



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

ESTG



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Análise Crítica ao Processo de Rastreabilidade numa Cadeia
de Distribuição de Produtos Cárnicos Frescos

Bruna Ximenes

2024

Análise Crítica ao Processo de Rastreabilidade
numa Cadeia de Distribuição de Produtos
Cárnicos Frescos

Escola Superior de Tecnologia e Gestão



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Bruna Ximenes Cristino Ribeiro da Silva

Análise Crítica ao Processo de Rastreabilidade numa Cadeia de Distribuição de Produtos Cárnicos Frescos

Mestrado em Engenharia Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Paulo Fernandes
e de
Professora Doutora Carla Barbosa

Agosto de 2024

MEMBROS DO JÚRI

Presidente:

Doutor(a)

Vogal:

Doutor(a)

Professor(a)

Vogal:

Doutor(a)

Professor(a)

Orientador(a)

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Ao terminar mais uma das etapas importantes da minha vida, queria agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram neste percurso acadêmico.

Em primeiro lugar, um agradecimento muito especial ao Rui, o meu marido, que viveu tudo isto a meu lado. Agradeço pelo carinho, pelo companheirismo, por toda a paciência, pela motivação e por ter sido um grande apoio nos momentos mais difíceis, por ser sempre o colo que eu precisei nesta caminhada.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais por terem sido o meu alicerce e por me terem apoiado nas minhas escolhas e me ajudarem a alcançar os meus objetivos.

Ao meu irmão por ter estado sempre do meu lado, pela paciência nos momentos mais stressantes e por ter sempre uma palavra de motivação, mesmo estando longe deu-me todo o apoio.

À Maria, à Ana e à Mariana, por serem amigos sempre disponíveis, por me incentivarem a concretizar os meus objetivos, por ouvirem as minhas queixas e por serem o meu ombro amigo. Sem o seu apoio e motivação que a realização deste trabalho não seria possível.

Agradeço aos meus orientadores, ao Doutor Paulo Fernandes e à Doutora Carla Barbosa pelo seu apoio, orientação, disponibilidade e partilha do conhecimento científico ao longo de todas as etapas deste projeto.

Um agradecimento especial à minha equipa de trabalho, aos meus colegas e chefias, que fizeram questão de me ajudar sempre que conseguiam, obrigada por serem tão atenciosos e preocupados, e cujos testemunhos e motivação foram muito importantes ao longo de todo o processo. Agradeço por toda a partilha de conhecimento e por me ajudarem a crescer tanto a nível pessoal como profissional.

A todos, um Gigante Obrigado!

RESUMO

A carne de frango, amplamente consumida em todo o mundo, é um dos principais alimentos na dieta humana, oferecendo uma fonte significativa de proteínas e nutrientes. No entanto, a sua manipulação e processamento apresentam riscos de segurança alimentar que podem comprometer a saúde pública. Contaminações por patógenos como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., entre outros, podem ocorrer durante várias etapas da cadeia de distribuição alimentar.

Este projeto tem como objetivo avaliar e propor melhorias para o sistema de distribuição e rastreabilidade de uma empresa de distribuição alimentar, visando garantir a segurança e a qualidade da carne de frango. A investigação envolve a monitorização da temperatura, de pH, análise da cor e análises microbiológicas, contagem e deteção de microrganismos, de forma a identificar áreas e etapas críticas que podem impactar a segurança alimentar.

Os resultados obtidos destacam a importância do controlo rigoroso da temperatura e das práticas de higiene ao longo da cadeia de distribuição. Observou-se que a carne de frango desossada mecanicamente apresenta variações significativas na qualidade, relacionadas com a manipulação e as condições de armazenamento. Em algumas amostras, a presença de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. foi identificada, evidenciando a necessidade de uma monitorização mais eficaz e de melhores práticas de controlo de qualidade.

