aquela que apresentou maior potencial para ser inoculada como cultura mista nos painhos da Beira Baixa. Quanto à concentração a inocular, optamos por 10^8 células/g de massa porque no produto acabado foi aquela que apresentou a concentração mais elevada para *Staphylococcus* e promoveu uma redução superior do pH, apesar dos resultados obtidos para amins biogénicas não terem sido muito satisfatórios quando inoculámos a estirpe na concentração referida, todavia, como referido na análise e discussão dos resultados, a atividade descarboxilase da estirpe em causa foi avaliada e a mesma foi muito baixa para tiramina e nula para as restantes amins, como tal, julgamos que os valores mais elevados de amins não terão sido consequência da presença da estirpe.

5.5. Ensaio de inoculação em painhos da Beira Baixa com culturas puras de *Lactobacillus*

5.5.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)

Na Tabela 113 apresentam-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Tabela 113 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
pH	F=0,8616 P=0,4232 ^{N.S.}
a_w	F=1,1285 P=0,3244 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo

Observando a Tabela 113 conclui-se que o fator lote não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas. Este facto pode indicar uma maior padronização dos processos e matérias-primas usados na fábrica da Beira Baixa.

Na Tabela 114 mostra-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 114 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=2	G.L.=8
pH	F=79,6531 P=0,0000***	F=2976,0508 P=0,0000***	F=23,8850 P=0,0000***
a_w	F=12,0523 P=0,0000***	F=1286,4788 P=0,0000***	F=8,1347 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: *** Significativo para $p < 0,001$

Analisando a Tabela 114 conclui-se que os dois fatores foram altamente significativos ($p < 0,001$) para as duas variáveis (pH e a_w).

Na Tabela 115 indicam-se os valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 115 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a aw obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros	
		pH	aw
T0	1	5,91 ^{A,a} ± 0,04	0,953 ^{A,a} ± 0,005
	2	5,89 ^{A,a} ± 0,07	0,934 ^{A,b} ± 0,036
	3	5,58 ^{A,b} ± 0,13	0,945 ^{A,ab} ± 0,004
	4	5,94 ^{A,a} ± 0,06	0,947 ^{A,a} ± 0,005
	5	5,63 ^{A,b} ± 0,17	0,950 ^{A,a} ± 0,005
T5	1	5,18 ^{B,a} ± 0,08	0,913 ^{B,a} ± 0,008
	2	5,18 ^{B,a} ± 0,05	0,901 ^{B,b} ± 0,012
	3	5,05 ^{B,c} ± 0,05	0,890 ^{B,c} ± 0,009
	4	5,12 ^{B,b} ± 0,08	0,900 ^{B,b} ± 0,010
	5	5,12 ^{B,c} ± 0,06	0,891 ^{B,c} ± 0,010
TFinal	1	5,11 ^{B,a} ± 0,15	0,870 ^{C,ab} ± 0,008
	2	5,02 ^{C,bc} ± 0,11	0,874 ^{C,a} ± 0,019
	3	4,96 ^{C,c} ± 0,03	0,861 ^{C,bc} ± 0,005
	4	5,08 ^{C,ab} ± 0,10	0,860 ^{C,c} ± 0,021
	5	5,05 ^{C,ab} ± 0,06	0,866 ^{C,abc} ± 0,006

T0 (pré-enchimento); **T5** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁵ células/g); **3** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁸ células/g); **4** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁵ células/g); **5** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A análise da Tabela 115 permite concluir que, para o pH, existiram diferenças significativas entre o T0 (pré-enchimento) e os tempos de amostragem que se lhe seguiram (T5 e TFinal), cabendo aos últimos tempos valores significativamente inferiores. No que concerne a uma avaliação por tempo de amostragem, no T0 as massas inoculadas com *L. curvatus* L2B2 10⁸ (modalidade 3) e *L. sakei* CV3C2 10⁸ (modalidade 5) apresentaram valores médios de pH (5,58 ± 0,13 e 5,63 ± 0,17, respetivamente) significativamente inferiores às das restantes modalidades, isto é, as modalidades em que as estirpes foram inoculadas com a concentração inferior (10⁵ células/g de massa) e a controlo. Como já foi amplamente referido, valores mais baixos de pH nesta fase poderão ter um efeito importante sobre a ação de microrganismos patogénicos, contribuído, deste modo, para a segurança sanitária dos enchidos. Na fase intermédia da cura (T5), como seria expectável, os valores de pH reduziram-se de forma considerável em todas as modalidades, aquele abaixamento deveu-se, presumivelmente, às razões já sobejamente indicadas ao longo deste trabalho. Porém, os painhos alocados à modalidade 3 apresentaram um valor médio (5,05 ± 0,05) significativamente inferior aos das modalidades 1 (controlo) e 2 (*L. curvatus* L2B2 10⁵), cujos valores médios foram de 5,18 ± 0,08 e 5,18 ± 0,05, respetivamente. No produto acabado, os painhos alocados à modalidade 3 mantiveram o valor médio (4,96 ± 0,03) significativamente inferior aos das restantes modalidades, com exceção

da sua congénere 2 ($5,02 \pm 0,11$). Entre as restantes modalidades não se observaram diferenças significativas, no entanto, todos os painhos inoculados apresentaram valores médios inferiores aos controlo.

Dalla-Santa *et al.* (2014) produziram salames italianos e inocularam *L. plantarum* 503 e *S. xylosum* e *L. plantarum* 314 e *S. xylosum*, na concentração aproximada de 10^7 células/g de massa com 0,5% de glucose + 0,5% de sacarose adicionadas. Os autores obtiveram, no início da cura, valores médios próximos de $5,80 \pm 0,00$, tanto para os enchidos controlo como para os inoculados, ou seja, não existiram diferenças ao nível estatístico. Na fase intermédia da cura os valores reduziram-se consideravelmente, tendo sido de $4,55 \pm 0,02$, $4,22 \pm 0,02$ e $4,35 \pm 0,12$, para os enchidos controlo, inoculados com *L. plantarum* 503 e *S. xylosum* e inoculados com *L. plantarum* 314 e *S. xylosum*, respetivamente. No produto acabado, seguindo a mesma ordem de apresentação dos resultados, obtiveram resultados semelhantes aos da fase intermédia da cura, que foram de $4,54 \pm 0,01$, $4,31 \pm 0,01$ e $4,40 \pm 0,02$, respetivamente. Os autores identificaram diferenças significativas entre enchidos inoculados e controlo nos dois últimos tempos de amostragem. Cenci-Goga *et al.* (2012) produziram salame italiano inoculado com *L. lactis* 340, *L. lactis* 316 e *L. casei* 340, na concentração aproximada de 10^7 células/g de massa e sem açúcares adicionados, e logo após o enchimento obtiveram valores médios de 6,58 e 6,56 para os enchidos controlo e inoculados, respetivamente. Na fase intermédia da cura os valores baixaram para 6,23 e 5,66, respetivamente, e no produto acabado subiram para valores superiores aos iniciais, tendo sido de 6,81 e 6,76, respetivamente. Chen *et al.* (2016) produziram enchidos chineses inoculados com *L. sakei* CMRC6 e *L. plantarum* CMRC15, com uma concentração aproximada de 10^7 células/g de massa e também não adicionaram açúcar. Os autores efetuaram o enchimento após a mistura, conseqüentemente o processo de fermentação decorreu no interior das tripas e teve a duração de 48 h. Naquele momento do processo os valores determinados foram de 5,4 para os enchidos controlo, 5,1 para os inoculados com *L. sakei* CMRC6 e próximos de 4,7 para os inoculados com *L. plantarum* CMRC15. Na fase intermédia da cura os enchidos controlo e inoculados com *L. sakei* CMRC6 apresentaram uma redução dos respetivos valores de pH (5,2 e 5,0, respetivamente), enquanto os enchidos alocados a *L. plantarum* CMRC15 sofreram um ligeiro incremento para próximo dos 4,8. Incremento que se manteve até ao produto acabado, tendo terminado em 4,9, valor que se aplicou a todas os enchidos inoculados, independentemente da estirpe. Os enchidos controlo apresentaram um valor de pH de 5,0, que foi significativamente superior por comparação com os inoculados. Estes autores observaram que alguns enchidos mantiveram uma tendência decrescente dos valores de pH - o observado no presente ensaio -, porém, outros sofreram ligeiros incrementos no produto acabado, causados pelo efeito tampão resultante da proteólise.

Os resultados deste ensaio foram semelhantes aos apresentados por Chen *et al.* (2016) e inferiores aos de Cenci-Goga *et al.* (2012). Esta situação parece-nos natural, visto as estirpes usadas e as condições de processamento serem distintas, nomeadamente o facto dos autores não terem adicionado açúcares fermentescíveis. Já Dalla-Santa *et al.* (2014) determinou valores de pH no produto acabado bastante inferiores ao que é habitual neste tipo de enchido (Holko *et al.*, 2013; Lebert *et al.*, 2007b), incluindo os nossos.

Quanto aos valores médios da a_w existiram diferenças significativas ao longo do processo produtivo, verificando-se um decréscimo à medida que a cura foi decorrendo. No que concerne ao T0, foram os painhos alocados à modalidade 2 (*L. curvatus* L2B2 10^5) que apresentaram um valor médio ($0,934 \pm 0,036$) significativamente inferior, com exceção dos painhos da sua congénere número 3 ($0,945 \pm 0,004$). Entre as restantes modalidades não se observaram diferenças. Houve um decréscimo evidente dos valores médios para todas as modalidades do T0 para o T5, porém, foram os enchidos controlo que apresentaram o valor médio ($0,913 \pm 0,008$) significativamente superior aos inoculados. No produto acabado, conclui-se que a modalidade 4 (*Lactobacillus sakei* CV3C2 10^5) reduziu significativamente a a_w dos painhos, por comparação com os painhos controlo e com os inoculados com a modalidade 2, contribuindo, deste modo, para encurtar o processo produtivo e aumentar a estabilidade microbiana dos enchidos.

No que concerne a resultados obtidos por outros autores, Dalla-Santa *et al.* (2014), obtiveram valores médios superiores em todas as fases de produção, independentemente dos enchidos serem ou não inoculados. Cenci-Goga *et al.* (2012) não encontram diferenças entre enchidos controlo e inoculados em nenhum dos tempos de amostragem. No produto acabado os enchidos produzidos por aqueles autores apresentaram valores médios que se aproximaram de 0,83 (inferiores aos por nós determinados). Já Chen *et al.* (2016) obtiveram resultados semelhantes aos do presente estudo e não identificaram diferenças significativas entre enchidos inoculados e controlo em nenhuma das fases do processo.

Temos discutido os resultados obtidos para o pH e a a_w separadamente, mas a diminuição dos valores da a_w está intimamente associada ao abaixamento do pH. Quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares da carne (5,1-5,3), a capacidade para reter água diminui, facilitando a desidratação e, conseqüentemente, reduzem-se os valores da a_w dos enchidos.

5.5.2. Parâmetros microbiológicos

Para algumas das variáveis em estudo não foi feita análise de variância, porque os resultados foram inferiores ao limiar de deteção do método utilizado.

Na Tabela 116 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Tabela 116 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Mesófilos	F=0,1681 P=0,8455 ^{N.S.}
Psicrotróficos	F=10,6004 P=0,0000***
Bactérias lácticas	F=1,8362 P=0,1655 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus spp.</i>	F=0,1304 P=0,8779 ^{N.S.}
Enterobactérias	F=0,1347 P=0,8742 ^{N.S.}
Leveduras	F=0,3988 P=0,6723 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ***significativo para p<0,001

Os resultados apresentados na Tabela 116 indicam que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para microrganismos psicrotróficos e não apresentou diferenças com significado estatístico ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis. Os resultados seguiram a tendência dos apresentados para o pH e a a_w , isto é, o fator lote não apresentou significância sobre a maioria dos parâmetros microbiológicos.

Na Tabela 117 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 117 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade G.L.=4	Tempo de amostragem G.L.=2	Modalidade x Tempo de amostragem G.L.=8
Mesófilos	F=4,1322 P=0,0044**	F=1,5114 P=0,2272 ^{N.S.}	F=1,1659 P=0,3310 ^{N.S.}
Psicrotróficos	F=0,5803 P=0,6778 ^{N.S.}	F=18,5414 P=0,0000***	F=1,4254 P=0,1999 ^{N.S.}
Bactérias lácticas	F=6,9625 P=0,0000***	F=26,4817 P=0,0000***	F=2,0696 P=0,0494*
<i>Staphylococcus spp.</i>	F=29,6779 P=0,0000***	F=6,8955 P=0,0018**	F=6,9684 P=0,0000***
Enterobactérias	F=0,4942 P=0,7400 ^{N.S.}	F=230,6275 P=0,0000***	F=2,8543 P=0,0080**

Tabela 117 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Fatores			
Variáveis	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=2	G.L.=8
Leveduras	F=2,9379 P=0,0259*	F=128,4089 P=0,0000***	F=4,6371 P=0,0001***

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

Observando a Tabela 117 contata-se que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para as contagens de bactérias lácticas e *Staphylococcus* spp., muito significativo ($p < 0,01$) para microrganismos mesófilos, significativo ($p < 0,05$) para leveduras e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis. Entre tempos de amostragem as contagens de microrganismos psicrotróficos, bactérias lácticas, enterobactérias e leveduras apresentaram diferenças altamente significativas ($p < 0,001$), para *Staphylococcus* spp. foi muito significativo ($p < 0,01$) e não significativo ($p \geq 0,05$) para microrganismos mesófilos. A interação modalidade x tempo de amostragem foi altamente significativa ($p < 0,001$) para as contagens de *Staphylococcus* spp. e leveduras, muito significativa ($p < 0,01$) para enterobactérias e significativa ($p < 0,05$) para bactérias lácticas, não tendo apresentado diferenças com significado estatístico ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

Na Tabela 118 mostram-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 118 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Parâmetros										
Tempo de amost.	Modalidade	Mesófilos	Psicrotróficos	Bactérias lácticas	<i>Staphylococcus</i> spp.	Enterobactérias	Bolores	Leveduras	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
T0	1	6,03 ^{ab} ±1,69	6,41 ±1,73	3,88 ^{B,b} ±2,72	3,68 ^{AB} ±1,60	5,49 ^A ±1,35	< 1	3,18 ^{A,ab} ±1,11	< 1	ND
	2	5,48 ^b ±1,30	5,59 ±1,25	5,90 ^{B,ab} ±1,37	2,76 ^B ±0,19	4,82 ^A ±1,83	< 1	2,32 ^{A,b} ±0,72	< 1	ND
	3	6,58 ^{ab} ±0,58	6,85 ^A ±0,52	7,36 ^a ±0,90	3,06 ±0,30	5,73 ^A ±0,49	< 1	2,90 ^{A,ab} ±0,27	< 1	ND
	4	6,20 ^{ab} ±0,91	5,84 ±0,23	5,08 ^{B,ab} ±0,87	3,20 ^B ±0,25	5,19 ^A ±1,29	< 1	3,68 ^{A,ab} ±1,34	< 1	ND
	5	7,77 ^a ±0,54	7,67 ^A ±0,73	6,27 ^{B,ab} ±1,26	3,52 ^A ±0,54	6,90 ^A ±0,96	< 1	3,91 ^{A,a} ±0,41	< 1	ND

Tabela 118 (continuação) - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Parâmetros										
Tempo de amost.	Modalidade	Mesófilos	Psicrotróficos	Bactérias lácticas	<i>Staphylococcus</i> spp.	Enterobactérias	Bolores	Leveduras	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
T5	1	5,93 ±1,69	5,08 ±1,76	6,77 ^A ±0,28	5,21 ^{A,a} ±0,29	1,08 ^B ±1,72	< 1	2,53 ^{A,a} ±1,32	< 1	ND
	2	6,33 ±1,32	4,96 ±1,02	7,54 ^A ±0,47	4,20 ^{A,a} ±0,62	1,07 ^B ±1,77	< 1	1,12 ^{AB,ab} ±1,28	< 1	ND
	3	5,63 ±0,54	3,81 ^B ±1,36	7,61 ±0,80	2,19 ^b ±1,08	0,52 ^B ±1,27	< 1	0,67 ^{A,ab} ±1,05	< 1	ND
	4	5,50 ±0,57	3,88 ±2,48	7,85 ^A ±1,40	4,86 ^{A,a} ±0,79	2,01 ^B ±1,22	< 1	1,11 ^{A,ab} ±0,99	< 1	ND
	5	6,47 ±1,37	3,91 ^B ±2,37	8,23 ^A ±1,07	2,91 ^{B,b} ±0,09	< 1 ^B	< 1	< 1 ^{B,b}	< 1	ND
TFinal	1	6,30 ±0,36	4,75 ±0,59	6,76 ^{A,c} ±0,45	5,39 ^{A,a} ±0,90	0,28 ^B ±0,69	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	2	6,00 ±0,89	4,53 ±1,10	7,22 ^{A,abc} ±0,18	3,35 ^{B,bc} ±0,31	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	3	5,87 ±0,90	4,87 ^B ±1,35	7,33 ^{ab} ±0,26	2,63 ^c ±0,09	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	4	6,31 ±0,73	5,11 ±1,08	7,01 ^{A,bc} ±0,32	4,04 ^{A,b} ±0,51	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	5	7,09 ±0,67	5,05 ^B ±1,66	7,64 ^{AB,a} ±0,23	2,61 ^{B,c} ±0,11	< 1 ^B	< 1	< 1 ^B	< 1	ND

T0 (pré-enchimento); **T5** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁵ células/g); **3** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁸ células/g); **4** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁵ células/g); **5** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g).

Listeria monocytogenes apresenta-se em ufc/g. Os restantes parâmetros contáveis apresentam-se em log ufc/g.

Os valores indicados para *Salmonella* spp. referem-se ao número de resultados positivos em 6 amostras.

<1 - Contagens inferiores a uma unidade formadora de colónia por grama (ufc/g).

ND - Não detetado (ausência em 25g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

Para as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, no T0 (pré-enchimento), os valores foram semelhantes e aproximaram-se dos 6 log ufc/g. Nos tempos de amostragem que lhe sucederam, as contagens de microrganismos psicrotróficos reduziram-se ligeiramente e foram sempre inferiores 1 log ufc/g a 2 log ufc/g em relação às de microrganismos mesófilos. Os painhos controlo nunca apresentaram valores médios significativamente diferentes dos inoculados.

Para as contagens de microrganismos mesófilos, Chen *et al.* (2016); Cenci-Goga *et al.* (2012); Drosinos *et al.* (2005) e Elias (2004) obtiveram resultados, a partir do meio da cura e que se mantiveram no produto acabado, próximos dos 8 log ufc/g, isto é, superiores em aproximadamente 2 log ufc/g aos por nós obtidos. Julgamos que as condições em que os painhos foram fumados

poderão ter influência nos resultados apresentados, porque os valores de temperatura, que em determinados momentos se aproximaram dos 50 °C, foram bastante superiores aos usados pelos autores citados.

Para as contagens de microrganismos psicrotróficos, Elias (2004) quando produziu paios de porco Alentejano com recurso à fumagem tradicional e inoculados com a estirpe *L. sakei* 27L, na concentração aproximada de 10^8 log ufc/g de massa e sem açúcar adicionado, obteve valores médios de $6,98 \pm 0,36$ log ufc/g e $5,58 \pm 0,36$ log ufc/g para os enchidos controlo e inoculados, respetivamente, isto no pré-enchimento. Na fase intermédia da cura os valores reduziram-se nos paios controlo ($5,78 \pm 0,27$ log ufc/g) e aumentaram nos inoculados ($7,13 \pm 0,32$ log ufc/g) e, por fim, no produto acabado foram de $5,10 \pm 0,57$ log ufc/g e $6,16 \pm 0,41$ log ufc/g para enchidos controlo e inoculados, respetivamente. Todos os resultados são referentes ao primeiro ensaio levado a cabo pelo autor citado. Mais uma vez, os resultados obtidos pelo autor foram ligeiramente superiores aos obtidos neste estudo.

No que concerne às contagens de bactérias lácticas, identificaram-se pequenas diferenças ao longo do processo produtivo. Uma avaliação isolada por tempo de amostragem, permite verificar que no T0 os enchidos controlo apresentaram contagens médias ($3,88 \pm 2,72$ log ufc/g) inferiores que os seus congéneres inoculados, com exceção dos associados às modalidades 2 ($5,90 \pm 1,37$ log ufc/g), e 4 ($5,08 \pm 0,87$ log ufc/g) e 5 ($6,27 \pm 1,26$ log ufc/g). No T0 a inoculação das estirpes de *Lactobacillus* tiveram um efeito ligeiro no incremento deste grupo de bactérias, por comparação com os painhos controlo. O dito efeito foi-se atenuando à medida que a cura/fumagem se foi encaminhado para o final, todavia, os painhos controlo apresentaram sempre concentrações inferiores de bactérias lácticas. Essa diferença rondou, em termos médios, 1 log ufc/g. Os resultados obtidos no presente ensaio - produto acabado - foram semelhantes aos obtidos por Cenci-Goga *et al.* (2012); Dalla Santa *et al.* (2012); Elias (2004) e Ansorena *et al.* (2002) e ligeiramente inferiores – aproximadamente 1 log ufc/g a 1,5 log ufc/g – aos obtidos por Chen *et al.* (2016); Dalla Santa *et al.* (2014); Rubio *et al.* (2014); Sayas-Barberá *et al.* (2012) e Ruiz-Moyano *et al.* (2011) que obtiveram valores entre os 8 e 9 log ufc/g. De referir que este estudo corrobora o descrito pelos autores citados, ou seja, o grupo bacteriano em análise é o que apresenta, normalmente, concentrações mais elevadas a partir dos primeiros dias de cura em enchidos e que se destacam até ao produto acabado. De uma forma geral, as contagens determinadas no T0 (pré-enchimento) aproximaram-se das por nós inoculadas.

Relativamente às contagens de *Staphylococcus* spp., observou-se, de uma forma geral, um incremento da concentração deste grupo bacteriano, ao nível estatístico, do T0 para o T5, todavia, no produto acabado as contagens de algumas modalidades aproximaram-se dos valores iniciais. No

que concerne à análise por tempos de amostragem, verificamos que no T0 não existiram diferenças entre modalidades, no T5 os painhos alocados à modalidade 3 (*L. curvatus* L2B2 10⁸) apresentaram um valor médio (2,19 ± 1,08 log ufc/g) significativamente inferior às restantes, com exceção dos associados à modalidade 5 (2,91 ± 0,09 log ufc/g). No produto acabado foram os painhos controlo (5,39 ± 0,90 log ufc/g) que apresentaram o valor médio significativamente superior às demais.

Muitos autores associam a dificuldade de *Staphylococcus* spp. em se multiplicarem à atividade das bactérias lácticas, ou seja, aos valores reduzidos de pH (Drosinos *et al.*, 2005; Mauriello *et al.*, 2004; Papamanoli *et al.*, 2002; Lizaso *et al.*, 1999). Neste caso, se observarmos os valores obtidos para o grupo bacteriano em análise no produto acabado e os valores de pH (Tabela 115), concluímos que esta premissa parece aplicar-se porque os painhos alocados às modalidades 1 e 4 foram aqueles que apresentaram valores médios mais elevados para o pH e para *Staphylococcus* spp.

Já referimos várias vezes ao longo do presente trabalho que as bactérias em questão são conhecidas pelo seu contributo para o desenvolvimento da cor característica dos enchidos, redução da oxidação lipídica e também são precursoras do *flavour* dos enchidos. Todavia, alguns autores apontam concentrações superiores a 4,0 log ufc/g no produto acabado para que as mesmas consigam atuar de forma notória no melhoramento dos atributos sensoriais dos enchidos (Casaburi *et al.*, 2007; Comi *et al.*, 2005). No corrente estudo as contagens dos painhos inoculados, no produto acabado, foram inferiores ao valor indicado, no entanto, Chen *et al.* (2016); Dalla Santa *et al.* (2014) e Drosinos *et al.* (2005) também reportaram valores inferiores ou muito próximos de 4,0 log ufc/g.

Para as contagens de enterobactérias observaram-se diferenças ao longo do processo produtivo, diferenças essas com significado estatístico. Do T0 para os restantes tempos de amostragem observaram-se reduções significativas em todas as modalidades. No que respeita à análise isolada de cada tempo de amostragem, verificamos que no T0 não existiram diferenças significativas e o mesmo se passou nos restantes tempos de amostragem. Todavia, pensamos ser importante evidenciar que no T5 os únicos painhos que apresentaram um valor inferior ao limite de deteção (<1 ufc/g) foram os inoculados com a modalidade 5 (*L. sakei* CV3C2 10⁸), e no produto acabado apenas os painhos controlo apresentaram um valor médio contável (0,28 ± 0,69 log ufc/g), o que nos parece revelar o efeito positivo das estirpes sobre a higiene dos enchidos.

Para o produto acabado, Chen *et al.* (2016) obtiveram valores médios entre 0 e 2 log ufc/g e Cenci-Goga *et al.* (2012) valores próximos dos 4 log ufc/g, ou seja, superiores aos por nós determinados.

As contagens de *L. monocytogenes* foram inferiores ao limite de deteção do método (<1 ufc/g) para todas as modalidades e em todos os tempos de amostragem. O que, mais uma vez, evidencia a

higiene das matérias-primas e do cuidado com as práticas que são levadas a cabo na empresa da Beira Baixa.

Todas as amostras avaliadas foram negativas para *Salmonella* spp.

De destacar, mais uma vez, a qualidade microbiológica da matérias-primas e ingredientes que desde o T0 não apresentaram *Salmonella* spp. nem qualquer contagem de *L. monocytogenes* (indicadores de segurança), mantendo-se o verificado nas inoculações com culturas puras de *Staphylococcus*.

5.5.3. Determinação amins biogénicas

Na Tabela 119 apresenta-se a análise de variância para os resultados das amins biogénicas, considerando o fator lote.

Tabela 119 - Análise de variância para os resultados das amins biogénicas, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Triptamina	F=1,7395 P=0,1787 ^{N.S.}
β-feniletilamina	F=0,0266 P=0,9737 ^{N.S.}
Putrescina	F=0,5034 P=0,6054 ^{N.S.}
Cadaverina	F=1,4046 P=0,2482 ^{N.S.}
Histamina	F=0,5073 P=0,6030 ^{N.S.}
Tiramina	F=1,0148 P=0,3646 ^{N.S.}
Espermidina	F=3,1453 P=0,0455*
Espermina	F=0,2142 P=0,8074 ^{N.S.}
Aminas vasoativas	F=1,2211 P=0,2974 ^{N.S.}
Total de amins	F=0,3214 P=0,7256 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *Significativo para p<0,05

A análise da Tabela 119 permite concluir que o fator lote foi significativo (p<0,05) para espermidina e não significativo (p≥0,05) para as demais variáveis estudadas. Mais uma vez, o efeito lote fez-se sentir de uma forma pouco pronunciada, neste caso apenas sobre uma das amins estudadas.

Na Tabela 120 apresenta-se a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 120 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis (mg/kg de enchido)	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=2	G.L.=8
Triptamina	F=2,3153 P=0,0596 ^{N.S.}	F=0,9922 P=0,3730 ^{N.S.}	F=0,9332 P=0,4908 ^{N.S.}
β-feniletilamina	F=180,0296 P=0,0000***	F=143,6612 P=0,0000***	F=46,1774 P=0,0000***
Putrescina	F=162,5068 P=0,0000***	F=294,2464 P=0,0000***	F=67,1295 P=0,0000***
Cadaverina	F=109,6011 P=0,0000***	F=106,4411 P=0,0000***	F=14,4881 P=0,0000***
Histamina	F=73,5835 P=0,0000***	F=132,7762 P=0,0000***	F=46,5141 P=0,0000***
Tiramina	F=0,8459 P=0,4981 ^{N.S.}	F=3,2154 P=0,0427*	F=1,8970 P=0,0638 ^{N.S.}
Espermidina	F=1,4211 P=0,2293 ^{N.S.}	F=6,3129 P=0,0023**	F=0,8887 P=0,5274 ^{N.S.}
Espermina	F=1,1570 P=0,3319 ^{N.S.}	F=4,0378 P=0,0195*	F=0,7643 P=0,6347 ^{N.S.}
Aminas vasoativas	F=7,2201 P=0,0000***	F=6,4752 P=0,0020**	F=1,8850 P=0,0657 ^{N.S.}
Total de aminas	F=35,4548 P=0,0000***	F=70,7997 P=0,0000***	F=9,6526 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$;

*** Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 120 permite concluir que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para β-feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, aminas vasoativas e total de aminas e não foi significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis. O fator tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) β-feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e total de aminas, muito significativo ($p < 0,01$) para espermidina e aminas vasoativas, significativo ($p < 0,05$) para tiramina e espermina e não significativo ($p \geq 0,05$) para triptamina. A interação entre os fatores referidos foi altamente significativa ($p < 0,001$) para β-feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e total de aminas e não significativa ($p \geq 0,05$) para as restantes aminas. O fator tempo de amostragem mostrou-se significativo sobre um número superior de aminas que o fator modalidade.

Na Tabela 121 são mostrados os valores médios e desvios padrão para as aminas biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 121 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Parâmetros (mg/kg de enchido)											
Tempo de amostragem	Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Aminavascativas	Totaldeaminas
T0	1	99,98 ±35,22	3,21 ^{B,ab} ±0,44	5,31 ^{C,b} ±0,71	15,39 ^{B,b} ±2,54	ND	3,43 ^A ±0,75	7,47 ^B ±1,63	59,59 ^B ±10,06	106,62 ±35,28	194,38 ±36,80
	2	117,06 ±42,33	3,45 ^{B,a} ±0,50	5,45 ^{C,b} ±0,56	15,26 ^{B,b} ±4,15	ND ^C	3,95 ±0,77	8,20 ^B ±2,12	61,66 ±22,34	124,46 ±42,96	215,02 ^B ±65,01
	3	89,67 ±38,64	3,04 ^{B,ab} ±0,16	7,38 ^{C,a} ±1,60	19,77 ^{B,b} ±4,30	ND ^C	3,25 ±1,30	7,30 ±2,75	54,22 ±12,30	95,96 ^B ±39,78	184,62 ^B ±54,80
	4	85,05 ±37,99	2,85 ^{B,a} ±0,39	5,25 ^{C,b} ±0,93	12,99 ^{C,b} ±1,00	ND ^C	3,68 ^A ±0,84	7,43 ^B ±2,51	62,72 ±27,57	91,57 ±38,08	179,96 ^B ±62,51
	5	95,48 ±23,74	2,95 ^{B,ab} ±0,73	5,36 ^{C,b} ±0,84	39,65 ^{B,a} ±13,61	ND ^C	3,89 ^A ±0,71	6,04 ^B ±1,02	88,86 ±69,68	102,32 ±24,15	242,23 ^B ±90,86
T5	1	97,07 ±70,39	4,39 ^{AB,c} ±1,68	10,38 ^{B,c} ±2,96	22,85 ^{A,c} ±3,11	2,76 ^{ab} ±5,95	2,73 ^{AB} ±1,28	12,08 ^B ±4,11	77,37 ^A ±22,06	106,95 ^{ab} ±76,79	229,64 ^c ±86,82
	2	138,77 ±90,17	36,62 ^{B,ab} ±19,25	50,75 ^{B,b} ±31,70	53,29 ^{A,c} ±31,91	1,13 ^{B,b} ±1,57	2,50 ±1,48	13,68 ^B ±6,20	93,44 ±52,93	179,02 ^a ±99,26	390,18 ^{A,ab} ±111,50
	3	97,23 ±53,82	58,19 ^{A,a} ±16,66	109,65 ^{B,a} ±29,77	79,03 ^{A,ab} ±30,09	5,20 ^{B,b} ±4,26	5,07 ±7,21	36,72 ±37,01	112,79 ±68,18	165,70 ^{A,ab} ±61,07	503,89 ^{A,a} ±170,06
	4	114,47 ±52,61	4,92 ^{A,c} ±1,80	12,40 ^{B,c} ±4,90	18,88 ^{B,c} ±4,14	0,99 ^{B,b} ±3,27	2,17 ^B ±0,69	13,90 ^A ±5,72	73,36 ±13,75	122,54 ^{ab} ±54,07	241,08 ^{AB,c} ±68,31
	5	81,25 ±30,62	6,23 ^{A,c} ±2,94	23,66 ^{B,c} ±6,79	92,64 ^{A,a} ±23,90	6,43 ^{B,a} ±3,61	1,96 ^B ±0,60	16,01 ^A ±7,12	91,54 ±38,93	95,88 ^b ±31,45	319,73 ^{AB,bc} ±83,65
TFinal	1	85,80 ±32,06	5,22 ^{A,c} ±2,21	20,88 ^{A,b} ±3,27	24,85 ^{A,c} ±3,14	3,92 ^c ±5,64	2,28 ^B ±0,73	20,38 ^A ±6,99	65,88 ^{AB} ±14,19	97,22 ^c ±33,81	229,21 ^c ±46,24
	2	95,27 ±27,73	45,34 ^{A,b} ±8,80	194,79 ^{A,a} ±47,42	37,08 ^{A,b} ±3,97	3,58 ^{A,c} ±1,04	3,71 ±1,88	14,88 ^A ±5,20	78,59 ±60,49	147,90 ^{ab} ±22,58	473,24 ^{A,a} ±101,64
	3	96,01 ±37,88	55,08 ^{A,a} ±6,56	189,18 ^{A,a} ±38,48	89,78 ^{A,a} ±6,02	9,20 ^{A,b} ±3,62	2,10 ±0,40	22,57 ±3,75	84,94 ±23,82	162,40 ^{A,a} ±42,19	548,87 ^{A,a} ±65,07
	4	111,28 ±42,97	4,94 ^{A,c} ±1,65	23,74 ^{A,b} ±7,66	24,06 ^{A,c} ±6,92	1,13 ^{A,c} ±1,73	2,36 ^B ±0,91	17,05 ^A ±3,69	84,72 ±21,83	119,70 ^{bc} ±41,66	269,28 ^{A,c} ±67,99
	5	80,07 ±20,05	4,96 ^{A,c} ±1,28	37,31 ^{A,b} ±8,73	84,66 ^{A,a} ±5,03	30,95 ^{A,a} ±6,62	2,66 ^B ±0,99	20,73 ^A ±4,57	87,08 ±22,57	118,64 ^{bc} ±22,51	348,42 ^{A,b} ±34,91

T0 (pré-enchimento); T5 (fase intermédia da cura); TFinal (produto acabado). 1 - Controlo com dextrose; 2 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁵ células/g); 3 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁸ células/g); 4 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁵ células/g); 5 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g). Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para p < 0,05. ND - Não detetado

A maioria das aminas sofreu incrementos à medida que a cura foi evoluindo, tal como referiram (Bover-Cid *et al.*, 2011b; Bover-Cid *et al.*, 1999).

Histamina não foi detetada no T0 (pré-enchimento), porém, nos tempos de análise que lhe sucederam, foi. Para aquela amina, foram os enchidos alocados às duas modalidades com a concentração de inoculação aproximada de 10^8 células/g de massa que apresentaram os teores mais elevados. No produto acabado os painhos que apresentaram teores mais reduzidos da amina aludida foram os alocados à modalidade 4 (*L. sakei* CV3C2 10^5), com um valor médio de $1,13 \pm 1,73$ mg/kg. Sugerindo que a concentração mais elevada terá contribuído para a atividade descarboxilativa.

Os teores obtidos para o conjunto das aminas com propriedades vasoativas, de uma forma geral, foram superiores na fase intermédia da cura e no produto acabado, mas sem significado estatístico para a maioria das modalidades. No produto acabado foram os painhos controlo aqueles que apresentaram o valor médio inferior. Entre os inoculados foram os alocados à estirpe *L. sakei* CV3C2, para as duas concentrações de inoculação usadas, que apresentaram teores mais reduzidos. Como havíamos referido no ensaio onde inoculámos culturas puras de *Lactobacillus* nos paios de porco preto Alfaia (2018) estudaram a atividade aminogénica de *L. sakei* CV3C2, que se mostrou baixo produtor de tiramina e não produtor para as restantes aminas, porém, não dispomos de informação relativa à estirpe *L. curvatus* L2B2. Posto isto, o facto dos teores de aminas com propriedades vasoativas serem ligeiramente inferiores nos enchidos controlo, pelo menos no que concerne à estirpe *L. sakei* CV3C2, não se deverá à ação da estirpe, mas a outros fatores como a microbiota presente, valores de pH, temperatura, entre outros.

Neste ensaio - produto acabado - as aminas que apresentaram os teores mais elevados, por ordem decrescente, foram triptamina, espermina e putrescina. Em sentido oposto surgiram histamina e tiramina, o que é bastante relevante, tendo em conta os efeitos toxicológicos associados às aminas aludidas e que já foram sobejamente abordados.

Já foram apresentadas as possíveis razões para triptamina ter sido a amina quantificada em teores mais elevados na discussão dos resultados obtidos nas inoculações de painhos com estirpes de *Staphylococcus*, como Vidal-Carou *et al.* (2007) referirem que concentrações elevadas de triptamina dependerão da existência de altos teores de tiramina, associados à atividade descarboxilativa de determinadas bactérias lácticas ou ECN, o que não parece verificar-se, pelo menos os altos teores de tiramina, porém, Vidal-Carou *et al.* (2015) acrescentam que a ocorrência de triptamina também poderá estar associada a diaminas (putrescina e/ou cadaverina) o que poderá ter ocorrido no presente ensaio.

Como tem sido habitual a presença das poliaminas naturais espermidina e espermina seguiu o padrão habitualmente encontrado em enchidos, ou seja, a prevalência da segunda sobre a primeira.

O conjunto das amins vasoativas não atingiu os 200 mg/kg em nenhum dos momentos de análise, o que é relevante porque é considerado o valor seguro para os consumidores e que já foi sobejamente citado no decorrer deste trabalho.

O teor global de amins biogénicas também não alcançou os 1000 mg/kg para nenhuma das modalidades, sendo aquele o valor considerado como seguro e que também já foi sobejamente citado.

Relativamente aos teores de amins biogénicas obtidos por diversos autores de diferentes países, concluímos que os resultados obtidos neste ensaio foram superiores aos de Laranjo *et al.* (2017a); Laranjo *et al.* (2016); Gomes (2016), para chouriço de carne do Alentejo; Bover-Cid *et al.* (2014) e Tasić *et al.* (2012). Todavia, no que concerne aos teores de amins vasoativas sucedeu o contrário, isto é, dos autores citados, apenas Laranjo *et al.* (2017a) e Tasić *et al.* (2012) produziram enchidos com teores inferiores para o grupo de amins mencionado. As razões para o referido poderão estar associadas às características específicas do produto e às condições do processamento em geral, que poderão limitar a atividade descarboxilativa da microbiota sobre os aminoácidos percursores das amins com propriedades vasoativas.

Na Tabela 122 apresentam-se as percentagens de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os painhos controlo e os inoculados.

Tabela 122 - Percentagens de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os painhos controlo e os inoculados.

Modalidade	% de Redução									Total de amins
	Triptamina	β -Feniletiamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina	Amins vasoativas	
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	NR	NR	NR	NR	8,67	NR	26,99	NR	NR	NR
3	NR	NR	NR	NR	NR	7,89	NR	NR	NR	NR
4	NR	5,36	NR	3,18	71,17	NR	16,34	NR	NR	NR
5	6,68	4,98	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^5 células/g); **3** - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^8 células/g); **4** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^5 células/g); **5** - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g).

O conjunto das amins vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletiamina, histamina e tiramina.

NR - Não ocorreu redução

De uma forma geral, verifica-se que as estirpes não tiveram um efeito concreto na redução dos teores das amins biogénicas estudadas. Por exemplo, os teores globais e o grupo das vasoativas apresentaram teores médios superiores aos painhos inoculados.

No que respeita à estirpe que, ainda assim, teve uma influência menor sobre o desenrolar da aminogénese, terá sido *L. sakei* CV3C2. Os enchidos alocados à estirpe aludida, na concentração 10^5 células/g de massa, foram aqueles onde a percentagem de redução foi superior para β -feniletilamina (5,36%), cadaverina (3,18%) e histamina (71,17%). Como acima referido, apenas dispomos dos resultados da atividade descarboxilase da estirpe aludida, ou seja, não dispomos de resultados para *L. curvatus* L2B2, que apenas foi classificada como moderada para tiramina, ou seja, a estirpe em causa não apresentou aquela atividade para as restantes aminas estudadas no corrente ensaio (Alfaia *et al.*, 2018).

5.5.4. Parâmetros da cor

Na Tabela 123 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Tabela 123 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
L*	F=0,8070 P=0,4481 ^{N.S.}
a*	F=0,7534 P=0,4726 ^{N.S.}
b*	F=1,5440 P=0,2170 ^{N.S.}
c*	F=1,3485 P=0,2628 ^{N.S.}
H°	F=0,5159 P=0,5980 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo

Observando a Tabela 123 conclui-se que o fator lote não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas. Mais uma vez, segue a tendência verificada para o grupo de variáveis que analisámos e discutimos, até ao momento, para o corrente ensaio.

Na Tabela 124 mostra-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Tabela 124 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator	
	Modalidade	
	G.L.=4	
L*	F=3,6160 P=0,0077**	
a*	F=1,2462 P=0,2941 ^{N.S.}	
b*	F=1,2291 P=0,3011 ^{N.S.}	
C*	F=1,4004 P=0,2368 ^{N.S.}	
H°	F=1,0006 P=0,4094 ^{N.S.}	

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ** Significativo para p<0,01

A análise da Tabela 124 permite inferir que o fator modalidade foi muito significativo (p<0,01) para L*, não sendo significativo (p≥0,05) para as restantes variáveis.

Na Tabela 125 são apresentados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 125 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros				
		L*	a*	b*	C*	H°
TFinal (produto acabado)	1	51,94 ^{ab} ±7,75	15,41±4,03	12,33±4,24	19,94±5,07	38,37±8,66
	2	51,29 ^{ab} ±5,47	16,89±3,02	13,01±3,68	21,45±4,12	37,13±6,54
	3	50,52 ^{ab} ±4,92	17,08±3,02	13,97±4,78	22,30±4,56	38,49±8,66
	4	53,34 ^a ±6,21	16,38±3,51	13,82±4,73	21,65±4,99	39,41±9,52
	5	47,90 ^b ±4,03	16,20±2,18	12,02±3,87	20,32±3,72	35,69±6,79

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁵ células/g); 3 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁸ células/g); 4 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁵ células/g); 5 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g).

Na mesma coluna, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

Após análise da Tabela 125 pode afirmar-se que existiram diferenças significativas apenas para o parâmetro L*, todavia, só existiram diferenças significativas entre as modalidades inoculadas com *L. sakei* CV3C2, cabendo o valor estatisticamente (47,90 ± 4,03) mais reduzido aos painhos alocados à modalidade 5, que foi inoculada com a concentração mais elevada (10⁸ células/g de massa). O descrito indica-nos que os painhos alocados à modalidade citada foram mais escuros que os da sua congénere número 4 (53,34 ± 6,21).

Os painhos inoculados, apesar de não existirem diferenças significativas, apresentaram cores ligeiramente mais vermelhas, fortes e brilhantes que os controle.

Chen *et al.* (2016); Sayas-Barberá *et al.* (2012); Gøtterup *et al.* (2008) e Casaburi *et al.* (2007) em enchidos prontos a consumir, obtiveram valores de a^* mais elevados nos enchidos inoculados que nos controle. Os autores associaram os valores mais elevados ao teor de nitrosomioglobina que aumentou exponencialmente no início da fermentação pela ação da atividade de nitrato e nitrito redutase da microbiota e, em seguida, permaneceu quase constante.

5.5.5. Parâmetros reológicos

Na Tabela 126 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Tabela 126 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Dureza (N)	F=0,5222 P=0,5943 ^{N.S.}
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=0,2154 P=0,8065 ^{N.S.}
Coesividade	F=2,4015 P=0,0941 ^{N.S.}
Elasticidade	F=0,8910 P=0,4124 ^{N.S.}
Resiliência	F=0,0585 P=0,9431 ^{N.S.}
Mastigabilidade (N)	F=0,6570 P=0,5199 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo

Observando a Tabela 126 constata-se que o fator lote não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas, reforçando a baixa influência dos lotes sobre os resultados obtidos.

Na Tabela 127 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Tabela 127 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Dureza (N)	F=5,8730 P=0,0000***
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=4,8592 P=0,0010**
Coesividade	F=1,6446 P=0,1662 ^{N.S.}
Elasticidade	F=1,8862 P=0,1160 ^{N.S.}
Resiliência	F=0,2766 P=0,0000***
Mastigabilidade (N)	F=5,2941 P=0,0005***

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

Analisando a Tabela 127 pode-se inferir que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para dureza, resiliência e mastigabilidade, muito significativo ($p < 0,01$) para adesividade e não significativo ($p \geq 0,05$) para coesividade e elasticidade.

Na Tabela 128 mostram-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 128 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Dureza (N)	46,442 ^b ±18,741	51,382 ^b ±21,057	52,205 ^b ±13,910	47,582 ^b ±14,885	66,810 ^a ±22,147
Adesividade (N.s ⁻¹)	-0,422 ^b ±0,333	-0,430 ^b ±0,454	-0,848 ^a ±0,585	-0,304 ^b ±0,290	-0,493 ^{ab} ±0,759
Coesividade	0,644±0,042	0,643±0,052	0,628±0,037	0,654±0,041	0,646±0,032
Elasticidade	0,943±0,330	0,859±0,092	0,838±0,059	0,867±0,043	0,868±0,052
Resiliência	0,190 ^a ±0,026	0,184 ^a ±0,028	0,160 ^b ±0,021	0,195 ^a ±0,030	0,180 ^a ±0,026
Mastigabilidade (N)	27,551 ^b ±12,218	28,067 ^b ±10,580	27,545 ^b ±8,419	26,913 ^b ±8,528	37,318 ^a ±12,001

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^5 células/g); 3 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10^8 células/g); 4 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^5 células/g); 5 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

Observando a Tabela 128 verifica-se que os painhos alocados à modalidade 5 (*L. sakei* CV3C2 10^8) foram significativamente ($66,810 \pm 22,147$ N) mais duros e exibiram um valor médio superior para mastigabilidade ($37,318 \pm 12,001$ N).

Relativamente ao parâmetro adesividade, verifica-se que a modalidade 3 (*L. curvatus* L2B2 10⁸) apresentou painhos significativamente ($-0,848 \pm 0,585 \text{ N.s}^{-1}$) mais adesivos que as restantes modalidades, com exceção da modalidade 5 ($-0,493 \pm 0,759 \text{ N.s}^{-1}$) e significativamente ($0,160 \pm 0,021$) menos resilientes que as restantes.

As inoculações promoveram um aumento da dureza dos enchidos, resultados semelhantes foram obtidos por Chen *et al.* (2016) e Ordóñez *et al.* (1999). Este aumento da dureza, provavelmente, estará associado à ação do ácido produzido pelas bactérias lácticas que terá contribuído para a coagulação proteica.

5.5.6. Análise sensorial

Na Tabela 129 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da análise sensorial, considerando o fator lote.

Tabela 129 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Intensidade da cor	F=2,2253 P=0,1126 ^{N.S.}
Cores estranhas	F=1,8404 P=0,1633 ^{N.S.}
Marmoreado	F=0,8629 P=0,4246 ^{N.S.}
Intensidade do aroma	F=0,4991 P=0,6084 ^{N.S.}
Aromas estranhos	F=4,3686 P=0,0148*
Dureza	F=3,0252 P=0,0524 ^{N.S.}
Fibrosidade	F=5,1914 P=0,0069**
Suculência	F=1,6410 P=0,1983 ^{N.S.}
Intensidade do sabor	F=1,8920 P=0,1554 ^{N.S.}
Sabores negativos	F=3,0038 P=0,0534 ^{N.S.}
Intensidade da salga	F=0,4476 P=0,6403 ^{N.S.}
Apreciação global	F=1,5988 P=0,2065 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$

Relativamente aos resultados apresentados na Tabela 129 conclui-se que o fator lote foi muito significativo ($p < 0,01$) para fibrosidade, significativo ($p < 0,05$) para aromas estranhos e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis, seguindo a tendência até aqui verificada para as variáveis já analisadas e discutidas.

Na Tabela 130 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros da análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Tabela 130 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade G.L.=4
Intensidade da cor	F=1,9568 P=0,1058 ^{N.S.}
Cores estranhas	F=1,5645 P=0,1885 ^{N.S.}
Marmoreado	F=1,5151 P=0,2024 ^{N.S.}
Intensidade do aroma	F=1,6066 P=0,1773 ^{N.S.}
Aromas estranhos	F=1,1654 P=0,3298 ^{N.S.}
Dureza	F=1,4456 P=0,2235 ^{N.S.}
Fibrosidade	F=2,8756 P=0,0259*
Suculência	F=0,4144 P=0,7979 ^{N.S.}
Intensidade do sabor	F=1,1261 P=0,3477 ^{N.S.}
Sabores negativos	F=0,6440 P=0,6322 ^{N.S.}
Intensidade da salga	F=1,3224 P=0,2658 ^{N.S.}
Apreciação global	F=0,7043 P=0,5906 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$

Relativamente aos resultados apresentados na Tabela 130, verificamos que o fator modalidade foi significativo ($p < 0,05$) para a fibrosidade e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis.

Na Tabela 131 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Tabela 131 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com *Lactobacillus*.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Intensidade da cor	56,04 ± 10,28	58,92 ± 10,94	62,80 ± 9,55	62,68 ± 9,03	59,85 ± 9,99
Cores estranhas	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,38 ± 1,96	1,00 ± 3,25	0,00 ± 0,00
Marmoreado	56,11 ± 16,18	55,50 ± 17,96	48,65 ± 17,51	61,05 ± 16,85	51,70 ± 17,56
Intensidade do aroma	65,15 ± 11,59	68,96 ± 9,65	62,58 ± 8,06	63,55 ± 8,47	65,40 ± 10,39
Aromas estranhos	2,35 ± 5,20	1,54 ± 3,40	0,96 ± 2,46	1,59 ± 5,21	0,00 ± 0,00
Dureza	55,31 ± 9,09	60,46 ± 10,61	60,42 ± 10,02	59,68 ± 6,34	58,55 ± 7,98
Fibrosidade	42,69 ^{ab} ± 20,54	49,65 ^a ± 25,13	38,46 ^{ab} ± 24,81	35,04 ^{ab} ± 21,71	28,35 ^b ± 19,63
Suculência	55,35 ± 12,67	55,12 ± 11,91	54,54 ± 16,76	58,50 ± 15,19	53,90 ± 15,66
Intensidade do sabor	61,73 ± 9,37	66,12 ± 8,55	65,88 ± 7,78	65,36 ± 11,47	62,40 ± 11,25
Sabores negativos	7,73 ± 9,59	6,23 ± 8,72	5,35 ± 8,99	7,36 ± 14,90	3,27 ± 6,14
Intensidade da salga	58,73 ± 8,05	61,12 ± 7,61	61,85 ± 8,29	57,82 ± 5,43	60,80 ± 5,92
Apreciação global	55,96 ± 9,69	56,35 ± 9,61	57,80 ± 13,17	59,95 ± 11,56	59,90 ± 9,72

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁵ células/g); 3 - *Lactobacillus curvatus* L2B2 (10⁸ células/g); 4 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁵ células/g); 5 - *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

Após análise da Tabela 131 infere-se que apenas o parâmetro fibrosidade apresentou diferenças significativas. Neste caso, os painhos inoculados com a modalidade 2 (*L. curvatus* L2B2 10⁵) foram significativamente (49,65 ± 25,13) mais fibrosos que os alocados à modalidade 5 (*L. sakei* CV3C2 10⁸), com o valor médio 28,35 ± 19,63, não havendo diferenças significativas entre as restantes modalidades.

Julgamos que um parâmetro como a fibrosidade dependerá, essencialmente, das características da matéria-prima utilizada e não da utilização das estirpes.

Pensamos ser importante referir que, apesar de não terem existido diferenças significativas, a modalidade 5 foi a única onde o painel não detetou aromas estranhos, a que apresentou menores sabores negativos e, conjuntamente com a sua congénere com menor concentração, aquela que apresentou valores médios de apreciação global mais elevados.

Todas as modalidades inoculadas apresentaram painhos mais duros - indo ao encontro do determinado nos ensaios reológicos -, com maior intensidade de cor, maior intensidade de sabor e maior apreciação global que os painhos controlo. Julgamos poder afirmar que, de uma forma geral, as estirpes tiveram um efeito ligeiramente melhorador sobre as características sensoriais dos painhos.

5.5.7. Principais conclusões do ensaio

No produto acabado, para o pH, concluímos que os painhos inoculados apresentaram valores médios mais reduzidos que os controlo, todavia, a estirpe *L. curvatus* L2B2, independentemente da concentração inoculada, destacou-se, porque apresentou painhos com valores médios significativamente inferiores aos enchidos controlo. De referir que no T0 (pré-enchimento) os enchidos inoculados com a concentração 10^8 células/g massa, independentemente da estirpe, apresentaram valores médios significativamente inferiores aos não inoculados. Para a a_w , no produto acabado, os painhos inoculados com *L. sakei* CV3C2, 10^5 células/g de massa, apresentaram um valor médio significativamente inferior aos paos controlo.

As inoculações contribuíram para a redução das contagens de enterobactérias, porque no produto acabado apenas os painhos controlo apresentaram um valor médio contável ($0,28 \pm 0,69$ log ufc/g). Todavia, pensamos ser importante evidenciar que na fase intermédia da cura (T5) os únicos enchidos que apresentaram um valor inferior ao limite de deteção do método (<1 ufc/g) para enterobactérias foram os inoculados com a estirpe *L. sakei* CV3C2 10^8 células/g massa.

De salientar, mais uma vez, a qualidade microbiológica da matéria-prima e ingredientes que desde o T0 não apresentaram *Salmonella* spp. nem qualquer contagem detetável pelo método utilizado para *L. monocytogenes* (indicadores de segurança).