Com este estudo foi possível preparar um conjunto de propostas com medidas para otimizar os processos de distribuição de carne para as diferentes lojas da empresa, que incluem a implementação de tecnologias avançadas de monitorização, a melhoria de práticas de higiene e a adoção de sistemas mais robustos. Estas melhorias serão essenciais para assegurar a integridade e a segurança dos produtos de carne, garantindo que a carne de frango oferecida aos consumidores mantém os altos padrões de qualidade e segurança alimentar exigidos.

PALAVRAS-CHAVE: cadeia de distribuição; carne de frango; contaminação microbiológica; controlo de temperatura; segurança alimentar

ABSTRACT

Chicken meat, widely consumed around the world, is one of the main foods in the human diet, offering a significant source of protein and nutrients. However, its handling and processing present food safety risks that can compromise public health. Contamination by pathogens such as *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp., among others, can occur during various stages of the food distribution chain.

This project aims to evaluate and propose improvements to the distribution and traceability system of the distribution chain company, to guarantee the safety and quality of chicken meat. The research involves temperature monitoring, pH testing, colour analysis (colorimetry) and microbiological analysis, counting and detecting microorganisms to identify critical areas that could impact food safety.

The results highlight the importance of strict temperature control and hygiene practices throughout the distribution chain. Mechanically deboned chicken meat shows significant variations in quality, related to handling and storage conditions. In some samples, the presence of *Salmonella* spp., and *Campylobacter* spp. was identified, highlighting the need for more effective monitoring and better-quality control practices.

In summary, this study proposes a set of measures aimed at optimising the company's distribution system, including the implementation of advanced monitoring technologies, improved hygiene practices and the adoption of more robust systems. These improvements are essential to ensure the integrity and safety of the products, guaranteeing that the chicken meat offered to consumers maintains the high standards of quality and food safety required.

KEYWORDS: chicken meat; distribution chain; food safety; microbiological contamination; temperature control.

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

ALOA - Agar *Listeria* conf. Ottaviani & Agosti

APT – Água Peptonada Tamponada

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

BCIG - ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolilo- β -D-glucorónico

BPA - Baird Parker Base Agar

DFD – Escuras, Duras e Secas

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

GOF - Glucose Of Medium

HACCP – Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos

INE – Instituto Nacional de Estatística

LD – Limite de Detecção

MKTT - Muller-Kauffmann-Tetrathionate Novobiocin

PCA – Plate Count Agar

PCR - Polymerase Chain Reaction

PE - Polietileno

PP – Polipropileno

PSE – Pálida, Mole e Exsudativa

RVS - Rappaport - Vassiliadis Soja

SCA - Simmons Citrate Agar

SMID - ChromID Salmonella Agar

TBX - Tryptone Bile x-glucuronide Agar

TSB - Tryptone Soya Broth

TSI - Triple Sugar Iron Agar

UE – União Europeia

UFC - Unidade Formadora de Colónias

VRBGA - Violet Red Bile Glucose Agar

XLD - Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar

ÍNDICE

1.	Introdução.....	1
2.	Revisão bibliográfica.....	4
2.1.	A Importância da Segurança Alimentar	4
2.2.	Produtos Cárnicos e os Problemas de Segurança Alimentar	5
2.2.1.	Carne de Frango	5
2.2.2.	Doenças de Origem Alimentar	9
2.3.	Cadeias de Distribuição Alimentar.....	11
3.	Materiais e Métodos	13
3.1.	Planeamento Experimental	13
3.2.	Armazém de Frescos	15
3.3.	Registo de Temperaturas	15
3.4.	Medição do pH	15
3.5.	Medição da Cor	16
3.6.	Análises Microbiológicas	16
3.6.1.	Preparação da Suspensão-mãe.....	16
3.6.2.	Deteção de Microrganismos a 30 °C	16
3.6.3.	Quantificação de <i>E. coli</i>	16
3.6.4.	Quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i>	17
3.6.5.	Quantificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3.6.6.	Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
3.6.7.	Deteção de <i>Salmonella</i> spp.....	18
3.6.8.	Deteção de <i>Campylobacter</i> spp.	20
3.7.	Tratamento de Dados e Análise Estatística	21
4.	Resultados e Discussão.....	22
4.1.	Registo da Temperatura do Peito de Frango	22