De uma forma geral, verifica-se que as estirpes não tiveram um efeito concreto na redução dos teores de amins biogénicas. No produto acabado os teores de amins vasoativas dos painhos inoculados foram superiores aos dos painhos controlo, ainda que sem significado estatístico para os enchidos inoculados com a estirpe *L. sakei* CV3C2. No que respeita à estirpe que, ainda assim, teve uma influência menor sobre o desenrolar da aminogénese, terá sido *L. sakei* CV3C2. Os enchidos alocados à estirpe aludida, na concentração 10^5 células/g de massa, foram aqueles onde a percentagem de redução foi superior para β -feniletilamina (5,36%), cadaverina (3,18%) e histamina (71,17%) e também foram os que apresentaram teores totais de amins inferiores entre os inoculados.

Ao nível dos atributos sensoriais, os paos inoculados com a estirpe *L. sakei* CV3C2 10^8 foram os únicos onde o painel não detetou aromas estranhos, os que apresentaram menores sabores negativos e, conjuntamente com os da sua congénere com menor concentração inoculada (10^5 células/g de massa), aqueles que apresentaram valores médios de apreciação global mais elevados.

Tendo em conta a globalidade dos parâmetros estudados, concluímos que a estirpe que teve um efeito benéfico mais abrangente sobre os painhos da Beira Baixa foi *L. sakei* CV3C2, na concentração

10^8 células/g de massa. Consideramos, portanto, a estirpe mencionada aquela que terá melhores condições para fazer parte integrante da cultura mista a inocular nos painhos da Beira Baixa.

5.6. Ensaio de inoculação em painhos da Beira Baixa com culturas mistas

Tendo como base os resultados obtidos quando inoculadas culturas puras (5.4 e 5.5), concluímos que aqueles, de uma forma geral, foram mais positivos nos painhos alocados às estirpes *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2. Para além disso, a concentração 10^8 células/g de massa também foi a escolhida exatamente pelas mesmas razões apontadas para as estirpes. Optámos, ainda, por testar estirpes patenteadas que já tinham provado ter um papel melhorador em enchido de outras fábricas, estudados há alguns anos atrás. Para além do referido, ainda introduzimos mais um tempo de amostragem aos habituais 3 (T0, T5 e produto acabado), isto é, o T2 (48 horas após o enchimento na antecâmara do fumeiro). A inclusão deste novo tempo de amostragem teve como objetivo a multiplicação mais facilitada das estirpes, pois se estas forem sujeitas de imediato à ação do fumo e a temperaturas elevadas terão, teoricamente, maiores dificuldades em se manterem ativas. Em função do descrito, os tempos de amostragem neste ensaio foram T0, T2, T7 e produto acabado (38-40% de perda de peso inicial).

5.6.1. Parâmetros físico-químicos (pH e a_w)

Na Tabela 132 apresenta-se a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Tabela 132 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
pH	F=1,7474 P=0,4845 ^{N.S.}
a_w	F=0,4845 P=0,6163 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo

Observando a Tabela 132 conclui-se que o fator lote não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas. Revelando padronização dos processos produtivos e das características físico-químicas das matérias-primas.

Na Tabela 133 é apresentada a análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 133 - Análise de variância para os resultados do pH e da a_w , considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=3	G.L.=12
pH	F=78,9910 P=0,0000***	F=737,8700 P=0,0000***	F=3,4204 P=0,0001***
a_w	F=8,1824 P=0,0000***	F=2352,6250 P=0,0000***	F=5,4004 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: *** Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 133 permite perceber que os dois fatores foram altamente ($p < 0,001$) significativos para o pH e a a_w , assim como a interação entre ambos.

Na Tabela 134 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Tabela 134 - Valores médios e desvios padrão para o pH e a a_w obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Tempo de amostragem	Modalidade	Parâmetros	
		pH	a_w
T0	1	5,78 ^{A,a} ±0,10	0,975 ^{A,a} ±0,009
	2	5,47 ^{A,b} ±0,22	0,974 ^{A,ab} ±0,012
	3	5,43 ^{A,b} ±0,20	0,968 ^{A,bc} ±0,005
	4	5,47 ^{A,b} ±0,23	0,964 ^{A,bc} ±0,008
	5	5,48 ^{A,b} ±0,21	0,961 ^{A,d} ±0,006
T2	1	5,59 ^{B,a} ±0,03	0,950 ^{B,b} ±0,004
	2	5,33 ^{B,bc} ±0,11	0,963 ^{B,a} ±0,012
	3	5,30 ^{B,c} ±0,09	0,965 ^{A,a} ±0,017
	4	5,30 ^{B,bc} ±0,06	0,962 ^{A,a} ±0,011
	5	5,35 ^{B,b} ±0,07	0,953 ^{B,b} ±0,009
T7	1	5,08 ^{C,a} ±0,07	0,915 ^{C,ab} ±0,009
	2	4,97 ^{C,b} ±0,04	0,914 ^{C,ab} ±0,007
	3	4,95 ^{C,b} ±0,04	0,915 ^{B,ab} ±0,013
	4	4,97 ^{C,b} ±0,03	0,919 ^{B,a} ±0,005
	5	4,98 ^{C,b} ±0,05	0,912 ^{C,b} ±0,014
TFinal	1	5,12 ^{C,a} ±0,18	0,876 ^D ±0,006
	2	4,92 ^{C,b} ±0,08	0,880 ^D ±0,008
	3	4,92 ^{C,b} ±0,11	0,879 ^C ±0,003
	4	4,96 ^{C,b} ±0,12	0,881 ^C ±0,015
	5	4,95 ^{C,b} ±0,08	0,877 ^D ±0,014

T0 (pré-enchimento); **T2** (48 h após o enchimento); **T7** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).
1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g). Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A análise da Tabela 134 permite inferir que relativamente aos valores médios obtidos para o pH houve diferenças significativas ao longo do tempo de amostragem e entre modalidades, havendo uma redução dos mesmos à medida que a cura se foi efetivando.

No T0 (pré-enchimento) os painhos alocados à modalidade 1 (controlo) apresentaram um valor médio ($5,78 \pm 0,10$) significativamente superior aos inoculados, entre os últimos não existiram diferenças significativas. Verificando-se exatamente o mesmo no T2 (48 horas após o enchimento na antecâmara do fumeiro), significado isto, portanto, que o facto de se manterem os painhos, depois do enchimento, a temperaturas próximas dos 20°C permitiu que as estirpes se continuassem a multiplicar de forma notória, permitindo que os valores médios do pH (produção de ácido) se reduzissem de forma significativa por comparação com os controlo. Hugas & Monfort (1997) e Hammes *et al.* (1990) referem que a boa adaptação das bactérias lácticas às condições existentes nas massas, podem contribuir, principalmente, para a rápida multiplicação daquelas bactérias. A rápida multiplicação das bactérias lácticas é relevante na produção de enchidos, pois leva à metabolização do açúcar com consequente formação de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, que promove a diminuição o pH. A diminuição do pH é essencial, pois contribui para o desenvolvimento de sabor, cor e aroma característicos, bem como para a estabilidade microbiológica do produto. Mais à frente, nos resultados referentes aos parâmetros microbiológicos (Tabela 137), veremos que no T0 as bactérias lácticas apresentaram contagens significativamente superiores nos painhos inoculados. Na fase intermédia da cura (T7) os valores de pH reduziram-se de forma considerável em todas as modalidades. No produto acabado, os enchidos controlo mantiveram-se com o pH médio significativamente mais elevado ($5,12 \pm 0,18$) e não existiram diferenças entre as modalidades inoculadas. É de destacar que os painhos inoculados apresentaram valores médios inferiores a 5,0.

Cadavez *et al.* (2016) produziram salpicão em duas fábricas do nordeste português, na primeira não foram usados aditivos e na segunda, foram. Em ambas recorreram à fumagem tradicional e não inocularam culturas de arranque. Bem sabemos que o salpicão é produzido com o lombo do porco e não com recurso a carnes e gorduras picadas, todavia, apresentamos os resultados destes autores porque também foram usadas temperaturas de fumagem próximas dos 50 °C, condições semelhantes às quais os painhos estiveram sujeitos. Os resultados que iremos indicar são relativos à fábrica onde foram usados aditivos. O valor médio de pH determinado pelos autores após a etapa de maceração - antes do enchimento - foi de $6,318 \pm 0,059$, na fase intermédia da cura que, neste caso, foi após a etapa de fumagem, o valor baixou ligeiramente para $6,260 \pm 0,045$ e no produto acabado foi de $6,116 \pm 0,045$. Lorenzo *et al.* (2014) produziram enchidos espanhóis com recurso a gordura de porco e carne de cavalo e adicionaram 2% de lactose + 2% de dextrina. Os autores inocularam várias estirpes

microbianas, mas não apresentam a concentração inoculada, no entanto, só iremos apresentar os resultados para os enchidos controlo e inoculados com TRADI 302 (*L. sakei*, *S. carnosus* e *S. xylosus*). Imediatamente antes do enchimento, determinaram valores médios de $5,79 \pm 0,02$ e $5,41 \pm 0,07$ para os enchidos controlo e inoculados, respetivamente. Na fase intermédia da cura ambos se reduziram, neste caso para $5,35 \pm 0,08$ e $5,21 \pm 0,06$, respetivamente, e no produto acabado subiram ligeiramente para $5,43 \pm 0,07$ e $5,30 \pm 0,09$, respetivamente. Andrade *et al.* (2010) produziram *salchichón* espanhol inoculado com diversas estirpes de *D. hansenii*, na concentração aproximada de 10^6 células/g de massa e os autores adicionaram dextrina, dextrose e lactose, mas não referem as percentagens porque os açúcares vinham preparados num *mix* comercial. Apresentamos os resultados relativos aos enchidos controlo e inoculados com cultura mista composta por três estirpes de leveduras (Dh B + Dh C + Dh D). Os autores apenas apresentaram resultados para a etapa pré-enchimento e para o produto acabado. Antes do enchimento obtiveram 5,95 e 6,05 para os enchidos controlo e inoculados, respetivamente, e no produto acabado 5,86 e 5,82, respetivamente para os enchidos controlo e inoculados. Significando, portanto, que para ambas as modalidades este parâmetro reduziu-se no final do processo por comparação com a fase inicial.

Os resultados obtidos no presente ensaio foram claramente inferiores aos apresentados pelos autores citados, para Cadavez *et al.* (2016), provavelmente, pela natureza do produto, para Andrade *et al.* (2010) porque os autores inocularam estirpes de leveduras e Lorenzo *et al.* (2014), provavelmente, porque as estirpes inoculadas no corrente ensaio se conseguiram adaptar melhor ao meio e assim promover a metabolização dos açúcares fermentescíveis adicionados de uma forma mais eficaz. O facto dos painhos ficarem 48 horas na antecâmara do fumeiro a temperaturas próximas dos 20 °C também terá tido um papel fulcral na atividade das bactérias lácticas, e consequentemente no pH.

Para a_w observaram-se diferenças ao longo do processo produtivo e entre modalidades. Os valores foram sendo menores à medida que se efetivou a cura. No T0 (pré-enchimento) os valores médios rondaram os 0,965 para os painhos inoculados e 0,975 para os controlo. No T2 reduziram-se significativamente para próximos de 0,965 nos inoculados e 0,950 nos controlo. Na fase intermédia da cura (T7) ficaram todos muito próximos de 0,915 e no produto acabado em torno dos 0,880, ou seja, no produto acabado não existiram diferenças com significado estatístico entre modalidades.

O valor 0,880 obtido no produto acabado foi um valor aceitável que não pôs em causa a estabilidade microbiana e a qualidade geral dos painhos, uma vez que Hierro *et al.* (2015) apontam valores inferiores a 0,90 para a a_w e a 5,5 para o pH, como sendo os indicados para manter um elevado nível de higiene alimentar em enchidos. Leistner & Roedel (1975) referiram que produtos com um $\text{pH} \leq 5,2$ e $a_w \leq 0,95$ ou somente $\text{pH} < 5,0$ ou $a_w < 0,91$ são produtos estáveis que não necessitam de

temperaturas de refrigeração para se manterem estáveis. Já havíamos citado os últimos autores nas análises e discussões dos resultados referente aos ensaios anteriores.

O descrito permite-nos inferir que as estirpes não tiveram um efeito notório sobre a redução da a_w dos painhos. A introdução do T2 dificilmente teria algum efeito sobre aquele parâmetro, atendendo à precocidade da cura naquele momento. Em relação ao pH, as estirpes conseguiram metabolizar a dextrose alimentar adicionada e, desse modo, produzir ácido que contribuiu para valores significativamente mais reduzidos de pH. É de salientar, como já foi mencionado ao logo do presente trabalho, que no início da fermentação valores de pH inferiores poderão trazer benefícios principalmente a nível sanitário.

5.6.2. Parâmetros microbiológicos

Na Tabela 135 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Tabela 135 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Mesófilos	F=4,7900 P=0,0100*
Psicrotróficos	F=7,2436 P=0,0011**
Bactérias láticas	F=1,7261 P=0,1825 ^{N.S.}
<i>Staphylococcus spp.</i>	F=5,3024 P=0,0062**
Enterobactérias	F=0,3557 P=0,7015 ^{N.S.}
Bolores	F=8,9976 P=0,0002***
Leveduras	F=0,3076 P=0,7358 ^{N.S.}
<i>L. monocytogenes</i>	F=2,0163 P=0,1377 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; **Significativo para $p < 0,01$;

***Significativo para $p < 0,001$

Relativamente aos resultados indicados na Tabela 135 conclui-se que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para as contagens de bolores, muito significativo ($p < 0,01$) para microrganismos psicrotróficos e *Staphylococcus spp.*, significativo ($p < 0,05$) para mesófilos e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis estudadas.

Os resultados da análise de variância refletem a utilização de matérias-primas de lotes diferentes, tripas que podem apresentar calibres ligeiramente distintos, entre outros fatores que podem condicionar a multiplicação microbiana.

Na Tabela 136 está indicada a análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 136 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros microbiológicos, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis	Fatores		
	Modalidade	Tempo de amostragem	Modalidade x Tempo de amostragem
	G.L.=4	G.L.=3	G.L.=12
Mesófilos	F=13,3003 P=0,0000***	F=30,9638 P=0,0000***	F=1,3622 P=0,1868 ^{N.S.}
Psicrotróficos	F=9,9053 P=0,0000**	F=31,3784 P=0,0000***	F=1,5639 P=0,1146 ^{N.S.}
Bactérias lácticas	F=20,7683 P=0,0000***	F=47,5361 P=0,0000***	F=6,3831 P=0,0000***
<i>Staphylococcus</i> spp.	F=9,9099 P=0,0000***	F=45,5307 P=0,0000***	F=6,2395 P=0,0001***
Enterobactérias	F=1,7002 P=0,1559 ^{N.S.}	F=599,8499 P=0,0000***	F=3,3494 P=0,0004***
Bolores	F=1,0548 P=0,3830 ^{N.S.}	F=21,4769 P=0,0000***	F=0,7083 P=0,7401 ^{N.S.}
Leveduras	F=4,4454 P=0,0024**	F=338,9017 P=0,0000***	F=9,7003 P=0,000***
<i>L. monocytogenes</i>	F=1,9963 P=0,1054 ^{N.S.}	F=0,6779 P=0,5676 ^{N.S.}	F=0,6679 P=0,7689 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 136 permite inferir que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para as contagens de microrganismos mesófilos, bactérias lácticas e *Staphylococcus* spp., muito significativo ($p < 0,01$) para microrganismos psicrotróficos e leveduras e não significativo ($p \geq 0,05$) para as demais variáveis. O fator tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as variáveis, com exceção das contagens de *L. monocytogenes* para a qual não foi significativo ($p \geq 0,05$). A interação modalidade x tempo de amostragem foi altamente significativa ($p < 0,001$) para as contagens de bactérias lácticas, *Staphylococcus* spp., enterobactérias e leveduras e não foi significativa ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis. O fator tempo de amostragem teve uma influência superior na microbiota dos painhos, por comparação com a modalidade de inoculação.

Na Tabela 137 estão indicados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Tabela 137 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros microbiológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Parâmetros										
Tempo de amo.	Modalidade	Mesófilos	Psicrotróficos	Bactérias lácticas	<i>Staphylococcus</i> spp.	Enterobactérias	Bolores	Leveduras	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
T0	1	5,85 ^{C,c} ±0,36	5,92 ^{C,b} ±0,40	2,91 ^{B,b} ±1,56	3,30 ^c ±0,42	4,43 ^A ±0,50	1,55 ^A ±1,63	3,59 ^{A,b} ±0,46	5,00 ±8,37	ND
	2	6,69 ^{B,b} ±0,27	6,40 ^{B,ab} ±0,52	6,53 ^{B,a} ±0,38	5,42 ^{A,ab} ±0,51	4,42 ^A ±0,12	1,87 ^A ±1,13	3,76 ^{A,ab} ±0,42	< 1	ND
	3	7,20 ^{B,ab} ±0,52	6,72 ^{B,a} ±0,23	7,00 ^{B,a} ±0,58	5,04 ^b ±1,11	5,09 ^A ±0,94	1,70 ±1,97	4,19 ^{A,ab} ±0,09	< 1	ND
	4	7,21 ^{B,ab} ±0,33	7,11 ^a ±0,36	7,14 ^{B,a} ±0,42	6,29 ^{A,a} ±0,58	5,12 ^A ±0,77	2,25 ^A ±1,22	3,93 ^{A,ab} ±0,36	< 1	ND
	5	7,27 ^{B,a} ±0,22	7,02 ^{B,a} ±0,45	7,30 ^a ±0,51	6,44 ^{A,a} ±0,27	4,83 ±0,39	1,64 ±1,80	4,38 ^{A,a} ±0,24	< 1	ND
T2	1	7,03 ^{B,c} ±0,38	6,77 ^{B,b} ±0,37	7,15 ^{A,c} ±0,39	4,10 ^b ±0,51	2,58 ^{B,b} ±0,28	0,33 ^{AB} ±0,54	0,92 ^{B,b} ±1,02	<1	ND
	2	8,04 ^{A,b} ±0,24	8,11 ^{A,a} ±0,33	8,03 ^{A,b} ±0,28	5,51 ^{A,b} ±0,61	3,44 ^{B,ab} ±0,39	1,33 ^{AB} ±1,28	3,54 ^{A,a} ±0,40	<1	ND
	3	8,13 ^{A,b} ±0,17	8,19 ^{A,a} ±0,15	8,03 ^{AB,b} ±0,12	5,42 ^b ±1,03	3,61 ^{B,a} ±0,48	<1	3,93 ^{A,a} ±0,20	<1	ND
	4	8,12 ^{AB,b} ±0,23	8,00 ^a ±0,55	8,11 ^{AB,ab} ±0,18	6,55 ^{A,ab} ±0,50	4,06 ^{A,a} ±0,90	0,57 ^B ±0,99	3,52 ^{B,a} ±0,26	<1	ND
	5	9,07 ^{A,a} ±0,73	8,43 ^{A,a} ±0,46	8,78 ^a ±0,75	6,83 ^{A,a} ±0,75	3,63 ^{B,a} ±0,54	0,38 ±0,94	3,96 ^{B,a} ±0,33	<1	ND
T7	1	7,91 ^A ±0,88	7,63 ^A ±0,68	8,06 ^A ±0,93	3,66 ±0,69	< 1 ^C	< 1 ^B	0,46 ^B ±1,13	< 1	ND
	2	8,44 ^A ±0,87	8,43 ^A ±0,91	8,69 ^A ±1,28	3,86 ^B ±1,05	< 1 ^C	< 1 ^B	< 1 ^B	< 1	ND
	3	8,32 ^A ±1,08	8,10 ^A ±1,31	8,71 ^A ±1,25	4,15 ±1,68	< 1 ^C	< 1	< 1 ^B	< 1	ND
	4	8,61 ^A ±0,57	8,26 ±0,87	8,50 ^A ±0,57	3,78 ^B ±0,49	< 1 ^B	< 1 ^B	< 1 ^C	< 1	ND
	5	8,14 ^{AB} ±0,48	7,60 ^{AB} ±0,34	7,85 ±0,27	3,40 ^B ±0,50	< 1 ^C	< 1	< 1 ^C	< 1	ND
TFinal	1	7,26 ^{AB} ±0,15	7,18 ^{AB} ±0,27	7,32 ^A ±0,23	4,19 ±1,01	0,86 ^C ±1,33	< 1 ^B	0,88 ^B ±1,42	1,66 ±4,08	ND
	2	7,98 ^A ±0,28	7,82 ^A ±0,48	8,01 ^A ±0,25	4,12 ^{AB} ±1,43	< 1 ^C	< 1 ^B	0,74 ^B ±1,15	< 1	ND
	3	7,95 ^{AB} ±0,21	7,71 ^{AB} ±0,36	8,01 ^{AB} ±0,18	4,12 ±1,25	< 1 ^C	< 1	0,17 ^B ±0,41	< 1	ND
	4	8,39 ^A ±0,91	8,17 ±1,03	8,38 ^A ±0,96	3,55 ^B ±0,44	< 1 ^B	< 1 ^B	< 1 ^C	< 1	ND
	5	8,57 ^{AB} ±1,64	7,77 ^{AB} ±0,75	8,61 ±1,66	3,51 ^B ±0,46	< 1 ^C	< 1	< 1 ^C	< 1	ND

T0 (pré-enchimento); **T2** (48 h após o enchimento); **T7** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g).

Listeria monocytogenes apresenta-se em ufc/g. Os restantes parâmetros contáveis apresentam-se em log ufc/g. Os valores indicados para *Salmonella* spp. referem-se ao número de resultados positivos em 6 amostras.

<1 - Contagens inferiores a uma unidade formadora de colónia por grama (ufc/g).

ND - Não detetado (ausência em 25g).

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A análise da Tabela 137 permite afirmar que do T0 (pré-enchimento) em diante houve um aumento das contagens de microrganismos mesófilos. Importa referir que os painhos controlo apresentaram concentrações inferiores aos inoculados em todos os tempos de amostragem. Todavia, ao nível estatístico, apenas nos tempos T0 e T2 foram confirmadas aquelas diferenças. A introdução do T2 neste ensaio permite-nos inferir que as estirpes tiveram um efeito notório sobre as contagens de microrganismos mesófilos, porque as diferenças entre os enchidos não inoculados e inoculados foram de 1 a 2 log ufc/g, cabendo os valores médios mais elevados aos segundos. Na fase intermédia da cura (T7) e no produto acabado os valores mantiveram-se entre 7,26 e 8,57 log ufc/g.

Vários autores, no produto acabado, contaram microrganismos mesófilos próximos dos 8 log ufc/g, mas para enchidos não inoculados (Cenci-Goga *et al.*, 2012; Drosinos *et al.*, 2005; Comi *et al.*, 2005; Mauriello *et al.*, 2004). Todavia, Lorezo *et al.* (2014); Dalla-Santa *et al.* (2014) e González & Díez (2002) apresentaram valores médios em enchidos inoculados mais próximos de 9 log ufc/g, porém, García Fontán *et al.* (2007) produziram *androlla* - enchido espanhol - não inoculada e sem açúcares adicionados e quantificaram o valor médio de $8,99 \pm 0,46$ log ufc/g. Refletindo o que fomos mencionando ao longo do trabalho, isto é, a microbiota mesófila, cuja origem e comportamento das populações nos enchidos é bastante heterogénea, não constitui um indicador seguro do tipo de populações presentes nos géneros alimentícios, porque inclui microrganismos indesejáveis juntamente com microrganismos de interesse tecnológico, cujas contagens poderão variar em função do todos os processos desde o abate dos animais.

Para microrganismos psicotróficos verificou-se basicamente o descrito para mesófilos, mas as contagens foram ligeiramente inferiores para os microrganismos em causa. Indo ao encontro do referido por Benito *et al.* (2007), que refere que, geralmente, as contagens de microrganismos psicotróficos são inferiores às de mesófilos.

No que concerne às contagens de bactérias lácticas, não se observaram diferenças muito evidentes ao longo do processo de cura, ainda que, de uma forma geral, as contagens tenham sido inferiores no T0. Efetuando uma avaliação por tempo de amostragem, conclui-se que no T0 a modalidade não inoculada apresentou um valor médio ($2,91 \pm 1,56$ log ufc/g) significativamente inferior às modalidades inoculadas, o que também se aplicou no T2, com um valor médio de ($7,15 \pm 0,39$ log ufc/g). Nos restantes tempos de amostragem não existiram diferenças significativas entre modalidades. Porém, os painhos inoculados apresentaram, na maioria dos casos, concentrações mais

elevadas deste grupo de bactérias. Inoculámos concentrações aproximadas de 10^8 células/g massa - culturas puras de *Lactobacillus* - e no T0 os valores aproximam-se da concentração indicada, principalmente nas modalidades 4 (*S. xylosus* CECT7057 10^8 e *L. sakei* CECT7056 10^8) e 5 (*S. xylosus* CECT7057 10^8 , *L. sakei* CECT7056 10^8 e levedura 2RB4 10^6), ou seja, as modalidades que continham as estirpes patenteadas. Talvez porque aquelas estirpes se tenham adaptado melhor às condições existentes nas massas. Rubio *et al.* (2013) também determinaram concentrações semelhantes às inoculadas no início da cura.

As contagens de bactérias lácticas vão ao encontro dos resultados obtidos para o pH nos mesmos tempos de amostragem (T0 e T2), pois os painhos não inoculados obtiveram as concentrações significativamente mais reduzidas do referido grupo bacteriano, concomitantemente também apresentaram valores médios significativamente superiores para o pH.

As bactérias lácticas, mais uma vez, foram o grupo de bactérias que se apresentou em maior número no produto acabado (7,32 log ufc/g a 8,61 log ufc/g), indo ao encontro dos resultados obtido por Lorenzo *et al.* (2014); Lücke *et al.* (2012); Spaziani *et al.* (2009); Cenci Goga *et al.* (2008) e García Fontán *et al.* (2007). Todavia, Andrade *et al.* (2010) determinaram contagens superiores para *Micrococcaceae*.

Para as contagens de *Staphylococcus* spp., no que respeita à comparação entre tempos de amostragem, de uma forma geral, verifica-se que houve uma redução da concentração do grupo bacteriano em análise dos T0 e T2 para os tempos de amostragem subsequentes. Em termos da avaliação individual de cada tempo de amostragem, no T0 os painhos controlo apresentaram um valor médio ($3,30 \pm 0,42$ log ufc/g) significativamente inferior aos inoculados. No T2, para os enchidos não inoculados, o valor médio foi de $4,10 \pm 0,51$ log ufc/g e foi significativamente inferior ao apresentado pelos painhos alocados à modalidade 5 ($6,83 \pm 0,75$ log ufc/g). Nos tempos T7 e TFinal não se verificaram diferenças significativas entre modalidades. Os valores médios no produto acabado ficaram entre os 3,51 log ufc/g e os 4,19 log ufc/g. Para *Staphylococcus*, ao contrário do que sucedera para bactérias lácticas, as estirpes patenteadas apresentaram-se em concentrações ligeiramente inferiores às demais estirpes e até à modalidade controlo. O decréscimo das contagens de *Staphylococcus* spp. deveu-se, certamente, ao abaixamento do pH, que neste ensaio atingiu valores inferiores a 5,0, e à deposição de fumo na superfície da tripa dos enchidos.

Autores como Andrade *et al.* (2010) e García Fontán *et al.* (2007), no produto acabado, obtiveram resultados semelhantes aos obtidos neste ensaio, enquanto Lorenzo *et al.* (2014) obtiveram concentrações próximas dos 6,0 log ufc/g.

Inoculámos aproximadamente 10^8 células/g de massa para cada estirpe de *Staphylococcus*, porém, as contagens no T0 (pré-enchimento) não ultrapassaram os $6,44 \pm 0,27$ log ufc/g. As temperaturas inferiores a 5°C usadas no período de maturação das massas (72 horas) e a competição com a microbiota indígena e as estirpes de *Lactobacillus* inoculadas poderão explicar as diferenças entre o nível de inoculação e as contagens efetuadas.

No que concerne às contagens de enterobactérias, verificamos que nos T0 e T2 todas as modalidades apresentaram valores contáveis, mas apenas existiram diferenças entre modalidades no último tempo mencionado. No T7, as contagens foram inferiores ao limite de deteção do método (<1 ufc/g) para todas as modalidades. No entanto, no produto acabado a modalidade não inoculada foi a única a apresentar um valor médio contável ($0,86 \pm 1,33$ log ufc/g).

Autores como Cadavez *et al.* (2016); Lorenzo *et al.* (2014) e García Fontán *et al.* (2007) obtiveram valores superiores aos por nós obtidos no produto acabado. Os autores referidos obtiveram concentrações próximas de 1 log ufc/g, mas em algumas modalidades atingiram valores próximos de 3 log ufc/g. Cadavez *et al.* (2016) e Gacia Fontán *et al.* (2007) também recorreram à fumagem tradicional para desidratar os enchidos, enquanto os restantes autores, não. Hajmeer *et al.* (2011) referem que a fumagem e as temperaturas associadas a este processo mostraram efeito antimicrobiano sobre microrganismos patogénicos como *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. enterica* e *Y. enterocolitica*.

Para as contagens de bolores verificamos que nos T7 e TFinal os valores obtidos para todas as modalidades foram inferiores ao limite de deteção do método (<1 ufc/g), no entanto, no T0 todas as modalidades apresentarem valores médios contáveis, mas não apresentaram diferenças significativas entre si, e no T2 os painhos alocados à modalidade 3 (*S. equorum* S2M7 10^8 , *L. sakei* CV3C2 10^8 e levedura 2RB4 10^6) foram os únicos a apresentarem um valor médio (<1 ufc/g) inferior ao limite de deteção do método usado. Como escrito ao longo do presente trabalho é comum que não apareçam bolores em enchidos acabados. Sendo comum se incluirmos a tripa dos enchidos nas análises microbiológicas, mas não foi o caso do presente estudo.

Verificamos que nos tempos T0 e T2 as contagens de leveduras foram significativamente superiores aos restantes tempos de amostragem, com exceção dos painhos controlo no T2. Efetuando uma análise por tempo de amostragem, no T0 todas as modalidades apresentarem valores médios contáveis, mas apenas existiram diferenças significativas entre os enchidos controlo e os inoculados com *S. xylosus* CECT7057 10^8 , *L. sakei* CECT7056 10^8 e levedura 2RB4 10^6 (modalidade5). No T2 os painhos não inoculados apresentaram um valor médio ($0,92 \pm 1,02$ log ufc/g) significativamente inferior aos demais. Na fase intermédia da cura (T7), apesar de não existirem diferenças significativas

entre modalidades, apenas a os painhos controlo apresentaram um valor médio contável ($0,46 \pm 1,13$ log ufc/g) e no produto acabado as modalidades 1 (controlo), 2 (*S. equorum* S2M7 10^8 e *L. sakei* CV3C2 10^8) e 3 (*S. equorum* S2M7 10^8 , *L. sakei* CV3C2 10^8 e levedura 2RB4 10^6) apresentaram valores médios contáveis, mas não apresentaram diferenças entre si ($0,88 \pm 1,42$ log ufc/g, $0,74 \pm 1,15$ log ufc/g e $0,17 \pm 0,41$ log ufc/g, respetivamente).

As modalidades 3 e 5 que continham a estirpe 2RB4 (10^6 células g/massa), todavia, no T0, não mostraram painhos com concentrações significativamente mais elevadas que as demais modalidades inoculadas. Significando, portanto, que a estirpe teve dificuldade em se adaptar às condições ambientais adversas das massas (temperatura, pH, sal, entre outros). Os resultados obtidos no presente ensaio foram bastante inferiores aos determinados por Andrade *et al.* (2010), relembramos que aqueles autores produziram *salchichón* espanhol inoculado com diversas estirpes de *D. hansenii*, na concentração aproximada de 10^6 células/g de massa, adicionaram dextrina, dextrose e lactose, mas não referem as percentagens porque os açúcares vinham preparados num *mix* comercial e não fumaram os enchidos. Aqueles autores obtiveram valores relativamente constantes - 3,0 a 6,0 log ufc/g - ao longo de todo o processo produtivo. De destacar que as concentrações menores couberam sempre aos enchidos controlo no estudo executado pelos autores citados. Julgamos que o efeito da fumagem poderá ser a razão para concentrações obtidas para as contagens de leveduras e também o facto da mesma não conseguir competir com a flora presente no meio, incluindo com as bactérias por nós inoculadas. Encinas *et al.* (2000) reportaram valores inferiores para enchidos fumados, por comparação com os não fumados. Leistner (1995) refere que a fumagem afeta as contagens de leveduras e fatores como o tempo e temperaturas usadas têm um papel primordial naquele efeito.

Para as contagens de *L. monocytogenes*, todas as modalidades, nos T2 e T7, apresentaram valores inferiores ao limite de deteção (<1 ufc/g) do método. No T0 apenas a modalidade não inoculada apresentou um valor médio contável ($5,00 \pm 8,37$ ufc/g), situação que também se verificou no produto acabado ($1,66 \pm 4,08$ ufc/g). Contudo, importa referir que todos os valores foram inferiores aos indicados na legislação vigente (100 ufc/g, segundo o Reg. 1441/2007) para alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitirem o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos. As estirpes parecem ter tido um efeito importante sobre a inibição deste patogénico, tal como verificado por Cenci-Goga *et al.* (2008).

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi negativa em todas as modalidades e tempos de amostragem.

5.6.3. Determinação de aminas biogénicas

Na Tabela 138 apresenta-se a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Tabela 138 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Triptamina	F=0,1047 P=0,9006 ^{N.S.}
β-feniletilamina	F=5,4330 P=0,0050**
Putrescina	F=5,4794 P=0,0047**
Cadaverina	F=16,4849 P=0,0000***
Histamina	F=2,2005 P=0,1130 ^{N.S.}
Tiramina	F=2,4053 P=0,0925 ^{N.S.}
Espermidina	F=0,0678 P=0,9345 ^{N.S.}
Espermina	F=0,5777 P=0,5620 ^{N.S.}
Aminas vasoativas	F=0,2157 P=0,8062 ^{N.S.}
Total de aminas	F=2,2617 P=0,1064 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; **Significativo para $p < 0,01$; ***Significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 138 permite concluir que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para cadaverina, muito significativo ($p < 0,01$) para β-feniletilamina e putrescina e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis estudadas.

Na Tabela 139 está indicada a análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Tabela 139 - Análise de variância para os resultados das aminas biogénicas, considerando os fatores modalidade e tempo de amostragem.

Variáveis (mg/kg de enchido)	Fatores		
	Modalidade G.L.=4	Tempo de amostragem G.L.=3	Modalidade x Tempo de amostragem G.L.=12
Triptamina	F=1,8883 P=0,1135***	F=17,4129 P=0,0000***	F=1,8689 P=0,0395*
β-feniletilamina	F=1,6920 P=0,1529 ^{N.S.}	F=7,6613 P=0,0001***	F=0,7577 P=0,6934 ^{N.S.}
Putrescina	F=5,7224 P=0,0002***	F=27,9112 P=0,0000***	F=4,8198 P=0,0000***
Cadaverina	F=0,5448 P=0,7030 ^{N.S.}	F=3,6500 P=0,0134*	F=2,0550 P=0,0211*
Histamina	F=2,6880 P=0,0322*	F=1,7373 P=0,1603 ^{N.S.}	F=1,2308 P=0,2632 ^{N.S.}
Tiramina	F=1,5177 P=0,1980 ^{N.S.}	F=87,8433 P=0,0000***	F=1,0729 P=0,3843 ^{N.S.}
Espermidina	F=2,8066 P=0,0266*	F=0,9177 P=0,4331 ^{N.S.}	F=1,2554 P=0,2471 ^{N.S.}
Espermina	F=0,8241 P=0,5111 ^{N.S.}	F=7,3225 P=0,0001***	F=2,0164 P=0,0241*
Aminas vasoativas	F=2,0226 P=0,0923 ^{N.S.}	F=15,8183 P=0,0000***	F=1,8225 P=0,0460*
Total de aminas	F=0,8912 P=0,4700 ^{N.S.}	F=1,4758 P=0,2221 ^{N.S.}	F=2,7787 P=0,0015**

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

A avaliação da Tabela 139 permite inferir que o fator modalidade foi altamente significativo ($p < 0,001$) para triptamina e putrescina, significativo ($p < 0,05$) para histamina e espermidina e não foi significativo ($p \geq 0,05$) para as demais aminas. O fator tempo de amostragem foi altamente significativo ($p < 0,001$) para triptamina, β-feniletilamina, putrescina, tiramina, espermina e aminas vasoativas, significativo ($p < 0,05$) para cadaverina e não foi significativo ($p \geq 0,05$) para histamina, espermidina e total de aminas. A interação entre os fatores indicados foi altamente significativa ($p < 0,001$) para putrescina, muito significativa ($p < 0,01$) para os teores totais de aminas, significativa ($p < 0,05$) para triptamina, cadaverina, espermina e aminas vasoativas e não foi significativa ($p \geq 0,05$) para as restantes aminas.

Na Tabela 140 são mostrados os valores médios e desvios padrão para as aminas biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Tabela 140 - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Parâmetros (mg/kg de enchido)											
Tempo de amostragem	Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiranina	Espemidina	Espemina	Aminasvascoativas	Totaldeaminas
T0	1	138,70 ^{ab} ±108,00	5,00 ^A ±2,37	7,79 ^C ±2,75	18,90 ^B ±5,38	0,32 ±1,01	1,33 ^C ±0,85	17,19 ^a ±3,98	100,50 ±63,95	145,35 ^{ab} ±107,45	289,73 ±164,49
	2	112,17 ^b ±68,07	5,15 ±3,10	10,78 ^B ±4,23	16,98 ^B ±4,94	0,55 ±0,92	2,46 ^B ±3,30	16,03 ^{ab} ±3,22	101,61 ^{BC} ±59,05	120,32 ^b ±66,69	265,72 ±73,77
	3	158,05 ^{A,ab} ±38,34	9,81 ±11,80	10,96 ^B ±3,31	19,95 ±4,35	0,31 ±0,76	1,77 ^C ±0,84	16,84 ^{ab} ±3,10	135,50 ^{AB} ±51,05	170,28 ^{A,ab} ±41,20	353,54 ^A ±63,17
	4	208,21 ^{A,a} ±86,79	6,05 ^A ±2,90	11,52 ±4,18	22,04 ±11,48	ND	3,05 ^B ±3,84	13,76 ^{ab} ±3,17	123,45 ±45,29	217,31 ^{A,a} ±89,43	388,08 ^A ±85,39
	5	140,52 ^{A,ab} ±56,90	7,15 ^A ±4,51	10,94 ±5,41	28,53 ±21,58	ND	1,16 ^C ±1,01	11,74 ^b ±5,73	125,90 ^{AB} ±47,61	148,82 ^{A,ab} ±58,82	325,94 ±110,90
T2	1	131,51 ±60,31	4,27 ^{AB} ±1,77	8,61 ^{BC} ±2,29	20,53 ^B ±2,82	ND	3,18 ^C ±1,90	17,70 ±4,09	123,09 ±53,48	138,95 ±59,91	308,88 ±72,10
	2	119,88 ±53,81	3,97 ±0,98	10,63 ^B ±10,72	22,80 ^{AB} ±9,66	ND	4,86 ^B ±2,14	22,83 ±16,45	155,32 ^A ±46,65	128,71 ±51,95	340,29 ±73,77
	3	133,05 ^{AB} ±64,67	4,26 ±2,30	9,84 ^B ±3,79	23,62 ±14,76	ND	3,91 ^{BC} ±2,46	12,69 ±4,16	123,25 ^{BC} ±53,32	141,22 ^{AB} ±65,37	310,62 ^{AB} ±94,20
	4	107,23 ^B ±38,17	4,15 ^{AB} ±1,00	10,37 ±3,39	19,32 ±4,07	ND	4,62 ^B ±2,15	15,54 ±2,40	139,22 ±33,36	116,00 ^B ±37,38	300,46 ^{AB} ±66,94
	5	115,59 ^{AB} ±53,22	3,95 ^B ±1,11	9,81 ±3,72	18,65 ±4,14	ND	4,33 ^B ±1,57	14,99 ±3,49	154,76 ^A ±46,47	123,87 ^{AB} ±53,42	322,09 ±104,02
T7	1	74,17 ±44,80	3,54 ^{AB} ±0,54	33,38 ^B ±25,68	17,88 ^B ±5,28	0,28 ^a ±0,54	6,90 ^B ±4,16	17,54 ±3,98	121,76 ^b ±43,20	84,89 ±45,05	275,45 ±70,97
	2	72,26 ±41,23	4,17 ±0,98	34,79 ^A ±26,31	21,16 ^{AB} ±10,63	ND ^b	7,71 ^A ±1,30	16,95 ±5,22	129,38 ^{AB,ab} ±32,05	84,13 ±41,06	286,50 ±80,93
	3	93,09 ^{BC} ±31,79	3,93 ±1,54	29,38 ^A ±21,33	19,72 ±3,47	ND ^b	7,50 ^B ±3,29	17,26 ±3,11	170,35 ^{A,a} ±33,24	104,52 ^B ±32,42	341,23 ^A ±68,58
	4	85,21 ^B ±33,02	3,66 ^B ±0,66	21,35 ±12,40	17,00 ±5,10	ND ^b	7,25 ^{AB} ±3,36	17,20 ±3,67	131,42 ^{ab} ±52,51	96,13 ^B ±32,53	283,10 ^B ±68,44
	5	83,32 ^B ±28,42	3,20 ^B ±0,58	20,91 ±16,21	17,73 ±4,14	ND ^b	6,69 ^B ±2,71	16,66 ±4,81	130,61 ^{AB,ab} ±29,46	93,21 ^B ±28,20	279,12 ±44,16

Tabela 140 (continuação) - Valores médios e desvios padrão para aminas biogénicas obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Parâmetros (mg/kg de enchido)											
Tempo de amostragem	Modalidade	Triptamina	β -feniletilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Aminasvasoativas	Totaldeaminas
TFinal	1	132,72 ^a ± 60,44	3,27 ^B ±0,44	64,83 ^{A,a} ±38,26	27,58 ^A ±9,67	0,80 ±2,17	10,46 ^A ±2,37	20,60 ^a ±5,06	131,66 ±97,55	147,26 ±61,07	391,93 ^a ±184,28
	2	104,34 ^{ab} ±21,60	3,77 ±0,74	31,00 ^{AB,b} ±26,31	30,75 ^A ±14,49	ND	8,79 ^A ±2,62	16,30 ^{ab} ±3,91	75,14 ^C ±12,01	116,90 ±22,14	270,08 ^{ab} ±39,99
	3	86,03 ^{C,b} ±8,84	5,41 ±3,99	15,94 ^{B,b} ±9,49	21,86 ±10,60	ND	13,17 ^A ±5,59	18,75 ^{ab} ±5,39	87,97 ^C ±17,18	104,61 ^B ±12,79	249,13 ^{B,b} ±29,69
	4	122,39 ^{B,ab} ±45,39	4,21 ^{AB} ±1,78	21,73 ^b ±17,16	22,48 ±8,94	ND	12,41 ^A ±7,68	13,99 ^b ±4,29	116,07 ±52,17	139,00 ^B ±44,52	313,28 ^{AB,ab} ±112,86
	5	103,00 ^{AB,ab} ±34,36	4,05 ^B ±2,05	19,58 ^b ±13,08	18,83 ±8,28	ND	10,63 ^A ±3,09	13,86 ^b ±2,91	105,07 ^B ±31,85	117,68 ^{AB} ±36,43	275,03 ^{ab} ±71,41

T0 (pré-enchimento); **T2** (48 h após o enchimento); **T7** (fase intermédia da cura); **TFinal** (produto acabado).

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

O conjunto das aminas vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina.

Para a mesma modalidade e na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. Para o mesmo tempo de amostragem e na mesma coluna, letras minúsculas representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$. ND - Não detetado

A leitura da Tabela 140 permite concluir que para histamina não se observaram diferenças entre tempos de amostragem e os teores nunca alcançaram sequer 1,00 mg/kg para qualquer modalidade. De evidenciar que na fase intermédia da cura (T7) e no produto acabado apenas os painhos controlo apresentaram valores detetáveis ($0,28 \pm 0,54$ mg/kg e $0,80 \pm 2,17$ mg/kg, respetivamente).

Os teores de tiramina foram aumentando paulatinamente até ao produto final. Naquele momento da cura os valores médios não ultrapassaram os $13,17 \pm 5,59$ mg/kg, e não existiram diferenças significativas entre modalidades.

A poliamina natural espermina apresentou teores superiores à sua congénere espermidina, corroborando Giroto *et al.* (2010) e Roseiro *et al.* (2010).

Para o conjunto das aminas vasoativas (triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina) os teores foram um pouco inferiores na fase intermédia da cura (T7), por comparação com os tempos que lhe antecederam. Todavia, no produto acabado os mesmos subiram ligeiramente, ainda que em termos estatísticos não tenham existido diferenças significativas, os painhos controlo apresentaram o valor médio ($147,26 \pm 61,07$ mg/kg) mais elevado, em sentido oposto apareceram os associados à modalidade 3 (*S. equorum* S2M7 10^8 , *L. sakei* CV3C210⁸ e levedura 2RB4 10^6) com um teor de $104,61 \pm 12,79$ mg/kg.

Para o total de aminas presentes nos painhos não se observaram diferenças muito pronunciadas ao longo do tempo de amostragem. No produto acabado os enchidos controlo voltaram a apresentar o valor médio mais elevado ($391,93 \pm 184,28$ mg/kg) que foi significativo ($249,13 \pm 29,69$ mg/kg) face aos inoculados com a modalidade 3.

É de salientar que neste ensaio as aminas que apresentaram teores mais elevados no produto acabado, por ordem decrescente, foram triptamina, espermina, putrescina e cadaverina. Em sentido oposto surgiram histamina, β -feniletilamina e tiramina.

Tiramina e histamina, sendo apontadas como as mais tóxicas para os consumidores, apresentaram teores bastante reduzidos face, por exemplo, aos obtidos por Simion *et al.* (2014) e Bover-Cid *et al.* (2014). Outro exemplo é o de Latorre-Moratalla *et al.* (2017) que indicam $139,2 \pm 118,9$ mg/kg e $26,5 \pm 57,8$ mg/kg, respetivamente, para tiramina e histamina como sendo os valores médios encontrados nos enchidos à venda no mercado Espanhol.

O conjunto das aminas vasoativas apresentou valores inferiores a 200 mg/kg e bastante inferiores a 1000 mg/kg para o somatório dos teores destes compostos.

Dos ensaios que envolveram os painhos da Beira Baixa, este foi aquele onde se obtiveram os teores totais de amins biogénicas mais reduzidos no produto acabado. Tentar associar os valores de pH ao aludido não nos parece muito válido, porque os valores daquele parâmetro, em todos os ensaios descritos neste trabalho, apresentaram-se semelhantes. Todavia, neste ensaio em particular, o valor médio ($5,12 \pm 0,18$) dos painhos controlo prontos a consumir foi significativamente mais elevado que os dos inoculados, para além de terem sido os únicos a apresentarem valores médios contáveis para enterobactérias ($0,86 \pm 1,33 \log \text{ufc/g}$) e *L. monocytogenes* ($1,66 \pm 4,08 \text{ ufc/g}$) também no produto acabado. Podendo o descrito ter contribuído para os teores mais elevados para o conjunto das amins vasoativas e teores totais daqueles compostos, tendo em conta o que sobejamente referimos relativamente à possível ação do pH e principalmente enterobactérias sobre a aminogénese.

Na Tabela 141 é apresentada a percentagem de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os painhos controlo e os inoculados.

Tabela 141 - Percentagem de redução dos teores de amins biogénicas no produto acabado, por comparação entre os painhos controlo e os inoculados.

% de Redução										
Modalidade	Triptamina	B-feniletilamina	Putrescína	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espemidina	Espemina	Amins vasoativas	Total de amins
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	21,38	NR	52,18	20,74	100	16,21	20,87	42,93	20,62	31,09
3	35,18	NR	75,41	NR	100	NR	57,52	33,18	28,96	36,44
4	7,78	NR	66,48	18,49	100	NR	32,09	11,84	5,61	20,07
5	15,84	NR	69,10	31,73	100	NR	32,72	20,20	20,01	28,83

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g); 4 - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g); 5 - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

O conjunto das amins vasoativas corresponde à soma dos teores da triptamina, β -feniletilamina, histamina e tiramina.

NR - Não ocorreu redução

A análise da Tabela 141 permite concluir que as estirpes não tiveram efeito sobre a redução dos teores de β -feniletilamina no produto acabado, todavia, os teores foram muito próximos dos obtidos para os enchidos controlo.

Também é importante reforçar que apenas os painhos controlo apresentaram teores detetáveis de histamina no produto acabado, e que para tiramina apenas os enchidos inoculados com a cultura mista composta por *S. equorum* S2M7 10^8 e *L. sakei* CV3C2 10^8 (modalidade 2) conseguiram promover uma redução de 16,21% dos teores desta amina. No entanto, tanto para os teores de amins vasoativas como para os teores totais, a modalidade que mais se destacou

foi a número 3, que foi composta pelas estirpes da modalidade 2 apenas da levedura 2RB4, que atingiu 28,96% e 36,44% de redução, respetivamente.

As culturas patenteadas, de uma forma geral, não conseguiram promover reduções tão pronunciadas como a cultura *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, na concentração 10^8 células/g de massa, sendo o referido manifesto para o conjunto das aminas vasoativas e para os teores totais. Parecendo que o fumo teve alguma influência na aminogénese, já que nas inoculações dos paios de porco preto, com culturas mistas, na concentração 10^8 células/g de massa, as culturas patenteadas tinham promovido reduções mais elevadas que *S. equorum* S2M7 10^8 e *L. sakei* CV3C2 10^8 .

Como já havíamos verificado nas inoculações dos paios de porco preto com culturas mistas, na concentração inoculada de 10^8 células/g de massa, as reduções mais pronunciadas ocorreram sobre a putrescina e aqui volta a confirmar-se tal facto. Como é natural não estamos a ter em conta as reduções de histamina verificadas neste ensaio, porque o teor médio obtido ($0,80 \pm 2,17$ mg/kg) para os painhos controlo foi bastante baixo.

Claramente as percentagens globais de redução dos teores de aminas biogénicas foram as mais elevadas, por comparação com todas as que lhes antecederam, isto é, nos ensaios em que inoculámos culturas puras de *Staphylococcus* e *Lactobacillus* nos painhos da Beira Baixa.

5.6.4. Parâmetros da cor

Na Tabela 142 mostra-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Tabela 142 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
L*	F=10,9686 P=0,0000***
a*	F=8,9251 P=0,0002***
b*	F=0,1060 P=0,8995 ^{N.S.}
c*	F=3,665 P=0,0282*
H°	F=3,2267 P=0,0425*

G.L. – Graus de Liberdade

Níveis de significância: N.S. = Não significativo; *significativo para $p < 0,05$; *** significativo para $p < 0,001$

A análise da Tabela 142 permite concluir que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para as coordenadas L^* e a^* , significativo ($p < 0,05$) para C^* e H° e não significativo ($p \geq 0,05$) para b^* .

Apesar das modalidades e as condições de fumagem serem idênticas, o facto dos lotes terem sido produzidos em momentos distintos e com matérias-primas provenientes de lotes também eles diferentes, poderá originar variância entre lotes de produção.

Na Tabela 143 mostra-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Tabela 143 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros da cor, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator	
	Modalidade	
	G.L.=4	
L^*	F=0,9553 P=0,4341 ^{N.S.}	
a^*	F=0,9498 P=0,4372 ^{N.S.}	
b^*	F=0,4819 P=0,7490 ^{N.S.}	
C^*	F=0,5700 P=0,6848 ^{N.S.}	
H°	F=0,9838 P=0,4184 ^{N.S.}	

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo

Após análise da Tabela 143 conclui-se que o fator modalidade não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis avaliadas.

Na Tabela 144 estão indicados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Tabela 144 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros da cor obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Parâmetros						
Tempo de amostragem	Modalidade	L*	a*	b*	C*	H°
T _{Final} (produto acabado)	1	48,40±5,52	14,96±3,07	11,91±3,44	19,23±4,15	38,26±6,01
	2	46,70±6,76	15,75±3,11	12,50±3,37	20,24±3,94	38,23±6,78
	3	47,80±5,59	15,08±2,79	13,13±3,30	20,15±3,55	40,81±6,95
	4	46,98±5,90	15,81±2,57	12,75±4,02	20,47±4,03	38,13±7,14
	5	49,30±5,83	14,70±2,32	12,62±3,26	19,58±2,71	40,29±8,71

1 - Controlo com dextrose; 2 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g); 3 - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g); 4 - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g); 5 - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

Na mesma coluna, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A leitura da Tabela 144 permite inferir que não existiram diferenças significativas entre modalidades para nenhum dos parâmetros estudados, como já havia sido evidenciado pela análise de variância para o fator modalidade. Todavia, os painhos inoculados com as modalidades 2 (*S. equorum* S2M7 10^8 e *L. sakei* CV3C2 10^8), 3 (*S. equorum* S2M7 10^8 , *L. sakei* CV3C2 10^8 e levedura 2RB4 10^6) e 4 (*S. xylosus* CECT7057 10^8 e *L. sakei* CECT7056 10^8) apresentaram-se ligeiramente mais escuros e mais vermelhos (a*) que os restantes. Tendo em conta os valores obtidos para a coordenada C*, os painhos inoculados foram ligeiramente mais vermelhos e com uma cor mais forte e brilhante (mais definida).

Como tal, parece-nos que as estirpes poderão ter contribuído para tornar os painhos mais apelativos em termos visuais, porém, como apresentado na Tabela 150 relativa aos resultados obtidos para os parâmetros de análise sensorial, não foi essa conclusão a que o painel de provadores chegou.