4.1. Análises Físico-Químicas	23
4.3. Análises Microbiológicas	27
5. Conclusão	38
6. Referências Bibliográficas.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3. 1: Fluxograma do planeamento experimental.....	14
Figura 3. 2: Diferentes fases do processo de receção dos artigos em armazém.....	15
Figura 4. 1: Registo de temperatura ao longo do tempo (A – pico registado um dia após a receção em armazém; B – Pico registado dois dias após a receção em armazém).....	22
Figura 4. 2: Crescimento numa placa de PCA ao fim de 72h de incubação.	28
Figura 4. 3: Crescimento numa placa de TBX ao fim de 24h de incubação.	28
Figura 4. 4: Crescimento numa placa de VRBGA ao fim de 24h de incubação.	29
Figura 4. 5: Crescimento numa placa de BPA ao fim de 24h de incubação.	29
Figura 4. 6: Crescimento numa placa de ALOA ao fim de 24h de incubação.....	30
Figura 4. 7: Evolução do crescimento microbiano ao longo do tempo.....	31
Figura 4. 8: Crescimento de Salmonella spp. numa placa de XLD e SMID, respetivamente.....	33
Figura 4. 9: Critérios de segurança dos géneros alimentícios (Regulamento (CE) 2073/2005)..	34
Figura 4. 10: Resultado de PCR.	35
Figura 4. 11: Separação eletroforética dos produtos de amplificação obtidos.	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3. 1: Primers utilizados.	20
Tabela 4. 1: Registo dos valores de pH (valores médios $\pm$ desvio padrão).	23
Tabela 4. 2: Valores de cor CIE, L, a, b, saturação (C) e tonalidade (H) (valores médios $\pm$ desvio padrão).	24
Tabela 4. 3: Síntese dos resultados das análises microbiológicas (UFC/g).	30

1. Introdução

Independentemente da qualidade nutricional da dieta, a segurança alimentar abrange os termos, *food safety* e *food security*. O termo *food safety* envolve formas de produção, transporte e armazenamento que garantem a segurança física, microbiológica e sensorial dos alimentos, minimizando o risco de doenças. Já o termo *food security* é definido pela FAO como a garantia de que todas as pessoas têm acesso físico, social e económico a alimentos suficientes, seguros e nutritivos para uma vida saudável (Walls *et al.*, 2019).

Os alimentos são naturalmente vulneráveis e exigem atenção no seu manuseamento, produção e armazenamento. Fatores extrínsecos como a temperatura e condições de transporte afetam a sua qualidade e frescura (Duan *et al.*, 2020). A globalização económica torna a segurança alimentar um desafio mundial, o qual é influenciado por fatores ambientais e antropogénicos. Estes fatores são divididos em perigos físicos, químicos e biológicos (Li *et al.*, 2021).

A carne é considerada um alimento nutritivo e é fundamental na dieta da população em geral, sendo o frango apreciado mundialmente graças à sua versatilidade e valor nutricional. Este é um alimento rico em proteínas e geralmente mais acessível do que outras carnes, sendo por isso uma escolha popular. A variedade de cortes, como peito, coxa e asa, permite diversas preparações culinárias, atendendo a diferentes gostos e preferências culturais (Joseph, M., 2023).

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), o consumo de carne em Portugal mudou de 2019 a 2023. O consumo *per capita* de carne de aves aumentou cerca de 2.9 kg/hab, enquanto o de carne bovina diminuiu devido à acessibilidade e à perceção de ser mais saudável.

A qualidade da carne é influenciada por reações físico-químicas após o abate. Por isso, fatores como manuseamento e alimentação antes do abate e controlo do pH e temperatura do abate são cruciais. No caso das aves, o abate e o processamento expõem a carne à contaminação microbiana e a rápida oxidação lipídica, podendo resultar em menor qualidade sensorial e vida útil curta (Bhawana *et al.*, 2023).