Relativamente aos resultados obtidos por outros autores, em sentido oposto às nossas conclusões, Lorenzo *et al.* (2014) verificaram que a utilização de culturas de arranque influenciou significativamente (positivamente) as coordenadas de cor dos enchidos, enquanto Casquete *et al.* (2011b) só identificaram efeito sobre a coordenada H°. Já Essid & Hassouna (2013); Casquete *et al.* (2011a) e Casaburi *et al.* (2008) chegaram à mesma conclusão que nós, isto é, as culturas de arranque não tiveram uma influência significativa sobre as coordenadas de cor.

5.6.5. Parâmetros reológicos

Na Tabela 145 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Tabela 145 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Dureza (N)	F=40,0112 P=0,0000***
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=5,8468 P=0,0036**
Coabilidade	F=10,0491 P=0,0000***
Elasticidade	F=0,0584 P=0,9433 ^{N.S.}
Resiliência	F=17,4728 P=0,0000***
Mastigabilidade (N)	F=27,9831 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

Analisando a Tabela 145 verifica-se que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para dureza, coabilidade, resiliência e mastigabilidade, muito significativo ($p < 0,01$) para adesividade e não significativo ($p \geq 0,05$) para elasticidade.

A reologia dos enchidos é fortemente influenciada pelo abaixamento do pH, que pode ser acelerado pelas bactérias lácticas. Como consequência da acidez, é produzida uma certa desnaturação e insolubilização das proteínas que acelera a aquisição de uma textura adequada, conferindo ao produto uma maior e melhor firmeza, estabilidade e coesão ao corte (Drosinos *et al.*, 2007). Como referimos algumas vezes ao longo deste trabalho, as alterações nos valores da a_w estão condicionadas pela evolução do tempo de cura, mas o pH poderá ter influência significativa sobre aquele parâmetro, devido ao ponto isoelétrico das proteínas. Porém, no corrente ensaio, nenhum dos parâmetros aludidos foi afetado pelo fator lote (Tabela 132), mas alguns grupos de microrganismos como *Staphylococcus* e bolores, foram (Tabela 135), e estes grupos de microrganismos têm capacidade para participar em atividades proteolíticas e lipolíticas que poderão contribuir para alterações nos atributos reológicos dos enchidos.

Na Tabela 146 mostra-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Tabela 146 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros reológicos, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Dureza (N)	F=1,9519 P=0,1050 ^{N.S.}
Adesividade (N.s ⁻¹)	F=4,2341 P=0,0029**
Coesividade	F=0,4238 P=0,7912 ^{N.S.}
Elasticidade	F=0,4270 P=0,7889 ^{N.S.}
Resiliência	F=2,2191 P=0,0698 ^{N.S.}
Mastigabilidade (N)	F=1,4682 P=0,2148 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; ** Significativo para p<0,01

A observação da Tabela 146 permite concluir que o fator modalidade foi muito significativo (p<0,01) para a adesividade e não significativo (p≥0,05) para as demais variáveis estudadas.

Na Tabela 147 apresentam-se os valores médios e desvios padrão para os parâmetros reológicos obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Tabela 147 - Valores médios e desvios padrão para a análise do perfil de textura obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Dureza (N)	40,853±17,730	53,168±18,532	50,918±18,852	48,518±14,997	47,067±21,018
Adesividade (N.s ⁻¹)	- 0,302 ^b ±0,293	- 0,805 ^a ±0,632	- 0,775 ^a ±0,831	-0,425 ^{ab} ±0,232	-0,639 ^{ab} ±0,691
Coesividade	0,636±0,055	0,631±0,053	0,626±0,041	0,627±0,040	0,629±0,052
Elasticidade	0,855±0,071	0,853±0,061	0,864±0,075	0,873±0,060	0,861±0,069
Resiliência	0,185±0,033	0,164±0,030	0,172±0,028	0,177±0,026	0,181±0,033
Mastigabilidade (N)	22,665±10,459	28,754±9,840	27,892±11,051	26,989±10,28	25,826±11,744

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10⁸ células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10⁸ células/g) + levedura 2RB4 (10⁶ células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para p < 0,05.

Analisando a Tabela 147 conclui-se que apenas existiram diferenças significativas entre modalidades para o parâmetro adesividade. Aquele parâmetro foi significativamente mais elevado nos painhos alocados às modalidades 2 ($-0,805 \pm 0,632 \text{ N.s}^{-1}$) e 3 ($-0,775 \pm 0,831 \text{ N.s}^{-1}$), face à modalidade não inoculada ($-0,302 \pm 0,293 \text{ N.s}^{-1}$), entre as restantes modalidades não existiram diferenças significativas. Também se pode inferir que os painhos inoculados foram mais duros e apresentaram valores mais elevados para mastigabilidade. González-Fernández *et al.* (2006) referem que valores de pH que atinjam o ponto isoelétrico das proteínas conferem dureza e aumentam os valores de mastigabilidade - causadas pela precipitação das proteínas - dos enchidos, premissa que o presente estudo parece corroborar.

Autores como Lorenzo *et al.* (2014) e Essid & Hassouna (2013) concluíram que a inoculação de culturas de arranque não teve um efeito significativo sobre as características reológicas dos enchidos, tendo as mesmas sido influenciadas pelo tempo de desidratação. Neste caso, não temos comparação possível porque apenas efetuámos a determinação daquele conjunto de parâmetros no produto acabado. Porém, Casquete *et al.* (2011b) quando inocularam *P. acidilactici* MS198 e *S. vitulus* RS34, na concentração aproximada de 5×10^7 células/g de massa e adicionaram 2,5% de sacarose, observaram o efeito das culturas de arranque na redução da dureza de salsichão espanhol, provavelmente devido à proteólise promovida pelas estirpes.

5.6.6. Análise sensorial

Na Tabela 148 apresenta-se a análise de variância para os resultados dos parâmetros da análise sensorial, considerando o fator lote.

Tabela 148 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote G.L.=2
Intensidade da cor	F=4,8671 P=0,0088**
Cores estranhas	F=0,8511 P=0,4286 ^{N.S.}
Marmoreado	F=0,9081 P=0,4051 ^{N.S.}
Intensidade do aroma	F=5,3385 P=0,0056**

Tabela 148 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator lote.

Variáveis	Fator
	Lote
	G.L.=2
Aromas estranhos	F=16,6258 P=0,0000***
Dureza	F=0,9270 P=0,3976 ^{N.S.}
Fibrosidade	F=5,3256 P=0,0057**
Suculência	F=4,1352 P=0,0175*
Intensidade do sabor	F=6,7124 P=0,0015**
Sabores negativos	F=8,0317 P=0,0004***
Intensidade da salga	F=4,0327 P=0,020*
Apreciação global	F=16,6314 P=0,0000***

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo; * Significativo par $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$

Observando a Tabela 148 conclui-se que o fator lote foi altamente significativo ($p < 0,001$) para aromas estranhos, sabores negativos e apreciação global, muito significativo ($p < 0,01$) para intensidade da cor, intensidade do aroma, fibrosidade e intensidade do sabor, significativo ($p < 0,05$) para suculência e intensidade da salga e não significativo ($p \geq 0,05$) para as restantes variáveis.

Na Tabela 149 é apresentada a análise de variância para os resultados dos parâmetros da análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Tabela 149 - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Intensidade da cor	F=1,5082 P=0,2016 ^{N.S.}
Cores estranhas	F=2,1996 P=0,0708 ^{N.S.}
Marmoreado	F=0,8963 P=0,4674 ^{N.S.}
Intensidade do aroma	F=2,2272 P=0,0678 ^{N.S.}
Aromas estranhos	F=0,2118 P=0,9316 ^{N.S.}

Tabela 149 (continuação) - Análise de variância para os resultados dos parâmetros de análise sensorial, considerando o fator modalidade.

Variáveis	Fator
	Modalidade
	G.L.=4
Dureza	F=1,1386 P=0,3397 ^{N.S.}
Fibrosidade	F=0,0961 P=0,9836 ^{N.S.}
Suculência	F=0,8302 P=0,5075 ^{N.S.}
Intensidade do sabor	F=1,4711 P=0,2128 ^{N.S.}
Sabores negativos	F=0,1549 P=0,9606 ^{N.S.}
Intensidade da salga	F=1,0032 P=0,4073 ^{N.S.}
Apreciação global	F=1,1599 P=0,3302 ^{N.S.}

G.L. – Graus de Liberdade
Níveis de significância: N.S. = Não significativo

Analisando a Tabela 149 conclui-se que o fator modalidade não foi significativo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas.

Na Tabela 150 estão indicados os valores médios e desvios padrão para os parâmetros da análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Tabela 150 - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

Parâmetros	T _{Final} (produto acabado)				
	Modalidade				
	1	2	3	4	5
Intensidade da cor	65,64 ± 8,86	61,00 ± 10,90	63,00 ± 11,55	60,46 ± 8,17	61,41 ± 11,90
Cores estranhas	0,27 ± 1,35	0,29 ± 1,27	0,00 ± 0,00	1,22 ± 3,98	0,10 ± 0,65
Marmoreado	55,81 ± 11,33	50,95 ± 18,31	50,08 ± 14,80	52,59 ± 13,27	55,35 ± 18,06
Intensidade do aroma	69,51 ± 16,82	65,35 ± 10,22	62,81 ± 11,66	63,62 ± 11,29	66,78 ± 9,72
Aromas estranhos	1,35 ± 5,85	1,38 ± 4,64	1,92 ± 5,02	2,24 ± 4,84	1,81 ± 4,53
Dureza	57,51 ± 10,06	55,54 ± 9,67	56,54 ± 10,38	53,05 ± 9,80	54,46 ± 9,79
Fibrosidade	38,54 ± 26,71	36,51 ± 23,28	38,11 ± 26,87	40,03 ± 22,17	38,49 ± 23,68
Suculência	60,84 ± 15,53	58,05 ± 17,84	55,84 ± 18,17	60,38 ± 17,67	62,24 ± 14,95
Intensidade do sabor	69,43 ± 11,38	68,62 ± 9,56	68,22 ± 10,74	64,24 ± 16,69	70,31 ± 8,41
Sabores negativos	3,03 ± 9,37	3,73 ± 10,86	4,05 ± 7,15	4,22 ± 7,55	4,46 ± 7,24

Tabela 150 (continuação) - Valores médios e desvios padrão para os parâmetros de análise sensorial obtidos nos painhos da Beira Baixa inoculados com culturas mistas.

TFinal (produto acabado)					
Modalidade					
Parâmetros	1	2	3	4	5
Intensidade da salga	59,97 ± 8,01	57,43 ± 6,76	60,73 ± 7,19	59,24 ± 9,18	58,18 ± 8,95
Apreciação global	61,78 ± 11,70	64,54 ± 9,48	57,68 ± 15,80	60,89 ± 14,61	61,01 ± 16,40

1 - Controlo com dextrose; **2** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g); **3** - *Staphylococcus equorum* S2M7 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CV3C2 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g); **4** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g); **5** - *Staphylococcus xylosus* CECT7057 (10^8 células/g) + *Lactobacillus sakei* CECT7056 (10^8 células/g) + levedura 2RB4 (10^6 células/g).

Na mesma linha, letras diferentes representam médias com diferenças significativas para $p < 0,05$.

A análise da Tabela 150 permite concluir que não existiram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros avaliados pelo painel.

O painel preferiu os paios controlo no que respeita à intensidade da cor e do aroma.

Os painhos inoculados com a modalidade 3 (*S. equorum* S2M7 10^8 , *L. sakei* CV3C2 10^8 e levedura 2RB4 10^6) foram os únicos que não apresentaram cores estranhas.

Os painhos alocados à modalidade 4 (*S. xylosus* CECT7057 10^8 e *L. sakei* CECT7056 10^8) apresentaram valores médios mais elevados no que respeita a cores e aromas estranhos e os associados à congénere número 5 - apenas da levedura 2RB4 - destacaram-se pela negativa, porque apresentaram mais sabores negativos.

Nos resultados relativos à reologia dos painhos (Tabela 147), os enchidos controlo apresentaram-se menos duros que os inoculados, todavia, o painel considerou os paios controlo ligeiramente mais duros que os inoculados, apesar de não terem existido diferenças estatisticamente assinaláveis. Tal facto poderá dever-se, eventualmente, a alguma heterogeneidade entre as amostras usadas para os dois conjuntos de parâmetros, entenda-se maior diâmetro dos enchidos, pedaços de gordura mal distribuídos ou, simplesmente, poderá ter ocorrido algum erro associado à subjetividade da avaliação dos provadores.

A apreciação global recaiu sobre os paios inoculados com a modalidade 2 (*S. equorum* S2M7 10^8 e *L. sakei* CV3C2 10^8), significado, portanto, com base no descrito nos parágrafos anteriores, que as estirpes patenteadas não se mostraram tão capazes como as habitualmente usadas ao longo deste estudo no que concerne ao melhoramento das características sensoriais dos painhos.

5.6.7. Principais conclusões do ensaio

Este ensaio permitiu concluir que as estirpes não tiveram um efeito notório sobre a redução da a_w dos painhos. Em relação ao pH, as estirpes conseguiram metabolizar a dextrose alimentar adicionada e, desse modo, produzir ácido que contribuiu para valores significativamente mais reduzidos de pH deste o T0 (pré-enchimento).

No produto acabado, apenas os painhos não inoculados apresentaram contagens para enterobactérias. Para o indicador de segurança *Salmonella* spp. nada de relevante há a referir, porque foi negativo para todas as modalidades e em todos os momentos de análise. No entanto, o outro indicador de segurança por nós estudado, *L. monocytogenes*, só apresentou contagens para os enchidos controlo, especificamente no T0 e no produto acabado.

Tanto para os teores de amins vasoativas como para os teores totais, a cultura mista composta por *S. equorum* S2M7 10^8 , *L. sakei* CV3C2 10^8 e levedura 2RB4 10^6 foi a que promoveu mais reduções daqueles compostos, pois atingiu 28,96% e 36,44% de redução, respetivamente, para amins vasoativas e teores totais, tendo mesmo apresentado uma redução significativa, por comparação com os enchidos controlo, para os teores totais de amins. As culturas patenteadas, de uma forma geral, não conseguiram promover reduções tão pronunciadas dos teores de amins biogénicas como a cultura mista *S. equorum* S2M7 10^8 , *L. sakei* CV3C2 10^8 e levedura 2RB4 10^6 , tendo sido manifesto para os teores totais daqueles compostos.

Claramente as percentagens globais de redução dos teores de amins biogénicas foram as mais elevadas por comparação com todas as que lhes antecederam, isto é, nos ensaios em que inoculámos culturas puras de *Staphylococcus* e *Lactobacillus* nos painhos da Beira Baixa.

Tendo em conta os valores obtidos para a coordenada C* os painhos inoculados foram ligeiramente mais vermelhos e com uma cor mais forte e brilhante (mais definida).

A inoculação com a levedura 2RB4 não parece ter o efeito esperado, isto é, contribuir para incrementar os atributos sensoriais dos enchidos, talvez porque a mesma não consegue competir com a microbiota presente no meio, incluindo com as bactérias por nós inoculadas.

Os resultados obtidos para os parâmetros estudados foram bastante semelhante entre as modalidades inoculadas, ainda assim, julgamos que a cultura mista *S. equorum* S2M7 10^8 , *L. sakei* CV3C2 10^8 e levedura 2RB4 10^6 foi aquela que se destacou, porque promoveu a maior redução dos teores totais de amins biogénicas e de amins com propriedades vasoativas dos painhos da Beira Baixa, apesar da cultura mista *S. equorum* S2M7 10^8 e *L. sakei* CV3C2 10^8 ter tido um efeito ligeiramente superior sobre as características sensoriais dos enchidos.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os diferentes ensaios realizados no presente trabalho visaram avaliar o efeito da inoculação de culturas de arranque autóctones, puras e mistas, ao nível das características físico-químicas, microbiológicas, reológicas e sensoriais e nos teores de aminos biogénicas de paios de porco preto, do Alentejo, e painhos da Beira Baixa. Inocularam-se as culturas puras *Staphylococcus equorum* 5MSA4, *S. equorum* S2M7, *Lactobacillus curvatus* L2B2 e *L. sakei* CV3C2 e culturas mistas de levedura 2RB4, *S. xylosus* CECT7057, *L. sakei* CECT7056, *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, com diferentes composições e concentrações de inoculação que variaram de 10^3 células/g de massa a 10^8 células/g de massa, sendo que para a levedura a concentração inoculada foi sempre de 10^6 células/g de massa.

Os ensaios onde foram inoculadas culturas puras mostraram que, de uma forma geral, as estirpes *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, nas concentrações 10^6 células/g de massa e 10^8 células/g de massa, respetivamente, para paios e painhos, foram aquelas que melhoraram as características gerais dos enchidos.

No ensaio em que se inocularam culturas mistas nos paios de porco preto, do Alentejo, com a concentração 10^6 células/g de massa, para cada estirpe, a cultura composta por *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2 foi a que promoveu reduções significativas sobre os teores de aminos biogénicas com propriedades vasoativas, assim como para os teores totais daqueles compostos. A cultura de arranque referida também teve algum efeito sobre a redução das contagens de *Listeria monocytogenes*, os paios que lhe foram alocados apresentaram o valor médio mais reduzido para a a_w e não depreciou as características reológicas e sensoriais dos enchidos.

Nos paios de porco preto, do Alentejo, inoculados com culturas mistas na concentração de 10^8 células/g de massa, para cada estirpe bacteriana, e 10^6 células/g de massa para a estirpe de levedura, independentemente da composição da cultura inoculada, verificou-se um efeito significativo sobre o abaixamento do pH ao longo de todo o processo produtivo, sobre *L. monocytogenes* porque, desde as 48 horas após o enchimento até ao produto acabado, os paios inoculados, comparativamente aos controlo, apresentaram sempre contagens inferiores para aquela bactéria, destacando-se a cultura mista composta por *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, na concentração de 10^8 células/g de massa para cada estirpe, pois no produto acabado contribuiu para que os enchidos apresentassem contagens inferiores ao limite de deteção do método (<1 ufc/g.) A modalidade *S. xylosus* CECT7057 e *L. sakei* CECT7056, na concentração de 10^8 células/g de massa para cada estirpe, foi a que mais participou nas reduções dos teores totais de aminos biogénicas no produto acabado, apesar de todos os enchidos inoculados terem

apresentado teores significativamente inferiores daqueles compostos. O incremento da concentração inoculada de 10^6 para 10^8 células/g de massa teve um efeito ligeiramente superior sobre a segurança dos enchidos (redução dos valores dos indicadores de segurança microbianos e teores de amins biogénicas), porém, a introdução da cultura mista *S. xylosus* CECT7057 e *L. sakei* CECT7056 não pareceu acrescentar nada de substancial sobre as características gerais dos enchidos. Esta cultura foi inoculada porque já havia mostrado efeitos melhoradores nas características de paios de porco Alentejano, produzidos noutras fábricas há alguns anos atrás. Posto isto, a cultura que mostrou maior aptidão para inoculações futuras neste tipo de enchidos foi *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, na concentração de 10^8 células/g de massa para cada estirpe.

No ensaio em que inoculámos culturas mistas em painhos da Beira Baixa na concentração de 10^8 células/g de massa e 10^6 células/g de massa, respetivamente, para cada estirpe de bactérias e levedura 2RB4, a cultura mista *S. equorum* S2M7, *L. sakei* CV3C2 e levedura 2RB4, foi aquela que promoveu a maior redução dos teores totais de amins biogénicas e amins vasoativas, tendo apresentado uma redução significativa para os teores totais daqueles compostos em relação aos enchidos controlo, apesar de na apreciação sensorial a preferência do painel de provadores ter recaído sobre os enchidos alocados à cultura *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, na concentração 10^8 células/g de massa. Todavia, e tendo em consideração primeiramente a segurança dos enchidos, consideramos que a cultura *S. equorum* S2M7, *L. sakei* CV3C2 e levedura 2RB4 deverá ser a referência para ser inoculada naquele tipo de enchidos.

Em jeito de súmula, os efeitos das inoculações foram mais evidentes nas reduções dos teores totais de amins biogénicas, principalmente quando foram inoculadas culturas mistas, na concentração 10^8 células/g de massa. As reduções dos valores de pH foram mais efetivas nos painhos inoculados também com culturas mistas, apesar de também se ter notado o abaixamento dos valores nos paios, mas não de forma tão pronunciada. O efeito na redução da a_w foi superior nos paios de porco preto, do Alentejo, mas inoculados na concentração 10^6 células/g de massa. A microbiota patogénica também sofreu reduções mais evidentes quando foram inoculadas culturas mistas, na concentração 10^8 células/g de massa. A utilização de culturas de arranque não teve um efeito muito evidente na cor e nas características reológicas dos produtos. A avaliação sensorial feita pelo painel de provadores mostrou que a introdução das culturas de arranque testadas não prejudicou a qualidade sensorial dos dois tipos de enchido produzidos, porém, também não lhe conferiu características diferenciadoras. Outra conclusão a retirar é que, de uma forma geral, a inoculação com a levedura 2RB4 não teve o efeito esperado,

ou seja, efeitos diferenciadores sobre os atributos sensoriais dos enchidos, talvez porque aquela levedura não conseguiu competir com a microbiota presente no meio, incluindo as estirpes inoculadas.

A cultura mista *S. equorum* S2M7 e *L. sakei* CV3C2, na concentração 10^8 células/g de massa, contribuiu para a segurança dos dois tipos de enchidos estudados sem depreciar a qualidade sensorial dos mesmos, mostrando aptidão para ser inoculada em fábricas, processos tecnológicos e regiões distintos.

As estirpes inoculadas não apresentaram qualquer prejuízo para as características físico-químicas, microbiológicas, reológicas e sensoriais dos enchidos. De uma forma geral, pode considerar-se que a utilização de culturas de arranque autóctones poderá contribuir para a qualidade e segurança dos enchidos, resultando em produtos que atendem às expectativas dos clientes e/ou consumidores quanto às características intrínsecas dos enchidos.

7. PERSPETIVAS PARA ESTUDOS FUTUROS

Nas últimas décadas as exigências legais têm aumentado no que concerne à garantia da segurança sanitária dos géneros alimentícios. Para além disso, os consumidores, felizmente, também se têm tornado mais informados, preocupados e exigentes. Estes ficam receosos com as consequências da ingestão de aditivos sintéticos que são usados na conservação dos géneros alimentícios. A utilização, principalmente de culturas microbianas autóctones, tem mostrado efeitos positivos na produção de enchidos cárneos fermentados.

Neste contexto, parece-nos pertinente isolar e identificar estirpes microbianas a partir de produtos e superfícies de fábricas da Beira Baixa, que em princípio estarão melhor adaptadas aos processos de fabrico daquela região e, quando inoculadas, terão superior capacidade para potenciar as características dos enchidos lá produzidos.

Pensamos que, no caso concreto de enchidos produzidos com recurso à fumagem tradicional, as temperaturas a utilizar deverão baixar consideravelmente, em comparação com as por nós usadas nos painhos da Beira Baixa. Sugerimos valores não superiores a 30°C, para que a desidratação decorra de forma paulatina - com benefícios ao nível sensorial - e as culturas inoculadas tenham condições para se multiplicarem e/ou aumentarem a sua atividade e, conseqüentemente, mais facilmente a sua ação será evidenciada.

Desenvolver estudos relativamente aos efeitos da adição de diferentes concentrações de dextrose, por exemplo, iniciar-se nos 0,10% e culminar dos 2,0%, no sentido de se perceber o comportamento das estirpes autóctones face ao incremento do substrato.

Promover alterações aos processos de fabrico habituais, como por exemplo, substituir os tempos de maturação por tempos de fermentação, isto é, após a mistura das massas efetuar de imediato o enchimento e colocar os enchidos a temperaturas compreendidas entre, por exemplo, os 20°C e os 25°C, por forma a que as culturas promovam uma fermentação mais intensa, conseqüentemente terão um papel mais ativo nas características gerais dos enchidos.

Testar novas estirpes autóctones e inoculá-las em concentrações inferiores, iguais e superiores às inoculadas no presente trabalho. Testar a pulverização de bolores autóctones na superfície dos enchidos.

Desenvolver marcadores moleculares que permitam monitorizar a viabilidade das estirpes ao longo de todo o processo produtivo.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abis encyclopedia (2018). *Staphylococcus equorum*. [Internet] Disponível em <http://www.tgw1916.net/Staphylococcus/equorum.html> [Consulta efetuada a 21 de abril de 2018].
- Abuja, O.J.S. (1993). Caracterización parcial, bioquímica e imunológica, de una sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus sake* 148. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Veterinária. Universidade Complutense de Madrid.
- Afonso, L. (2014). Porco Preto - D.L. N.º 95/2014 de 24 de junho de 2014. *Suicultura*, 105, julho-agosto, 20-21.
- Alfaia, C.M., Gouveia, I.M., Fernandes, M.H., Fernandes, M.J., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto, A.S., & Fraqueza, M.J.R. (2018). Assessment of coagulase negative *Staphylococcus* and lactic acid bacteria isolated from Portuguese dry fermented sausages as potential starters based on their biogenic amine profile. *Submitted to LWT- Food Science and Technology* (submetido).
- Almeida, A. (2001). *Seleção de estirpes da família Micrococcaceae para obtenção de uma cultura de arranque para enchidos tradicionais do Alentejo*. Relatório do Trabalho de fim de curso, Licenciatura em Engenharia Zootécnica, Universidade de Évora.
- Alvarez, M.F. (1994). Efectos de la adición de lipase pancreática en la maduración de embutidos crudos curados. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Faculdade de Veterinária. Universidade Complutense de Madrid.
- Alves, S.P., Alfaia, C.M., Škrbić, B.D., Živančev, J.R., Fernandes, M.J., Bessa, R.J.B., & Fraqueza, M.J. (2017). Screening chemical hazards of dry fermented sausages from distinct origins: Biogenic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy elements. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 124-131.
- Alves, S.P., Fernandes, M.J., Fernandes, M.H., Bessa, R. J. B., Laranjo, M., Agulheiro-Santos, A.C., Elias, M., & Fraqueza, M.J. (2016). Quality and Acceptability of Dry Fermented Sausages Prepared with Low Value Pork Raw Material. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), 1-10.
- Ammor, M.S., & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starters cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science*, 76 (1), 138-146.
- Anba-Mondoloni, J., Champomier-Vergès, M.C., Zagorec, M., Leroy, S., Dordet-Frisoni, E., Planchon, S., & Talon, R. (2015). The Genetics of microbial starters in Toldra, F. (eds), *Handbook of fermented meat and poultry* (161-168). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Casado, E. M., Córdoba, M.G., & Rodríguez, M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage "salchichón". *Meat Science*, 85,256-264.
- Andrés, A.I., & Ruiz, J. (2001). Tecnología del salazonado del jamón ibérico. In: Barroso, J.V. (Ed.) *Tecnología del jamón ibérico: de los tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma* (227-253) Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Ansorena, D., Montel, M.C., Rokka, M., Talon, R., Eerola, S., Rizzo, A., Raemaekers, M., & Demeyer, D. (2002). Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, 61, 141-147.
- Anzaldúa-Morales, A. (1994). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Zaragoza. Zaragoza, Spain, Editorial Acribia, S.A. 198 pp.

- Armengol, M.R., Vilalta, N., Bota, E., & Sancho, J. (1994). Evolucion de la flora microbiana del fuet de la comarca de Osona. *Alimentaria*, Nov., 29-32.
- Arnau, J., Serra, X., Comaposada, J., Gou, P., & Garriga, M. (2007). Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science*, 77 (1), 81-89.
- Arnau, J. (2000). Aspectos tecnológicos que afectan al desarrollo de la textura y del flavor. *II Symposium Internacional del Jamón Curado*, 27-40, Barcelona.
- Aro Aro, J.M., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K., Fukushima, M., & Sekikawa, M. (2010). The effect of starters cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry*, 119(1), 279-285.
- Atanassova, V., Meindl A., & Ring C. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 105-113.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M, Vidal-Carou, M.C, Bover-Cid, S., & Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 40-49.
- Aymerich M.T., Martín B., Garriga M., & Hugas M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and non-pathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 4583-4594.
- Babić, I., Markov, K., Kovačević, D., Trontel, A., Slavica, A., Dugum, J., & Frece, J. (2011). Identification and characterization of potential autochthonous starters cultures from a Croatian “brand” product “Slavonski kulen”. *Meat Science*, 88(3), 517-524.
- Baka, A.M., Papavergou, E.J., Pragalaki, T., Bloukas, J.G., & Kotzekidou, P. (2011). Effect of selected autochthonous starters cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 54-61.
- Bañón, S., Serrano, R. & Bedia, M., (2014). Use of *Micrococcaceae* combined with a low proportion of Lactic Acid Bacteria as a starter culture for salami stuffed in natural casing. *CyTA - Journal of Food*, 12(2), 160-165.
- Barbut, S. (2015). Texture In: Toldrá F., Hui, Y.H., Astiasarán, I., Sebranek., J.G. & Talon, R. (eds.), *Hanbook of Fermented Meat and Poultry* (207-215). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G., (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 870-26.
- Bedia, M., Méndez, L., & Bañón, S. (2011). Evaluation of different starter cultures (Staphylococci plus Lactic Acid Bacteria) in semi- ripened Salami stuffed in swine gut. *Meat Science*, 87, 381-386.
- Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., & Córdoba, M. G. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic-acid bacteria isolated from traditional iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science*, 72, 193-201.
- Bernaldéz, V., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., Cordero, M., Polo, L., & Rodríguez, A. (2013). Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchichón.” *Food Control*, 32(1), 69-76.
- Bernardi, S., Golineli., B. B., & Contreras-Castillo, C. J. (2010). Aspectos da aplicação de culturas starters na produção de embutidos cárneos fermentados, *Brazilian Journal Food Technology*, 13(2), 133-140.

- Berni, E. (2015). Molds In: Toldrá F., Hui, Y.H., Astiasarán, I., Sebranek, J.G. & Talon, R. (eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (147-153). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Bingol, E.B., Ciftcioglu, G., Eker, F. Y., Yardibi, H., Yesil, O., Bayrakal, G. M., & Demirel, G. (2014). Effect of starter cultures combinations on lipolytic activity and ripening of dry fermented sausages. *Italian Journal of Animal Science*, 13(4), 776-781.
- Bingol, E.B., Yilmaz, F. & Yardibie, E. (2011). Effect of lipolytic starter cultures on ripening and quality of Turkish type fermented sausages (sucuk). *Current Opinion in Biotechnology*, vol.22, p. S97.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., & Parente, E., (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 271-284.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2005). Protease B from *Debaryomyces hansenii*. Purification and biochemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 167-177.
- Bonomo, M. G., Ricciardi, A., & Salzano, G. (2011). Influence of autochthonous starter cultures on microbial dynamics and chemical-physical features of traditional fermented sausages of Basilicata region. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 137-146.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., & Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87-97.
- Bourne, M. (2002). *Food Texture and Viscosity Concept and Measurements*. 2.^a Edição. Food Science and Technology. International Series: New York, USA. Academic Press. 423 pp.
- Bourne, M.C. (1982). *Food Texture and Viscosity*. New York: Academic Press.
- Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla M.L., Veciana-Nogués M.T. & Vidal-Carou M.C. (2014). Biogenic amines. A: Motarjemi Y, Moy GG, Todd ECD, editores. *Encyclopedia of Food Safety*. Vol. 2. Amsterdam: Elsevier Inc. p. 381-91.
- Bover-Cid, S., Hernández-Jover, T., Miguélez-Arrizado, M.J., & Vidal-Carou, M.C. (2003). Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. *European Food Research and Technology*, 216, 477-485.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., & Carmen Vidal-Carou, M. (2001a). Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science*, 57(2), 215-21.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2001b). Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 113-123.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M.C. (2001c). Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amines accumulation as a function of the raw material quality. *Journal of Food Protection*, 64, 367-373.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M.C., (1999). Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 95-104.
- Bozkurt, H., & Erkman, O. (2002). Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). *Meat Science*, 61(2), 149-156.

- Bruna, J.M., Hierro, E.M., De La Hoz, L., Mottram, D.S., Fernandez, M. & Ordóñez, J.A. (2003). Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 111-125.
- Buckenhüskes, H. (1994). Bacterial starter cultures for fermented sausages. *Meat Focus International*, 12, 497-500.
- Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., Pires, P., Fernandes, E., Pereira, A. P., Gomes, A., & Dias, T. (2016). An assessment of the processing and physicochemical factors contributing to the microbial contamination of salpicão, a naturally-fermented Portuguese sausage. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 107-116.
- Cano-García, L., Rivera-Jiménez, S., Belloch, C., & Flores, M. (2014). Generation of aroma compounds in a fermented sausage meat model system by *Debaryomyces hansenii* strains. *Food Chemistry*, 151, 364-373.
- Cano-García, L., Flores, M. & Belloch, C., (2013.) Molecular characterization and aromatic potential of *D. hansenii* strains isolated from naturally fermented sausages. *Food Research International* 52, 42-49.
- Carrascosa, A.V. (2001). Cultivos iniciadores para la industria cárnica. Vol II, p.943-965. In Martín e Macias (eds.), *Enciclopédia de la carne y de los productos cárnicos*, Plasencia, Espanha.
- Carrascosa, A.V. (1989). Aspectos microbiológicos e físico-químicos del curado industrial del jamón serrano de cerdo blanco. Selección de cepas de interes tecnológico. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas. Universidade Complutense de Madrid.
- Casaburi, A., Dimonaco, R., Cavella, S., Toldra, F., Ercolini, D., & Villani, F. (2008). Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology*, 25,335-347.
- Casaburi, A., Aristoy, M.C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., & Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, 76(2), 295-307.
- Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E., & Córdoba, M.G. (2012). Microbiological quality of salchichón and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starters cultures. *Food Control*, 24(1-2), 191-198.
- Casquete, R., Benito, M. J., Martín, A., Ruiz-moyano, S., Córdoba, J.J., & Córdoba, M.G. (2011a). Role of an autochthonous starter culture and the protease EPg222 on the sensory and safety properties of a traditional Iberian dry-fermented sausage“ salchichón”. *Food Microbiology*, 28(8), 1432-1440.
- Casquete, R., Benito, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., & Córdoba, M.G. (2011b). Effect of autochthonous starter cultures in the production of “salchichón”, a traditional Iberian dry-fermented sausage, with different ripening processes. *LWT - Food Science and Technology*, 44(7), 1562-1571.
- Castaño, A., García Fontán, M.C., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., & Carballo, J. (2002). Survival of *Enterobacteriaceae* during processing of *Chorizo de cebolla*, a Spanish fermented sausage. *Food Control*, 13, 107-115.
- Cenci-Goga, B.T., Rossitto, P. V., Sechi, P., Parmegiani, S., Cambiotti, V., & Cullor, J. S. (2012). Effect of selected dairy starter cultures on microbiological, chemical and sensory characteristics of swine and venison (Dama dama) nitrite-free dry-cured sausages. *Meat Science*, 90(3), 599-606.
- Cenci-Goga, B.T., Ranucci, D., Miraglia, D., & Cioffi, A. (2008). Use of starter cultures of dairy origin in the production of salame nostrano, an Italian dry-cured sausage. *Meat Science*, 78, 381-390.

- Chaves-López, C., Paparella, A., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2011). Proteolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with Italian dry-fermented sausages in a model system. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 50-58.
- Chevallier, I., Ammor, S., Laguët, A., Labayle, S., Castanet V., Dufour, E., & Talon, R. (2006). Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control*, 17, 446-453.
- Chi, S.P., & Wu, Y.C. (2007). Spices and Seasonings. In: Toldra, F. (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 87-100). Iowa, EUA: Blackwell Publishing.
- Claro, F.S.G. (2009). *Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de aminas biogénicas em enchidos*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Tecnologia e de Gestão do Instituto Politécnico de Bragança.
- Coccolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., & Comi, G. (2006). Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research*, 6, 692-701.
- Cocconcelli, P.S., & Fontana, C. (2015). Bacteria in Toldra, F. (eds), *Handbook of fermented meat and poultry* (117-128). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Cocconcelli, P.S., & Fontana, C. (2010). Starter Cultures for Meat Fermentation In: Toldra, F. (Ed.), *Handbook of meat processing* (199-218). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Cocconcelli, P.S. & Fontana, C. (2008). Characteristics and applications of Microbial Starters in Meat Fermentations. In: Toldrá, F. (Ed), *Meat Biotechnology* (129-148). New York, USA: Springer Science, Business Media, LLC.
- Cocconcelli, P.S. (2007). Starters cultures: bacteria. In: F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (137-145). Iowa, EUA: Blackwell Publishing.
- Coloretti, F., Tabanelli, G., Chiavari, C., Lanciotti, R., Grazia, L., Gardini, F., et al. (2014). Effect of wine addition on microbiological characteristics, volatile molecule profiles and biogenic amine contents in fermented sausages. *Meat Science*, 96(3), 1395-1402.
- Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P. Cantoni, C., & L. Coccolin, L. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*, 69, 381-392.
- Comissão Europeia, Agriculture and Rural Development (2012). *Prospects for Agricultural Markets and Income in the EU 2012-2022*. Bruxelas. pp. 118.
- Comissão Europeia, (2006). EU Council Regulation (EC)Nº 509/2006 of 20 March 2006 on agricultural products and foodstuffs as traditional specialities guaranteed. Off. J. Eur. Union L 93/1.
- Commission Internationale de l'Eclairage (1978). Recommendations on uniform color spaces - color difference equations - psychometric color terms. CIE Publication N.º 15 (E-1.3.1) 1971/(TC-1.3), Supplement N.º. Paris: *Comission Internationale de l'Eclairage*, 8-12.
- Committee of the Regions. (1996). Promoting and protecting local products - a trump-card for the regions. Brussels: Committee of the Regions. 4pp.
- Connolly, E. & Lonnerdal, E. (2004). D(-)-Lactic Acid-Producing Bacteria: Safe to use in infant formulas. *Nutrafoods*, Vol.3(nº3), pp. 37-49.
- Cordero, M.R., & Zumalacarregui, J.M. (2002). Characterization of *Micrococccaceae* isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 303-306.

- Corsetti, A. & Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40, 539-558.
- Corral, S., Salvador, A., Belloch, C., & Flores, M. (2015). Improvement the aroma of reduced fat and salt fermented sausages by *Debaromyces hansenii* inoculation. *Food Control*, 47, 526-535.
- Coton, E., Desmonts, M. H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., & Christieans, S., (2010a). Biodiversity of coagulase-negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 221-229.
- Dalla Santa, O.R., Macedo, R.E.F.D., Santa, H.S.D., Zanette, C.M., & Freitas, R.J. S.D. (2014). Use of starter cultures isolated from native microbiota of artisanal sausage in the production of Italian sausage. *Food Science and Technology*, 34, 780-786.
- Dalla Santa, O.R., Chacón Alvarez, D., Dalla Santa, H.S., Zanette, C.M., Freitas, R.J.S., Macedo, R.E.F., & Terra, N.N. (2012). Microbiota of sausages obtained by spontaneous fermentation produced in the South of Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(4), 653-660.
- Dastager, S.G., Krishnamurthi, S., Rameshumar, N., & Dharne, M. (2010). The family *Micrococcaceae* In Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (eds), *The prokaryotes - Actinobacteria* (455-498). New York, USA: Springer Science, Business Media, LLC.
- Decreto-Lei n.º 95/2014 – *Diário da República*, 1.ª série. N.º 119 de 24 de junho de 2014, 3357-3359.
- del Rio, B., Redruello, B., Linares, D.M., Ladero, V., Fernandez, M., Martin, M.C., Ruas-Madiedo, P., Alvarez, M.A. (2017). The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. *Food Chemistry*, 218, 249-255.
- Demeyer, D.I., Raemakers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., Ten Brink B., Hagen, B., Montel, C., Zanardi, E., Murbrek, E., Leroy, F., Vanderdriessche, F., Lorentsen, K., Venema, K., Sunesen, L., Stahnke, L., De Vuyst, L., Talon, R., Chizzolini, R., & Eerola, S. (2000). Control of bioflavor and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Research International*, 33, 171-80.
- De Vos, P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A.M Schleifer K. & Whitman W. (2009). *Bergey manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes* (2nd ed.). New York: Springer
- Diestre, A., Oliver, M. A., Gispert, M., Arpa, I. & Arnau, J. (1990) - Consumer responses to fresh meat and meat products from barrows and boars with different levels of boar taint. *Animal Production*, 50, 519-530.
- Djinovic, J., Popovic, A., & Jira, W. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditional and industrial smoked beef and pork ham from Serbia. *European Food Research and Technology*, 227, 1191-1198.
- Domínguez, R., Munekata, P. E., Agregán, R., & Lorenzo, J. M. (2016). Effect of commercial starter cultures on free amino acid, biogenic amine and free fatty acid contents in dry-cured foal sausage. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 47-53.
- Drabik-Markiewicz, G., Dejaegher, B., De Mey, E., Kowalska, T., Paelinck, H., & Vander Heyden, Y. (2011). Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food Chemistry*, 126, 1539-1545.
- Drosinos, E.H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I., & Metaxopoulos, I. (2007). Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, 24(1), 260-270.

- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., & Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, 69, 307-317.
- Dunkel, A., Steinhaus, M., Kotthoff, M., Nowak, B., Krautwurst, D., Schieberle, P., & Hofmann, T., (2014). Nature's chemical signatures in human olfaction: a foodborne perspective for future biotechnology. *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 7124-7143.
- Durá, M.A., Flores, M., & Toldrá F. (2004a). Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on *Debaryomyces* spp.: generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. *Meat Science*, 68, 319-328.
- Durá, M., Flores, M., & Toldrá, F. (2004b). Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Science*, 86 (1), 391-399.
- Durá, M., Flores, M., & Toldrá, F. (2002). Purification and characterisation of a glutaminase from *Debaryomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 117-126.
- Encinas, J.P., López-Díaz, T.M., García-López, M.L., Otero, A., & Moreno, B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 54, 203-208.
- Eerola, H.S., Roig Sagues, A.X., & Hirvi, T.K. (1998). Biogenic amines in Finnish dry sausages. *Journal of Food Safety*, 18, 127-138.
- Eerola, H.S., Roig Sagues, A.X., Lilleberg, L. & Aalto, H. (1997). Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage. *Lebensm Unters Forsch*, 205, 351-355.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2013). Scientific opinion on the maintenance of list of QPS biological agents intentionally added of food and feed (2013 update). *EFSA*, 11(11), 108 3449.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA*, 9(10), 2393.
- EFSA. (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *The EFSA Journal* 587, 2-16.
- Egaña, C.S. (1948). *Enciclopédia de la carne* (3ª edição), (966pp.). Espanha: Espasa, Calpe, S.A.
- Elias, M., Potes, M.E., Roseiro, L.C., Santos, C., Gomes, A., & Agulheiro-Santos, A.C. (2014). The Effect of Starter Cultures on the Portuguese Traditional Sausage "Paio do Alentejo" in Terms of Its Sensory and Textural Characteristics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Profile. *Journal of Food Research*, 3(3), 45-56.
- Elias, M., & Carrascosa, A.V. (2013). Physico-chemical, microbiological and sensory changes during storage in "Paio do Alentejo", a traditional Portuguese Iberian sausage. *FleischWirtschaft International*, 28, 128-133.
- Elias, M., & Carrascosa, A.V. (2010). Characterisation of the Paio do Alentejo, a traditional Portuguese Iberian sausage, in respect to its safety. *Food Control*, 21(1), 97-102.
- Elias, M.N.G.V.S. (2004). *Caracterização, conservação e produção biotecnológica de Paio de porco Alentejano*. Tese de doutoramento. Universidade de Évora.
- Emmerson, E.P. (2011). Improving the sensory and nutritional quality of smoked meat products in Kerry, J.P. and Kerry, J.F. (Eds), *Processed meats improving safety, nutrition and quality* (527-545). High Street, Sawston, Cambridge:Woodhead publishing.

- Encinas, J.P., López-Díaz, T.M., García-López, M.L., Otero, A., & Moreno, B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science* 54, 203-208.
- Essid, I., & Hassouna, M. (2013). Effect of inoculation of selected *Staphylococcus xylosum* and *Lactobacillus plantarum* strains on biochemical, microbiological and textural characteristics of a Tunisian dry fermented sausage. *Food Control*, 32(2), 707-714.
- Estévez, M., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2009). Determination of oxidation. In: Nollet, L. M. L. & Toldra, F. (Eds), *Handbook of processed meats and poultry analysis*. (141-162). New York, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Estrada-Muñoz, R., Boyle, E.A.E. & Marsden, J.L. (1998). Liquid smoke effects on *Escherichia coli* O157:H7, and its antioxidant properties in beef products . *Journal of Food Science*, 63 (1), 150- 153.
- EuroFir consortium. (2014). [Internet] Disponível em <http://www.eurofir.org> [Acedido em 20 de janeiro de 2017].
- Food Safety Authority of Ireland (2011). *Salmonella* species. [Internet] Disponível em <https://www.fsai.ie/> [Consulta efetuada a 17 de abril de 2018].
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. (2013). *Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products*. Meeting report.
- Favaro, G., Pastore, P., Sacconi, G., & Cavalli, S. (2007). Determination of biogenic amines in fresh and processed met by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au-electrode. *Food Chemistry*, 105, 1652-1658.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Gibbs, P., Hogg, T., & Teixeira, P. (2009). Microbiological profile of Salpicão de Vinhais and Chouriça de Vinhais from raw materials to final products : Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(2), 279-283.
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 85-102.
- Fischer, A. (1994). Tecnología de la producción y elaboración de productos cárnicos. In: Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., Sinell, H.J. (Eds). *Tecnología e Higiene de la Carne* (511-623), Zaragoza, Editorial Acribia, S.A.
- Flores, M., & Olivares, A., (2015). Flavor (chap. 25). In: Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (217-225), 2nd ed. Iowa, EUA: Blackwell Publishing..
- Flores, M., Corral, S., Cano-García, L., Salvador, A., & Belloch, C. (2015). Yeast strains as potential aroma enhancers in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 16-24.
- Flores, M. (2009). Sensory descriptors for dry-cured meat products. In: Nollet, L. M. L. & Toldrá, F. (Eds.), *Handbook of Processed Meats and poultry analysis* (423-438), New York, USA: CRC Press.
- Flores, J., Marcus, J.R., Nieto, P., & Navarro, J.L. (1997). Effect of processing conditions on the proteolysis and taste of dry cured sausages. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forshung*, 204, 168-172.
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Bonos, E. (2013). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. In: Kongo, M. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, 1,589-614.
- Fonseca, S., Cachaldora, A., Gómez, M., Franco, I., & Carballo, J. (2013). Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage. *Food Microbiology*, 33(1), 77-84.

- Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., & Biavati, B. (2011). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (1), S58-S66.
- Galvalisi, U., Lupo, S., Piccini, J., & Bettucci, L. (2012). *Penicillium* species present in Uruguayan salami. *Revista Argentina de Microbiología*, 44, 36-42.
- Gálvez, A., Lopez, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E., & Omar, N.B. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 125-152.
- García de Fernando, G.D., de la Hoz, L., & Ordoñez, J.A. (1992). Cultivos iniciadores para fabricar embutidos crudos curados. *AICE-Información Técnica*, 39, 11-14.
- García Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Parada, A., Franco, I., & Carballo, J., (2007). Microbiological characteristics of "androlla", a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology*, 24, 52-58.
- Garriga, M., & Aymerich, T. (2015). The microbiology of fermentation and ripening in Toldra, F. (eds), *Handbook of fermented meat and poultry* (107-115). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Garriga, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M.T., Arnau, J., & Monfort, J.M. (1996). Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 32, 173-183.
- Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - A review. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 315-324.
- Geyzen, A., Scholliers, P., Leroy, F. (2012). Innovative traditions in swiftly transforming foodscapes: an exploratory essay. *Trends Food Scice Technolog*, 25, 47-52.
- Gimeno, O., Astiasarán, I., & Bello, J. (2001). Calcium ascorbate as a potential partial substitute for NaCl in dry fermented sausages: effect on colour, texture and hygienic quality at different concentrations. *Meat Science*, 57, 23-29.
- Gimeno, O., Astiasaran, I., & Bello, J. (1999). Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on texture and colour of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 873-877.
- Girard, J.P. (1991). *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza; Editorial Acribia. 300 pp.
- Giroto, J.M., Masson, M.L., & Haracemiv, S.M.C. (2010). Amino biogênicas em embutidos cárneos e em outros alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13, 01-10.
- Goffin, P., Deghorain, M., Mainardi, J.L., Tytgat, I., Champomier-Verge, S.M.C., Kleerebezem, M., & Hols, P. (2005). Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 187 (19), 6750-6761.
- Gomes, A.M.C.L. (2016). *Influência da tecnologia de produção na qualidade e segurança de produtos de salsicharia tradicional*. Tese de doutoramento. Universidade de Évora.
- Gómez, M., & Lorenzo, J.M. (2013). Effect of fat level on physicochemical, volatile compounds and sensory characteristics of dry-ripened "chorizo" from Celta pig breed. *Meat Science*, 95(3), 658-666.
- Gonçalves, S., Fernandes, H., Fernandes, M.J., Barreto, A., Elias, M. & Fraqueza, M.J. (2012). Preliminary evaluation of bacteriocinogenic potencial of *Lactobacilli* isolates from South Portuguese traditional fermented sausages against *Campylobacter*, *Salmonella*, *St. aureus* and *Listeria monocytogenes*. International Scientific Conference Bacteriocins and antimicrobial peptides, *BAMP 2012*. 21-23 February Kosice, Slovakia. Oral Communication.

- González-Fernández, C., Santos, E. M., Rovira, J., & Jaime, I. (2006). The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74(3), 467-75.
- Gonzalez-Fernández, C., Santos, E.M., Jaime, I., & Rovira, J. (2003). Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology*, 20, 275-284.
- González, B., & Díez, V. (2002). The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of chorizo a Spanish dry cured sausage. *Meat Science*, 60, 295-298.
- González-Fernández, C., Santos, E.M., Rovira, J., & Jaime, I. (2006). The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74(3), 467-75.
- González-Fernandez, C., Santos, E. M., Jaime, I., & Rovira, J. (2003). Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology*, 20(3), 275-284.
- González-Fernandez, C., Santos, E. M., Jaime, I., & Rovira, J. (1997). Utilización de cultivos iniciadores en la elaboracion de chorizo y su influencia en las propiedades sensoriales. *Food Science Technology International*, 3, 31-42.
- González-Tenorio, R., Fonseca, B., Caro, I., Fernández-Diez, A., Kuri, V., Soto, S., & Mateo, J. (2013). Changes in biogenic amine levels during storage of Mexican-style soft and Spanish-style dry-ripened sausages with different aw values under modified atmosphere. *Meat Science*, 94, 369-375.
- Goren-Inbar, N., Alpers, N., Kislev, M.E., Simchoni, O., Melamed, Y., Ben-Nun, & A, Werker, E. (2004) Evidence of hominin control of fire at Gesher Benot Ya`aqov, Israel. *Science* 304, 725-727.
- Gossner, C.M., Cauteren, D., Le Hello, S., Weill, F.X., Terrien, E., Tessier, S., Janin, C., Brisabois, A., Dusch, V., Vaillant, V., & Jourdan-da Silva, N. (2012). Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Eurosurveillance*, 17, 19-22.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knøchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., & Møller, J. K. S. (2008). Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate- reductase activities. *Meat Science*, 78, 492-501.
- Guàrdia, M.D., Estany, J., Balasch, S., Oliver, M.A., Gispert, M., & Diestre, A. (2005). Risk assessment of DFD meat due to pre-slaughter conditions in pigs. *Meat Science*, 70(4), 709-716.
- Gücüköglü, A., & Küplülü, Ö. (2010). The effect of different starters cultures and ripening temperatures on formation of biogenic amine in Turkish fermented sausages. *European Food Research and Technology*, 230(6), 875-884.
- Guerrero, L., Guàrdia, M. D., Xicola, J., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Zakowska-Biemans, S., & Hersleth, M. (2009). Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*, 52(2), 345-354.
- Guerrero, R.A. (2006). *Selección de Penicillium Productores de Péptidos Antifúngicos para su Utilización en Productos Cárnicos Madurados*, Tesis com vista à obtenção do grau de Doctorado en Zootenia, Facultad de Veterinária, Departamento de Veterinaria, Cáceres, Universidad de Extremadura.
- Guerrero, L., Guardia, M. D., & Arnau, J. (2005). Propuesta metodológica de análisis sensorial en jamón curado: criterios a considerar y sistemas de validación. *III. Congreso Mundial del Jamón*. Teruel: 187-194.

- Guyot, J. P., Calderon, M., & Morlon-Guyot, J. (2000). Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG18010T. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 176-182.
- Hajmeer, M.N., Tajkarimi, M., Gomez, E.L., Lim, N., O'Hara, M., Riemann, H.P., & (2011). Thermal death of bacterial pathogens in linguça smoking. *Food Control*, 22, 668-672.
- Hammes, W.P. (2012). Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology*, 29, 151-156.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (1998). New developments in meat starters cultures. *Meat Science*, 49(S1), S125-138.
- Hammes W.P., & Hertel, C. (1996). Selection and improvement of lactic acid bacteria used in meat and sausage fermentation. *Lait*, 76, 159-168.
- Hammes, W.P., Bosch, I., & Wolf, G. (1995). Contribution of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans* to the fermentation of protein foods. *Journal of Applied Bacteriology Symposium*, 79, 765-835.
- Hammes, W.P., Bantleon, A., Min, S., (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 165-173.
- Hansen, E.B. (2002). Commercial bacterial starters cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78 (1), 119-131.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M.C. (1997). Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2098-2102.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, M.T. & Vidal-Carou, M.C. (1996). Biogenic sources in cooked cured shoulder pork. *J. Agric. Food Chem*, 44, 3097-3101.
- Hierro, E., Fernández, L., De la Hoz, L. & Ordóñez, J.A. (2015). Mediterranean products In: Toldrá F., Hui, Y.H., Astiasarán, I., Sebranek., J.G. & Talon, R. (eds.), *Hanbook of Fermented Meat and Poultry* (301-312). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Hierro, E., Ordoñez, J.A, Bruna, J.M., Pin, C., Fernández, M., de la Hoz L. (2005). Volatile compound generation in dry fermented sausages by the surface inoculation of selected mould species. *European Food Research Technology*, 220, 494-501.
- Hierro, E., de la Hoz, L., & Ordóñez, J.A. (1997). Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the lipolysis of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2989-2995.
- Holko, I., Hrabě, J., Šalaková, A., & Rada, V. (2013). The substitution of a traditional starter culture in mutton fermented sausages by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*. *Meat Science*, 94 (3), 275-279.
- Hoseney, R.C., & Smewing, J. (1999). Instrumental measurement of stickiness of doughs and other foods. *Journal of Texture Studies*, 30, 123-136.
- Hotchkiss, J.H., Scanlan, R.A., & Libbey, L.M. (1997). Formation of bis(hydroxyalkyl)-n-nitrosamines as products of nitrosation of spermidine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 1183-1189.
- Hu, Y., Xia, W., & Ge, C. (2008). Characterization of fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter culture. *LWT-Food Science and Technology*, 41(4), 730-738.
- Hugas, M., (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49 (1), S139-S150.

- Humane Society of the United States (2010). An HSUS Report: The Welfare of Animals in the Pig Industry. *HSUS Reports: Farm Industry Impacts on Animals*. Paper 28, 25 pp.
- Hutkins, R.W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. USA, Blackwell Publishing. 473pp.
- IFT's (1981). *Classified Guide to Food Industry Services*, *Institute of Food Technologists*, 54 pp.
- Inês, A., Tenreiro, T., Tenreiro, R., & Faia, M. (2008). As Bactérias do Ácido Láctico do Vinho. *Ciência e Técnica Vitivinícola* 23(2) 81-96.
- Instituto Nacional de Estatística (2017). *Estatísticas agrícolas 2016*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P., 174 pp.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (2005). *Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities*. London, Blackie Academic and Professional. 763 pp.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1996). Salmonellae. Ch 14 In: *Microorganisms in food 5: Microbiological specifications of food pathogens* (217-264). London, Blackie Academic and Professional.
- ISO 6579-1:2017. Microbiology of food chain – Horizontal method for the detection, enumeration of Salmonella – Part 1: Detection of Salmonella spp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 21528-2:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 11290-2:2014. Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species – Part 1: Detection method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 4833-1:2013. Microbiology of food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganism - Colony-count technique at 30°C. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 8589:2012. Sensory analysis-General guidance for the design of test rooms. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 21527-2:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 17410:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms – International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 2917:1999. Meat and meat products. Determination of pH (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30°C. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 11036:1994 (E). Sensory analysis – Methodology – Texture profile. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- ISO 8586-1:1993. Sensory analysis-General guidance for the selection, training and monitoring of assessors-Part 1: Selected assessors. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jairath, G., Singh, P.K., Dabur, R.S., Rani, M., Chaudhari, M. (2015). Biogenic amines in meat and meat products and its public health significance: a review. *Journal Food ScienceTechnology*, 52, 6835-6846.
- Janssens, M., Myter, N., DeVuyst, L., Leroy, F. (2012). Species diversity and metabolic impact of the microbiota are low in spontaneously acidified Belgian sausages with an added starter culture of *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Food Science*, 29, 167- 177.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., & Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*. (7^a ed.). USA: Springer, 782 pp.
- Jay, L.S., Davos, D., Dundas, M., Frankish, E., & Lightfoot, D. (2003). *Salmonella*. Ch 8 In Hocking AD (ed), *Foodborne microorganisms of public health significance* (207-266). 6th ed, Australian Institute of Food Science and Technology Sydney, NSW Branch.
- Jay, J.M. (2002). *Microbiología moderna de los alimentos*. (4^a ed.). Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 615 pp.
- Jay, J.M. (2000). *Modern Food Microbiology*. (6^a ed.). New York, USA: Chapman & Hall. 625 pp
- Jay, J.M. (1996). *Modern Food Microbiology*. (5^a ed.). New York, USA: Chapman & Hall. 664 pp.
- Jeremiah, L., Carpenter, Z., & Smith, G. (1972). Beef color as related to consumer acceptance and palatability. *Journal of Food Science*, 37, 476-479.
- Jovita, M.R., González, A.M., & Breña, F.N. (2001). Población del jamón ibérico y su contribución en la maduración. Cultivos iniciadores. In Barroso, J.V. (ed.), *Tecnología del jamón ibérico: de los tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma* (343-366). Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.
- Jørgensen, L.V. Dalgaard, P. & Huss H.H. (2000). Multiple Compound Quality Index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 2448-2453.
- Kang, T. S., Korber, D. R., & Tanaka, T. (2013). Influence of oxygen on NADH recycling and oxidative stress resistance systems in *Lactobacillus panis* PM1: oxidative stress through NADH recycling in *L. panis* PM1. *AMB Express*, 3(1), 10.
- Kalač, P. (2009). Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine*, 7, 65-74.
- Kameník, J., Saláková, A., Bořilová, G., & Pavlík, Z. (2012). Effect of storage temperature on the quality of dry fermented sausage Poličan. *Czech Journal of Food Science*, 30, 293-301.
- Karovičová, J. & Kohajdová, Z. (2005). Biogenic amines. *Food Chemistry*, 59,70-79.
- Kargozari, M., Moini, S., Basti, A. A., Emam-Djomeh, Z., Gandomi, H., & Martin, I. R., (2014). Effect of autochthonous starter cultures isolated from Siahmazgi cheese on physicochemical, microbiological and volatile compound profiles and sensorial attributes of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage. *Meat Science*, 97,104-114.
- Kauffman, R. G., Cassens, R. G., Scherer, A., & Meeker, D.L. (1992). Variations in pork quality: history, definition, extent, resolution. Des Moines: National Pork Producers Council, 1-8.
- Kenney, P.B., & Hunt, M.C. (1990). Effect of water and salt content on protein solubility and water retention of meat preblends. *Meat Science*, 27, 173-17.
- Khan, M. I., Jo, C., & Tariq, M. R. (2015). Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors. A systematic review. *Meat Science*, 110, 278-284.

- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103-25.
- Kongkiattikajorn, J. (2015). Potential of starter culture to reduce biogenic amine accumulation in som-fug, a Thai traditional fermented fish sausage. *Journal of Ethnic Foods*, 2(4), 186-194.
- Kloos, W.E., & Bannerman, T.L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev*, 7, 117-40.
- Kozačinski, L., Drosinos, E., Čaklović, F., Cocolin, L., Gasparik-Reichardt, J., & Vesković, S. (2008). Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 93-106.
- Knight, P., & Parsons, N. (1988). Action of NaCl and polyphosphates in meat processing: responses of myofibrils to concentrate salt solutions. *Meat Science*, 24, 275-279.
- Kröckel, L. (2013). The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products. In: Kongo, M. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (129-156). InTech.
- Kröckel, L. (2006). Use of probiotic bacteria in meat products. *Fleischwirtschaft*, 86, 109-113.
- Kuhn, K.G., Torpdahl, M., Frank, C., Sigsgaard, K., & Ethelberg, S. (2011). An outbreak of *Salmonella* Typhimurium traced back to salami, Denmark, April to June (2010). *Eurosurveillance*, 16, 13-16.
- Kumar, P., Chatli, M.K., Verma, K., Metha, N., Metha, N., Malav, Q.P., Kumar, D. & Sharma, N. (2017). Quality, functionality, and shelf life of fermented meat and meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2844-2856.
- Kurt, S., & Zorba, Ö. (2010). Biogenic amine formation in Turkish dry fermented sausage (sucuk) as affected by nisin and nitrite. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15), 2669-2674.
- Lachowicz, K., Zochowska-Kujawska, J., & Sobczak, M. (2012). Fermented meat products: Microbiology and Biochemistry In Mehta, B.M., Kafamal-Eldin, A., Iwanski, R.Z. (eds.), *Fermentation - Effects on Food properties* (309-344). New York, USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Ladero, V., Fernandez, M., Callez-Enriquez, M., Sanchez-Llana, E., Canedo, E., Martin, M.C., & Alvarez, M.A. (2012). Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiology*, 30, 132-138.
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., & Alvarez, M. A. (2010). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition. Food Science*, 6(2), 145-156.
- Landeta, G., Reverón, I., Carrascosa, A.V., de las Rivas, B., Muñoz, R., (2011). Use of recA gene sequence analysis for the identification of *Staphylococcus equorum* strains predominant on dry-cured hams. *Food Microbiology* 6, 1205-1210.
- La Gioia, F., Rizzotti, L., Rossi, F., Gardini, F., Tabanelli, G., & Torriani, S. (2011). Identification of a tyrosine decarboxylase (tdcA) gene in *Streptococcus thermophilus* 1TT45: Analysis of its expression and tyramine production in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1140-1144.
- Laguna Sanz, E. (1998). *El Cerdo Ibérico*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Laranjo, M. Gomes, A. Agulheiro-Santos, A., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Rocha, J.M., Roseiro, L.C., Fernandes, M.J., Fraqueza, M.J. & Elias, M. (2017a). Impact of salt reduction on biogenic amines, fatty acids, microbiota, texture and sensory profile in traditional blood dry-cured sausages. *Food Chemistry*, 218, 129-136.

- Laranjo, M., Elias, M., & Fraqueza, M.J. (2017b). Review - The Use of Starter Cultures in Traditional Meat Products. *Journal of Food Quality*, 1-18.
- Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Rocha, J.M., Roseiro, L.C., Fernandes, M.J., Fraqueza, M.J. & Elias, M. (2016). Characterisation of “Catalão” and “Salsichão” Portuguese traditional sausages with salt reduction. *Meat Science*, 116,34-42.
- Laranjo, M., Agulheiro-Santos, A. C., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Fraqueza, M.J., & Elias, M. (2015). Effects of genotype, salt content and calibre on quality of traditional dry-fermented sausages. *Food Control*, 56, 119-127.
- Lariy, F., Gaudman, T., & Vuyst, L. (2015). The influence of processing parameters on starter culture performance in Toldra, F. (eds), *Handboock of fermented meat and poultry* (169-175). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Latorre-Moratalla, M. L., Comas-Bast, O., Bover-Cid, S., & Vidal-Carou, M.C. (2017). Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food and Chemical Toxicology*, 99, 78-85.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-Carou, M. C. (2014). Amino acid availability as an influential factor on the biogenic amine formation in dry fermented sausages. *Food Control*, 36(1), 76-81.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Bosch-Fusté, J., & Vidal-Carou, M.C. (2012a). Influence of technological conditions of sausage fermentation on the aminogenic activity of *L. curvatus* CTC273. *Food Microbiology*, 29(1), 43-48.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-Carou, M.C. (2012b). Control of biogenic amines in fermented sausages: Role of starter cultures. *Frontiers in Food Microbiology*, 3, 1-9.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Talon, R., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Elias, M., Drosinos, E.H., Lauková, A., and Vidal-Carou, M.C. (2010a). Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures. *Journal of Food Protection*, 73, 524-525.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Talon, R., Garriga, M., Zanardi, E., Lanieri, A., Fraqueza, M. J., Elias, M., Drosinos, E.H., & Vidal-Carou, M. C. (2010b). Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT - Food Science and Technology*, 43(1), 20-25.
- Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogues, T., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., & Zanardi, E., (2008). Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*, 107(2), 912-921.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Aymerich, T., Marcos, B., Vidal-Carou, M.C., & Garriga, M. (2007). Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science*, 75(3), 460-469.
- Lauková, A. (2011). Using natural and noval antimicrobials to improve the safety and shelf-life stability of process meat products In: Kerry, J.P. and Kerry, J.F. (Eds), *Processed meats improving safety, nutrition and quality* (299-330). High Street, Sawston, Cambridge:Woodhead publishing.
- Lawless, H.Y., & Heymann, H. (1999). *Sensory evaluation of food. Principles and practices*. New York: Chapman e Hall, 827 pp.
- Lawrie, R.A. (2005). *Ciência da carne*. 6.ª Edição. Porto Alegre, Brasil: Artmed Editora. 384 pp.

- Lebert, I., Leroy S. & Talon, R. (2007a). Microorganisms in Traditional Fermented Meats. In: F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (113-124). Blackwell, Oxford.
- Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J.P., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, M.C. & Talon, R. (2007b). Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*, 76, 112-122 .
- Ledesma, E., Laca, A., Rendueles, M., & Díaz, M. (2016). Texture, colour and optical characteristics of a meat product depending on smoking time and casing type. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 164-172.
- Lee, G., & Lee, C. (2015). Safety aspects of alkaline-fermented foods. In: P. Sarkar & J. Nout (Eds.), *Handbook of indigenous foods involving alkaline fermentation* (399-424). Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Leistner, L. (1995). Stable and safer fermented sausages world-wide. In: Campbell-Platt, G.; Cook, P.E. (eds). *Fermented meats* (pp.160-175) Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Leistner, L., & Roedel, W. (1975). The significance of water activity for microorganisms in meats. In R.B. Duckworth (Ed.), *Water relations of foods* (pp. 309-323). London: Academic Press.
- Leroy, F., Scholliers, P., & Amilien, V. (2015a). Elements of innovation and tradition in meat fermentation: Conflicts and synergies. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 2-8.
- Leroy, S., Lebert, I., & Talon, R. (2015b). Microorganisms in traditional fermented meats In: Toldrá F., Hui, Y.H., Astiasarán, I., Sebranek, J.G. & Talon, R. (eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (99-105). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Leroy, S., Lebert, I., Chacornac, J.P., Chavant, P., Bernardi, T., & Talon, R., (2009). Genetic diversity and biofilm formation of *Staphylococcus equorum* isolated from naturally fermented sausages and their manufacturing environment. *International Journal of Food Microbiology* 134, 46-51.
- Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 270-285.
- Liepe, H.U. (1985). Starter cultures in meat production Food and Feed Production with Microorganisms. In: Reed, G. (ed.), *Biothechnology*. Vol.5 (399-424). Weinheim Verlag: Chemie.
- Lima, M.G.O.L.B. (2014). *Caracterização reológica e microstrutural de emulsões água em óleo para uso alimentar*. Tese de doutoramento. Universidade de Évora.
- Linares, D.M., del Rio, B., Redruello, B., Ladero, V., Martín, M.C, Fernandez, M., Ruas-Madiedo, P., & Alvarez, M.A. (2016). Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. *Food Chemistry*, 197, 658-663.
- Linares, D.M., Martín, M.C., Ladero, V., Álvarez, M.A., & Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 691-703.
- Lizaso, G., Chasco, J., & Beriain, M.J. (1999). Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiology*, 16(3), 219-228.
- López, V.M.T. (1997). Acción da la flora fúngica durante la maduración de los embutidos. Dissertação para obtenção do grau de doutor en Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidad Complutense de Madrid.
- Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., & Domínguez, R. (2017). Role of autochthonous starter cultures in the reduction of biogenic amines in traditional meat products. *Current Opinion in Food Science*, 14, 61-65.

- Lorenzo, J.M., Gómez, M., & Fonseca, S. (2014). Effect of commercial starter cultures on physicochemical characteristics, microbial counts and free fatty acid composition of dry-cured foal sausage. *Food Control*, 46, 382-389.
- Lorenzo, J.M., & Franco, D. (2012). Fat effect on physio-chemical, microbial and textural changes through the manufactured of dry-cured foal sausage lipolysis, proteolysis and sensory properties. *Meat Science*, 92, 704-714.
- Lorenzo, J. M., Purriños, L., Bermudez, R., Cobas, N., Figueiredo, M., & García-Fontán, C. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: "Chorizo gallego" and "Chorizo de cebolla". *Meat Science*, 89(1), 105-109.
- Lozano-Ojalvo, D., Rodríguez, A., Cordero, M., Bernáldez, V., Reyes-Prieto, M., & Córdoba, J. J. (2015). Characterisation and detection of spoilage mould responsible for black spot in dry-cured fermented sausages. *Meat Science*, 100, 283-290.
- LPSN (2018). *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus Staphylococcus*. [Internet] Disponible em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>. [Consulta efetuada a 21 de abril de 2018].
- Lu, S., Li, H., Wang, Q., Li, B., Li K., Xu, C., & Jiang, C. (2015). The effects of startercultures and plant extracts on the biogenic amine accumulation in traditional Chinese smoked horsemeat sausages. *Food Control*, 50, 869-875.
- Lücke, F.K., Vogeley, I. (2012). Traditional 'air-dried' fermented sausages from Central Germany. *Food Microbiology*, 29, 242-246.
- Lücke, F.K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat, *Meat Science*, 56, 105-115.
- Lücke, F.K. (1998). Fermented sausages. In: Wood, B.J.S. (Ed.), *Microbiology of Food Fermentation* Vol.2. (441-483). London: Applied Science Publishers.
- Lücke, F.K. (1994). Fermented meat products. *Food Research International*, Oxford, v.27, n.3, 299-307.
- Lücke, F.K. & Hechelmann, H. (1987). Starter cultures for dry sausages and raw ham. *Fleischwirtsch*, 67(3), 307-314.
- Ludemann, V., Greco, M., Rodríguez, M. P., Basílico, J. C., & Pardo, A. (2010). Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausage by solid state fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 43,315-318.
- Lyon, D.H., Francombe, M.A., Hasdell, T.A., & Lawson, K. (1992). *Guidelines for sensory analysis in food product development and quality control*. London (UK): Chapman & Hall, 131-179.
- Maijala, R., Lievonen, S., Hill, P., & Hirvi, T. (1995). Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter cultures and thawing time of raw materials. *Journal of Food Science*, 60(6), 1187-1190.
- Maijala, R., Eerola, S., (1993). Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science*. 35, 387-395.
- Maijala, R., Eerola, S., Aho, S., & Rin, J. (1993). The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, 56(2), 125-129.
- Marcobal, A., De las Rivas, B., Landete, J.M., Tabera, L., & Munoz, R. (2012). Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 448-467.

- Marianski, S., Marianski, A., & Marianski, R. (2006). *Meat smoking and smokedhouse design*. Seminole, Florida: Bookmagic, LLC, 9-32 pp.
- Mariné, A., Vidal, M. C., Izquierdo, M. & Veciana, T. (1995). Aminas biogénicas en alimentos: unos microcomponentes de interés múltiple. *Revista Espanola de Nutrición Comunitaria*, 138-141.
- Martín, A., Colin, B., Aranda, E., Benito, M. J. & Cordoba, M.G. (2007). Characterization of Micrococcaceae isolated from iberian dry cured sausages. *Meat Science*, 75, 696-708.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal Food Microbiology*, 107, 148-158.
- Martín, A., Aranda, E., Benito, M.J., Pérez-Nevado, F. & Córdoba M.G. (2005). Identification of fungal contamination and determination of mucotoxigenic molds by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography in smoked paprika. *Journal Food Proteomic*, 68, 815-822.
- Martinez, O., Salmerón, J., Guillén, M., & Casas, C. (2004). Texture profile analysis of meat products treated with commercial liquid smoke flavourings. *Food Control*, 15(6), 457-461.
- Martins, C., (1990) Avaliação sensorial dos alimentos. Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro, Vila Real, 38 pp.
- Martuscelli, M., Pittia, P., Casamassima, L. M., Manetta, A. C., Lupieri, L., & Neri, L. (2009). Effect of intensity of smoking treatment on the free amino acids and biogenic amines occurrence in dry cured ham. *Food Chemistry*, 116, 955-962.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., & Vilanni, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative *staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy, *Meat Science*, 67 (1), 149-158.
- Mauriello, G., Casaburi, A., & Villani, F. (2002). Proteolytic activity of *Staphylococcus xylosum* strains on pork myofibrillar and sarcoplasmic proteins and use of selected strains in the production of Naples type salami. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 482-490.
- Martin, F., Ebel, B., Rojas, C., Gervais, P., Cayot, N., & Cachon, R. (2013). Redox Potential: Monitoring and Role in Development of Aroma Compounds, Rheological Properties and Survival of Oxygen Sensitive Strains During the Manufacture of Fermented Dairy Products. In: Congo, M. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (73-94).
- Meilgaard, M., Civille, G.V., & Carr, B.T. (1999). *Sensory evaluation techniques*. New York, USA, CRC Press. 387 pp.
- Melendo, J.A., Beltran, J.A., Jaime, I., Sancho, R., & Roncales, P. (1996). Limited proteolysis of myofibrillar proteins by bromelain decreases toughness of coarse dry sausage. *Food Chemistry*, 57, 429-433.
- Mendonça, R.C.S., Gouvêa, D.M., Hungaro, H.M., & Sodrê, A.D. F. (2013). Dynamics of the yeast flora in artisanal country style and industrial dry cured sausage (yeast in fermented sausage). *Food Control*, 29(1), 143-148.
- Mietz, J.L., & Karmas, E. (1977). Chemical quality index of canned tuna as determined by highpressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 42, 155-158.
- Miguélez-Arrizado, M.J., Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M.L., & Vidal-Carou, M.C. (2006). Biogenic amines in Spanish fermented sausages as a function of diameter and artisanal or industrial origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 549-557.

- Molinard, P., & Spinnler, H. (1996). Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened chesses: origins and properties. *Journal Dairy Science*, 79, 169-84 .
- Möhler, K. (1980). *El ahumado*. En: Ciencia y Tecnología da Carne, Teórica y Práctica. Zaragoza, Espanha. Ed. Acribia. 74 pp.
- Moll, N., & Moll, M. (1990). *Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques*. Paris, França, Editora Masson, 146 pp.
- Møller, L.K.S., Jongberg, S. & Skibsted, L.H. (2015). Color in Toldra, F. (eds), *Handboock of fermented meat and poultry* (195-205). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, & M., Geenen, I. (1997) The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chemistry*; 59 (4): 539-545.
- Molly, K.D.I., Demeyer, T., Civera, A. & A. Verplaetse. (1996). Lipolysis in Belgian sausages: Relative importance of endogenous and bacterial enzymes. *Meat Science*, 43, 235-244.
- Montanha, F.P., Anater, A., Burchard, J. F., Luciano, F. B., Meca, G., Manyes, L., & Pimpão, C.T. (2018). Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 494-502.
- Montel, M.C., Masson, F., Talon, R. (1999). Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. *Sciences des Aliments*, 19, 247-254.
- Montel, M. C., Masson, F., & Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development, *Meat Science*, 49, S111–S123
- Mora-Gallego, H., Serra, X., Guàrdia, M. D., & Arnau, J. (2014). Effect of reducing and replacing pork fat on the physicochemical, instrumental and sensory characteristics throughout storage time of small caliber non-acid fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Science*, 97(1), 62-68.
- Murray, A.C. (1995) The evaluation of Muscle Quality. In: Jones, S.D. (Ed.), *Quality and grading of carcasses of meat animals* (83-107). M. Boca Raton, USA, CRC Press.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K., Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Eletric Journal of Biotechnology*, [on line], Vol.7(nº2). Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v7n2-7/520>. [Consulta efetuada a 21 de abril de 2018].
- Ngapo, T.M., & Gariépy, C. (2008). Factors affecting the eating quality of pork. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 599-633.
- Nout, M.J.R. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Research International* 27, 291-296.
- Nuñez, M., del Olmo, A., & Calzada, J. (2016). Biogenic Amines. In: Caballero, B., Finglas, P., & Toldra, F. (Eds.), 1nd ed. *Encyclopedia of food and health* (416-423). Oxford, Reunio Unido: Academic Press.
- Oellingrath, I. M., & Slinde, E. (1985). Color, pigment and iron content of meat loaves with blood, blood emulsion of mechanically deboned meat added. *Journal of Food Science*, 50, 1551-1555.
- Oliveira, M., Ferreira, V., Magalhães, R., & Teixeira, P. (2018). Biocontrol strategies for Mediterranean-style fermented sausages. *Food Research International*, 103 (July 2017), 438-449.
- Önal, A., Tekkeli, S. E. K., & Önal, C. (2013). A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 138(1), 509-15.
- Ordóñez, J.A., Asensio, M.A., & Hoz, L. (2005). Riesgos microbianos asociados al jamón curado. *III. Congreso Mundial del Jamón*. Teruel: 101-113.

- Ordoñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M., & de la Hoz L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329-367.
- Orla-Jensen, S. (1919). In: Orla-Jensen, S. (Ed.), *The Lactic Acid Bacteria*. Høst, Copenhagen, pp. 1-196.
- Palma, S.F. (2008). Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em produtos cárneos fumados. *Sequali – Segurança e Qualidade Alimentar*, 5, 41-43.
- Pala, T.R., & Sevilla A. (2004). Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iberian pork cutting plant. *Journal of Food Protection*, 67, 1624-1629.
- Papadima, S.N., & Bloukas, J.G. (1999). Effect of fat level and storage conditions on the quality characteristics of traditional Greek sausages. *Meat Science*, 51, 103-113.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Lipopoulou-Tzanetaki, E., & Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65, 859-867.
- Papamanoli, E., Kotzekidou, P., & Tzanetakis, N. (2002). Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology*, 19, 441-449.
- Papavergou E.J., Savvaidis I.N., & Ambrosiadis, I.A. (2012). Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chemistry*, 135, 2750-2755.
- Papavergou, E.J. (2011). Biogenic amine levels in dry fermented sausages produced and sold in Greece. *Procedia Food Science*, 1, 1126-1131.
- Papavergou, E., Herraiz, T. (2003). Identification and occurrence of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid: the main β -carboline alkaloid in smoked foods. *Food Research International*, 36(8), 843-848.
- Paramithiotis, S., Drosinos, E.H., Sofos, J.N., & Nychas, G.H. (2010). Fermentation: Microbiology and Biochemistry In: Toldra, F. (ed), *Handbook of meat processing* (185-198). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M.A., & Suzzi, G. (2001). Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 882-891.
- Patarata, L.A.S.C. (2002). Caracterização e avaliação da aptidão tecnológica de bactérias do ácido láctico e *Micrococcaceae* em produtos de salsicharia. Tese de Doutorado. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Patience, J. (2013). Top Ten Developments in Swine Nutrition (1991-2012). *Prairie Swine Centre. Pork Insight*, 1-28.
- Pérez-Alvarez, J.A. Sayas-Barbará, M.E. Fernández-López, J. & Aranda-Catalá, V. (1999). Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Research International*, 32, 599-607.
- Pittia, P., Martuscelli, M., Munari, M., Chavez-Lopez, C. (2005). Effect of smoking on quality and microbial characteristics of dry cured ham. *Industria Alimentari*, 44, 1235-1243.
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D.G., & Elliott, P.H. (2010). Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1919-1936.
- Prax, M., Lee, C.Y., & Bertram, R. (2013). An update on the molecular genetics toolbox for staphylococci. *Microbiology*, 159, 421-35.

- Prester, L. (2016). Biogenic Amines in ready-to-eat foods (chap. 22). In: Kotzekidou, P. (Ed.), *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (397-416), 1st ed. Oxford, Reino Unido: Academic Press.
- Pugliese, C., & Sirtori, F. (2012). Quality of meat and meat products produced from southern European pig breeds. *Meat Science*, 90(3), 511-518.
- Puolanne, E. & Petäjä-Kanninen, E. (2015). Principles of Meat Fermentations in Toldra, F. (eds), *Handbook of fermented meat and poultry* (13-17). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Purriños, L., Carballo, J., & Lorenzo, J.M., (2013). The Influence of *Debaryomyces hansenii*, *Candida deformans* and *Candida zeylanoides* on the aroma formation of dry-cured "Iacón". *Meat Science*, 93, 344-350.
- Qu, D., Zhou, X., Yang, F., Tian, S., Zhang, X., Ma, L., & Han, J. (2017). Development of class model based on blood biochemical parameters as a diagnostic tool of PSE meat. *Meat Science*, 128, 24-29.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., & Belloch, C. (2008). Genetics of Yeasts In: Toldrá, F. (Ed), *Meat Biotechnology* (167-180). New York, USA:Springer Science, Business Media, LLC.
- Rabie, M.A., Peres, C., & Malcata, F.X. (2014). Evolution of amino acids and biogenic amines throughout storage in sausages made of horse, beef and turkey meats. *Meat Science*, 96, 82-87.
- Ramos, J.J.C. (1990). *Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo ibérico*. Tese com vista à obtenção do grau de Doutor. Universidade de Extremadura, Cáceres, 214 pp.
- Rantsiou, K., Urso, R., Lacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., & Cocolin, L. (2005). Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 1977-1986.
- Rauch M., & Lynch S.V. (2011). The potential for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. *Current Opinion in Biotechnology*, 23,191-201.
- Ravyts, F., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2012). Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Engineering in Life Science*, 12(4), 356-367.
- Ravyts, F., Steen, L., Goemare, O., & Paelinck, H. (2010). The application of staphylococci with flavour-generating potential is affected by acidification in fermented dry sausages. *Engineering in Life Science*, 27, 945-954.
- Regulamento n.º 1151/2012 – *Jornal Oficial da União Europeia*, N.º 343 de 21 de novembro de 2012. Comissão das Comunidades Europeias, 01-29.
- Regulamento n.º 1169/2011 – *Jornal Oficial da União Europeia*, N.º 304 de 22 de novembro de 2011. Comissão das Comunidades Europeias, 18-63.
- Regulamento n.º 1441/2007 – *Jornal Oficial da União Europeia*, N.º 322 de 05 de dezembro de 2007. Comissão das Comunidades Europeias, 12-29.
- Regulamento n.º 2073/2005 – *Jornal Oficial da União Europeia*, N.º 338 de 22 de dezembro de 2005. Comissão das Comunidades Europeias, 1-26.
- Regulamento n.º 853/2004 – *Jornal Oficial da União Europeia*, N.º 139 de 30 de abril de 2004. Comissão das Comunidades Europeias, 55-205.
- Regulamento n.º 178/2002 – *Jornal Oficial da União Europeia*, N.º 31 de 01 de fevereiro de 2002. Comissão das Comunidades Europeias, 01-24.

- Richards, M. (2006). Lipid chemistry and biochemistry. In Hui, Y. (ed.) *Handbook of food science technology and engineering* (8-1 - 8-17). New York, USA: Taylor & Francis Group, LLC.
- Ricke, S. C., Diaz, I. Z., & Keeton, J. T. (2007). Fermented meat, poultry, and fish products. In Doyle, M.P., & Beuchat, L.R. ed. *Food microbiology: fundamentals and frontiers, 3rd.*, Washington, D. C., A.S.M. Press, pp. 795-812.
- Robinson, R.K. (2014). *Encyclopedia of food microbiology*. San Diego, U.S.A.: Academic press; Elsevier.
- Rojas, M.T.A. & Cáceres, L.M. (2001). Reacciones químicas y bioquímicas que se desarrollan durante la maduración del jamón ibérico. In Ventanas, J., (ed), *Tecnología del jamón ibérico: de los tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma* (293-322). Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Romano, P., Capece, A., & Jespersen, L. (2006). Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In: Querol, A., Fleet, G.H. (Eds.), *The Yeasts Handbook* (13-53). Germany: Springer Verlag.
- Roseiro, C., Gomes, A., & Santos, C. (2011). Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1340.
- Roseiro, L.C., Gomes, A., Gonçalves, H., Sol, M., Cercas, R., & Santos, C. (2010). Effect of processing on proteolysis and biogenic amines formation in a portuguese traditional dry-fermented ripened sausage "Chouriço Grosso de Estremoz e Borba PGI". *Meat Science*, 84, 171-179.
- Roseiro, L.C., Santos, C., Sol, M., Borges, M. J., Anjos, M., Gonçalves, H. (2008). Proteolysis in Painho de Portalegre dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. *Meat Science*, 79(4), 784-794.
- Roseiro, C., Santos, C., Sol, M., Silva, L., & Fernandes, I. (2006). Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Science*, 74(3), 557-563.
- Rosenthal, A.J. (1999). *Food texture. Measurements and Perception* – United States of America: Editorial Aspen Publishers, INC. 311 pp.
- Rubio, R., Aymerich, T., Bover-Cid, S., Guardia, M. D., Arnau, J., & Garriga, M. (2013). Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as starter cultures for fermented sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 54, 51-56.
- Rubio, R., Jofré, A., Aymerich, T., Guardia, M.D., & Garriga, M. (2014). Nutritionally enhanced fermented sausages as a vehicle for potential probiotic lactobacilli delivery. *Meat Science*, 96, 937-942.
- Ruiz, J. & Pérez-Palacios, T. (2015). Ingredients in: Toldra, F. (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (55-66). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8), 489-599.
- Ruiz-moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Hernández, A., Casquete, R., & Córdoba, M.D.G. (2011). Application of *Lactobacillus fermentum* HL57 and *Pediococcus acidilactici* SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages. *Food Microbiology*, 28(5), 839-847.
- Saaid, M., Saad, B., Hashim, N.H., Mohamed Ali, A.S., & Saleh, M.I. (2009). Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry*, 113(4), 1356-1362.
- Sabor Artesano (2011). *El Jamón Serrano en la Historia*. [Internet] Disponível em <http://www.sabor-artesano.com>. [Consulta efetuada a 21 de março de 2017].

- Salminen, S., & Wright, A. (1998). Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Functional Aspects*, 2ª edição, pp. 1-73;
- Samelis, J. & Sofos, N. (2003). Yeasts in meat and meat products. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects* (234-265). Germany, Behr's Verlag.
- Sanabria, C., Martín-Alvarez, P. J., & Carrascosa, A.V. (2004). Colour and moisture changes during the manufacture of Iberian dry-cured ham caused by some biotic and abiotic factors. *Food Science and Technology International*, 110, 269-275.
- Sanchez, D.B.O. (2009). *Desempenho reológico e entálpico da massa de pão com amido resistente de milho e transglutaminase*. Tese com vista à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Campinas-São Paulo, 84 pp.
- Sanchez, M.J. & Lorente, M.M. (2005). Revisión y comparación de métodos de evaluación sensorial en jamón serrano. III. *Congreso Mundial del Jamón*. Teruel: 171-176.
- Sanchez, M.F. & Arnau, J. (1998). The effect of inoculation of a starter culture on sensory characteristics of dry-cured hams using two different resting technologies. *Proc. 44th International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, 1010.
- Santos, L.M.S.A. (2003). *Seleção de estirpes do Género Lactobacillus para utilização como culturas de arranque em enchidos tradicionais do Alentejo*. Relatório do Trabalho de fim de curso, Licenciatura em Engenharia Zootécnica, Universidade de Évora.
- Santos, M.H.S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.
- Sarra, P.G., Cabras, M., & Dellaglio, F. (1982). Microbiological aspects of the manufacturing of "Coppa Piacenza" salami. *Industrie Alimentarie*, 21, 477-481.
- Sanz, Y, Sentandreu, M.A., Toldrá, F. (2002). Role of muscle and bacterial exo-peptidases in meat fermentation. In: F Todrá (ed.), *Research Advances in the Quality of Meat and Meat Products*, (143-155), Trivandrum, India: Research Signpost.
- Sayas-Barberá, E.; Viuda-Martos, M.; Fernandez-López, F.; Pérez-Alvarez, E. & Sendra, E. (2012). Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage "Longaniza de Pascua". *Food Control*, 27(2), 343-350.
- Scott-Blair, G. (1958). Rheology in food research. *Advances in Food Research*, 8, 1-56.
- Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health, 29(7), 675-690.
- Selgas, M.D. & Garcia, M.L. (2015). Yeasts in Toldra, F. (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (139-146). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Selgas, M.D. & Garcia, M.L. (2007). Starter Cultures: Yeasts. In: Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (159-169). Iowa, EUA: Blackwell Publishing.
- Selgas, M.D., Ros, J., García, M.L. (2003). Effect of selected yeast strains on the sensory properties of dry fermented sausages. *European Food Research and Technology*, 217, 475-480 .
- Silvestri, G., Santarelli, S., Aquilanti, L., Beccaceci, A., Osimani, A., Tonucci, F., & Clementi, F. (2007). Investigation of the microbial ecology of Ciauscolo a traditional Italian salami by culture-independent techniques and PCR-DGGE. *Meat Science*, 77, 413-42.

- Simion, A.M.C., Vizireanu, C., Alexe, P., Franco, I., & Carballo, J. (2014). Effect of the use of selected starters cultures on some quality, safety and sensorial properties of Dacia sausage, a traditional Romanian dry-sausage variety, *Food Control*, 35(1), 123-131.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R., & Quintavalla, S. (2007). Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiology*, 24(6), 577-584.
- Simonová, M., Strompfová, V., Marcinàková, M., Lauková, A., Vesterlund, S., & Moratalla, M.L., (2006). Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Science*, 73(4), 559-564.
- Singh, V.P., Pathak, V., & Verma, A.K. (2012). Fermented meat products: Organoleptic Qualities and Biogenic Amines - a Review. *American Journal of Food Technology*, 7(5) 1-11.
- Sikorski, Z.E. & Sinkiewicz, E. (2015). Principles of Smoking in Toldra, F. (eds), *Handboock of fermented meat and poultry* (39-45). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Sikorski, Z.E. & Kotakowski, E. (2010). Smoking in Toldra, F. (eds), *Handboock of meat processing* (231-246). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Skibsted, L.H., Mikkelsen, A. & Bertelsen G. (1998). Lipid-derived off-flavours in meat. In: Shahidi, F. (Ed.) *Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods* (216-256), 1nd ed. London, England: Blackie Academic & Professional.
- Soares, A. (2003). *Seleccção de estirpes do género Lactobacillus para utilização como cultura de arranque em enchidos tradicionais do Alentejo*. Relatório do Trabalho de fim de curso, Licenciatura em Engenharia Zootécnica, Universidade de Évora.
- Sousa, M.C., & Ribeiro, A. (1983). Chouriço de Carne Português: tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica. *Revista Alimentar*, 1: 14-23.
- Spaziani, M., Torre, M.D., & Stecchini, M.L. (2009). Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *Meat Science*, 81, 77-85.
- Spotti, E.; Berni, E. & Cacchioli, C. (2008). Characteristics and Aplications of Molds In: Toldrá, F. (Ed), *Meat Biotechnology* (167-180). New York, USA: Springer Science, Business Media, LLC.
- Stadnik, J., & Dolatowski, Z.J. (2010). Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polunorum, Technologia Alimentaria*, 9(3), 251-263.
- Stahnke, L.H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Science*, 38, 39-53.
- Stiles, M.E., & Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Sunesen, L.O., & Stahnke, L.H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages - selection, application and effects, *Meat Science*, 65, 935-948.
- Sun, Q., Chen, Q., Li, F., Zheng, D., & Kong, B. (2016). Biogenic amine inhibition and quality protection of Harbin dry sausages by inoculation with *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 68, 358-366.
- Suzzi, G., & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages : a review, *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 41-54.
- Szczesniak, A.S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13 (4), 215-225.

- Szczesniak, A.S. (1963a). Objective measurement of food texture. *Journal Food Science*, 28, 410-420.
- Szczesniak, A.S. (1963b). *Classification of textural characteristics*. *Journal Food Science*, 28, 385-389.
- Tabanelli, G., Montanari, C., Grazia, L., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2013). Effects of aw at packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. *Meat Science*, 94(2), 177-186.
- Tabanelli, G., Coloretti, F., Chiavari, C., Grazia, L., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2012). Effects of starters cultures and fermentation climate on the properties of two types of typical Italian dry fermented sausages produced under industrial conditions. *Food Control*, 26(2), 416-426.
- Talon, R., & Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science*, 89(3), 303-309.
- Talon, R., Leroy, S., Lebert, I., Giammarinaro, P., Chacornac, J.P., Latorre-Moratalla, M., & Lebecque, A. (2008). Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 227-34.
- Talon R., Lebert I., Lebert A., Leroy S., Garriga M., Aymerich T., Drosinos EH., Zanardi E., Ianieri A., Fraqueza M. J., Patarata L., & Laukova A., (2007a). Traditional dry fermented sausages produced in small – scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. *Meat Science*, 77(4), 570-579.
- Talon, R., Leroy, S., & Lebert, I. (2007b). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products : The importance of indigenous starters. *Meat Science*, 77, 55-62.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S., & Fadda, S. (2002). Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. Research Advances in Quality of Meat and Meat Products, vol. Chapter 10. *Research Signpost*, 175-191.
- Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barière, C., & Montel, M.C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 52(1-2), 47-56.
- Tasić, T., Ikonić, P., Mandić, A., Jokanović, M., Tomović, V., Savatić, S., & Petrović, L. (2012). Biogenic amines content in traditional dry fermented sausage Petrovská klobása as possible indicator of good manufacturing practice. *Food Control*, 23, 107-112.
- Taskila, S. & Ojamo, H. (2013). The Current Status and Future expectations in industrial production of lactic acid by Lactic Acid Bacteria. In: Kongo, M. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food. Health and Livestock Purposes* (615-632).
- Tjener, K., Stahnke, L. H., Andersen, L., & Martinussen, J. (2004). Growth and production of volatiles by *Staphylococcus carnosus* in dry sausages: Influence of inoculation level and ripening time. *Meat Science*, 67(3), 447-452.
- Toldrá, F. & Reig, M. (2015). The Biochemistry of Meat and Fat In: Toldrá F., Hui, Y.H., Astiasarán, I., Sebranek., J.G. & Talon, R. (eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (49-53). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Toldrá, F. (2011). Improving the sensory quality of cured and fermented meat products In: Kerry, J.P. and Kerry, J.F. (Eds), *Processed meats improving safety, nutrition and quality* (508-519). High Street, Sawston, Cambridge:Woodhead publishing
- Toldrá, F. (2008). Biotechnology of flavor generation in fermented meats. In: Toldrá, F. (Ed), *Meat Biotechnology* (199-225). New York, USA: Springer Science, Business Media, LLC.

- Toldrá, F. & Flores, M. (2007). Processed pork meat flavors. In: Hui, Y.H. (Ed), *Food products Manufacturing* (282-297). New Jersey, USA: Wiley-Interscience, John Wiley & Sons Inc.
- Toldrá, F. (2007). Fermented meat production. In: Hui, Y.H. (Ed), *Food products Manufacturing* (266-275). New Jersey, USA: Wiley-Interscience, John Wiley & Sons Inc.
- Toldrá, F. (2006a). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science and Technology*, 17,164-168.
- Toldrá F. (2006b). Fermented meat products. In: Hui YH, Nip WK, Nollet ML, Paliyath G, Simpson BK, editors. *Food biochemistry and food processing*. Ames, Iowa Blackwell Publishing. p. 641-58.
- Toldrá, F., Flores, M., & Sanz, Y. (2001). Meat fermentation technology. In: Hui, Y. H. Nip, W. K. Rogers, R.W. & Young, O. A. (eds.), *Meat Science and applications* (537-561). New York: Marcel Dekker Inc.
- Toldrá, F., & Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 331-352.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and Lipolysis in Flavour Development of Dry-cured Meat Products. *Meat Science*, 49, 101-110.
- Toldrá, F. Flores, M. & Sanz, Y. (1997). Dry-cared ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry*, 59, 523-530.
- Tosukhowong, A., Visessanguan, W., Pumpuang, L., Tepkasikul, P., Panya, A., & Valyasevi, R. (2011). Biogenic amine formation in Nham, a Thai fermented sausage, and the reduction by commercial starters culture, *Lactobacillus plantarum* BCC 9546. *Food Chemistry*, 129(3), 846-853.
- Trichopoulou, A., Soukara, S., & Vasilopoulou, E. (2007). Traditional foods: a science and society perspective. *Trends Food Science and Technology*, 18, 420-427.
- Trontel, A., Batušić, A., Gusić, I., Slavica, A., Šantek, B., & Novak, S. (2011). Production of D- and L-lactic acid by mono and mixed cultures of *Lactobacillus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 75-82.
- Truefood consortium. (2014). [Internet] Disponível em <http://www.truefood.eu> [Consulta efetuada a 20 de janeiro de 2017].
- Van Ba, H., Seo, H.-W., Kim, J.H., Cho, S.H., Kim, Y.S., Ham, J.S., & Seong, P.N. (2016). The effects of starter culture types on the technological quality, lipid oxidation and biogenic amines in fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 191-198.
- Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., De Vliegher, S., (2014). Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *Journal of Dairy Science*, 97, 5275-5293.
- Van den Eeckhout, P. & Scholliers, P., (2012). The proliferation of brands: the case of food in Belgium, 1890-1940. *Enterprise Society*, 13, 53-84.
- Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A. & Vidal-Carou M.C. (1997). Biogenic Amines as Hygienic Quality Indicators of Tuna. Relationships with Microbial Counts, ATP-Related Compounds, Volatile Amines, and Organoleptic Changes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45 (6) 2036-2041.
- Verplaetse, A. (1994). Influence of raw meat properties and processing technology on aroma quality of raw fermented meat products. *40th ICoMST*, The Hague, Netherlands, 45-65.

- Vidal-Carou, M.C., Vecina-Nogués, M.T., Latorre-Moratalla, M.L. & Bover-Cid, S.B. (2015). Biogenic Amines: Risks and Control (chap. 47). In: Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (413-428), 2nd ed. Iowa, EUA: Blackwell Publishing.
- Vidal-Carou, M.C. & Latorre-Moratalla, M.L. (2014). Aminas biogénicas: nuevas perspectivas para unos peligros clásicos de algunos alimentos. *Agencia de Salut Pública de Catalunya*, Noviembre/Diciembre (1-6).
- Vidal-Carou, M.C., Latorre-Moratalla, M. L. & Bover-Cid S. (2009). Biogenic Amines. In: L.M.L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis* (665-668). Boca Raton, Fda. CRC Press.
- Vidal-Carou, M.C., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M. T. & Bover-Cid, S. (2007). Biogenic amines: risks and control, In: F. Toldrá, (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (455-428), 1.st ed. Iowa, EUA: Blackwell Publishing.
- Vidal-Carou M.C., Izquierdo-Pulido M., Martin-Morro M.C. & Mariné-Font A. (1990). Histamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage. *Food Chemistry*, 37, 239-249.
- Vignolo, G., Fontana, C. & Fadda, S. (2010). Semidry and Dry Fermented Sausages. In: Toldra, F. (Ed.), *Handbook of meat processing* (379-398). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Vinci, G. & Antonelli M.L. (2002). Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control*, 13, 8, 519-524.
- Vuyst, L.D., Falony, G., & Leroy, F. (2008). Probiotic in fermented sausage: A Review, *Meat Science*, 80, 75-78.
- Xie, C., Wang, H., Nie, X., Chen, L., & Deng, S. (2015). Reduction of biogenic amine concentration in fermented sausage by selected starter cultures. *CyTA - Journal of Food*, 13(4), 491-497.
- Wang, X., Hongyang, R., Wei, W., Zhang, Y., Ting, B., Li, J., & Zhu, W. (2015). Effect of inoculation of commercial starter cultures on the quality and histamine accumulation in fermented sausages, *Journal of Food Science*, 80 (2), 377-383.
- Warriss, P.D. (1996). Instrumental measurement of colour. In: Taylor, S.A., Raimundo, A., Severini, M. & Smulders, F. J. M. (Eds.), *Meat Quality and Meat Packaging* Utrecht (221-232). European Consortium for Continuing Education in Meat Science and Technology.
- Weichselbaum, E., Benelam, B., & Costa, H.S. (2009). Traditional Foods in Europe. 6th EuroFIR Synthesis Report. British Nutrition Foundation, London (Institute of Food Research, Norwich, UK).
- Wortberg B., & Woller R., (1982). Quality and freshness of meat and meat products as related to their content of biogenic amines. *Fleischwirtschaft*, 62, 1457-1463.
- Wright, A.V. & Axelsson, L. (2011). Lactic acid bacteria: An introduction. In: SLAHTINEN, S. *et al.* (Eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. New York, USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Zaho, L., Jin, Y., Ma, C., Song, H., Li, H., & Wang, Z., (2011). Physio-chemical characteristics and free fatty acid composition of dry fermented mutton sausages as affected by the use of various combinations of starter cultures and spices. *Meat Science*, 88, 761-766.
- Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A., & Chizzolini, R. (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants, *Meat Science* 66(2), 415-423.
- Zheng, Y., Liu, Z., & Mo, B. (2016). Texture Profile Analysis of Sliced Cheese in relation to Chemical Composition and Storage Temperature. *Journal of Chemistry*, 1-10.

- Ziegler, G.R., & Acton, J.C. (1984). Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue, *Food Technology*, 38, 77-82.

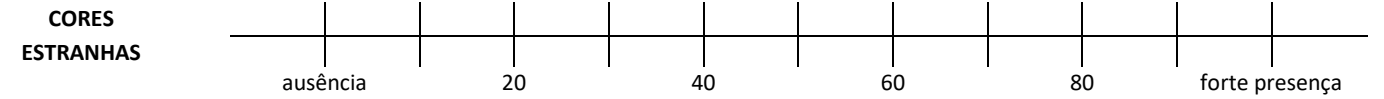
ANEXO 1

Ficha de análise sensorial

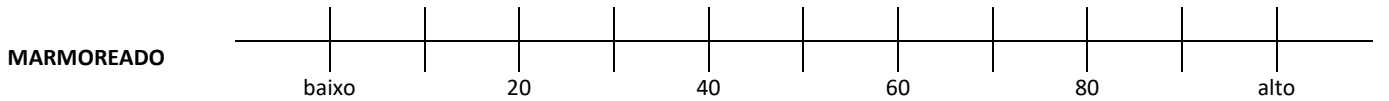
ANÁLISE SENSORIAL DE PAIO E PAINHOS

PROVADOR _____ AMOSTRA _____ DATA _____

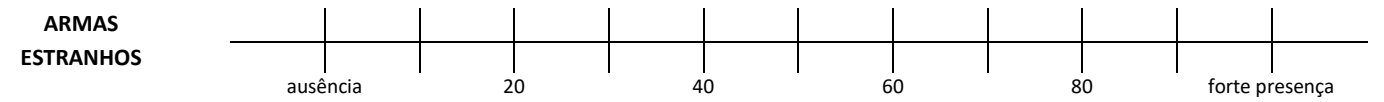
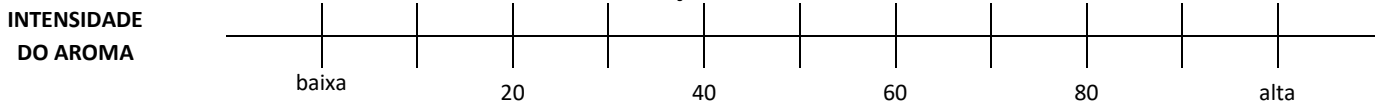
APRECIÇÃO VISUAL



Qual ou quais? _____

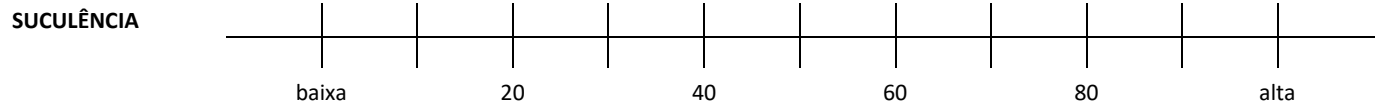
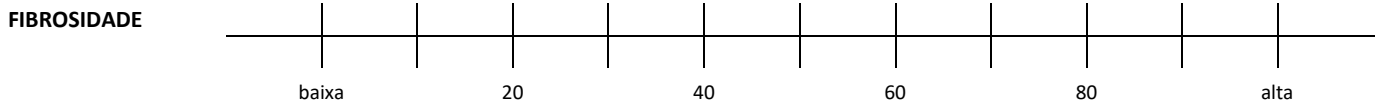
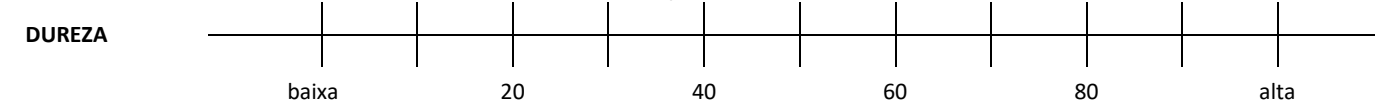


APRECIÇÃO OLFATIVA

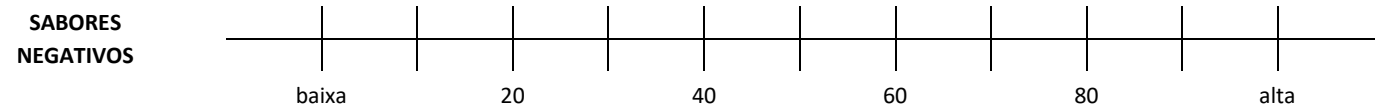
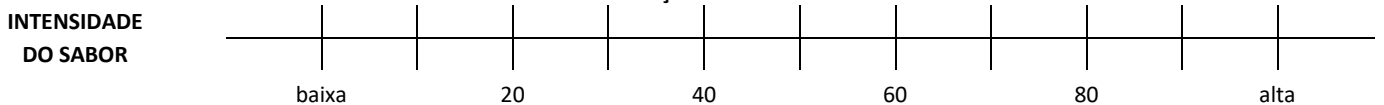


Qual ou quais? _____

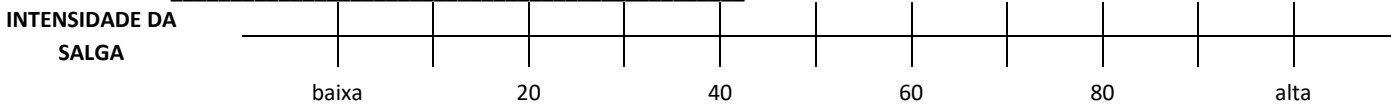
APRECIÇÃO DA TEXTURA



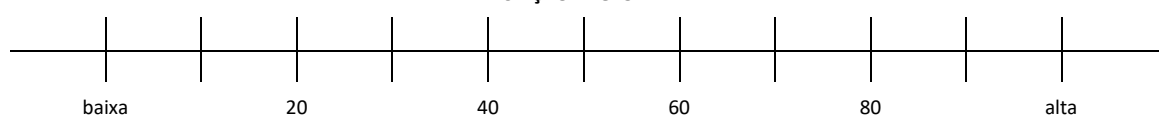
APRECIÇÃO DO SABOR



Qual ou Quais? _____



APRECIÇÃO GLOBAL





UNIVERSIDADE DE ÉVORA
INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO
E FORMAÇÃO AVANÇADA

Contactos:

Universidade de Évora

Instituto de Investigação e Formação Avançada - IIFA

Palácio do Vimioso | Largo Marquês de Marialva, Apart. 94

7002-554 Évora | Portugal

Tel: (+351) 266 706 581