Um sistema moderno de garantia de qualidade deve-se focar na prevenção, monitorização e controlo dos parâmetros críticos desde o pós-processamento até ao consumo final. A logística de transporte e armazenamento é crucial, pois a qualidade dos produtos refrigerados depende das condições de armazenamento, sendo por isso fundamental registar e monitorizar a temperatura (Nychas *et al.*, 2008).

A temperatura influencia significativamente o pH do peito de frango. Temperatura de armazenamento mais elevada pode promover alterações no pH da carne como resultado da desnaturação proteica, enquanto o armazenamento refrigerado mantém o pH estável por mais tempo. No entanto, a longo prazo, atividades microbianas e bioquímicas podem alterar o pH, mesmo a baixas temperaturas. Controlar a temperatura durante o processamento e armazenamento é essencial para manter a qualidade e a segurança do peito de frango (Kim *et al.*, 2022).

Alguns aspetos fundamentais para a escolha do consumidor, como a cor do peito de frango podem ser afetados pela temperatura e pelo pH. O aquecimento e pH baixos podem deixar a carne mais pálida e um pH mais alto pode resultar numa cor mais escura. Por isso controlar adequadamente a temperatura e o pH é essencial para preservar a cor e a qualidade do peito de frango (Bhawana *et al*, 2023).

O pH e a microbiota do peito de frango estão interligados e afetam-se mutuamente. O pH é crucial para o crescimento microbiano e como a maioria das bactérias prefere pH neutro, as alterações de pH podem controlar a proliferação das mesmas. A microbiota também afeta o pH, visto que alguns microrganismos produzem ácidos orgânicos fracos durante a deterioração, o que diminui o pH e tem um grande impacto na qualidade e segurança do alimento. Além do mais, o cheiro do peito de frango é influenciado pelo pH, temperatura e microbiota, pois a acidificação e as temperaturas inadequadas promovem a produção de compostos voláteis e odores desagradáveis (Pettersen *et al*, 2004).

Na indústria alimentar, a contaminação pode ocorrer por problemas no equipamento, limpeza inadequada, infestações ou armazenamento impróprio, sendo que é do fornecedor a responsabilidade de proteger os consumidores de doenças transmitidas por alimentos (Cunha, 2017).

As doenças de origem alimentar são causadas pelo consumo de alimentos contaminados por microrganismos patogénicos, toxinas ou substâncias químicas nocivas, que podem estar presentes em qualquer etapa da cadeia de produção, desde o cultivo até ao preparo. Os agentes etiológicos mais comuns incluem bactérias como *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Campylobacter jejuni* e *L. monocytogenes* (Greening, B. *et al*, 2022), entre outras.

Segundo a EFSA (2023), as zoonoses mais notificadas foram a campilobacteriose e salmonelose e foi verificado um aumento de 600% nos casos de infeção pelo vírus nilo ocidental. Na União Europeia, em 2022, verificou-se um aumento de surtos de origem alimentar, hospitalizações e mortes, quando comparado com 2021.

As empresas do ramo alimentar enfrentam desafios para atender à crescente procura dos consumidores, fornecendo produtos essenciais para o quotidiano (Duan *et al*, 2020). Uma cadeia de abastecimento alimentar é uma rede de empresas interdependentes que colaboram para direcionar o fluxo de produtos agrícolas e alimentares com valor agregado, visando lucro com custos mínimos para o cliente. Esta cadeia inclui fornecedores, armazéns centrais, locais e lojas urbanas e rurais.

Devido à complexidade das cadeias de distribuição alimentar, problemas de comunicação entre os diferentes setores, como armazenamento e transporte, são comuns. No entanto, todas as partes devem considerar a segurança alimentar uma responsabilidade compartilhada. Organizar a cadeia de abastecimento é crucial para enfrentar a insegurança alimentar e os problemas de saúde pública. Por isso, para garantir a saúde pública ao longo das cadeias de distribuição alimentar, é necessário

um sistema de rastreabilidade eficiente, desenvolvido através de métodos analíticos mais sensíveis, robusto e económicos, que atendam à legislação e às exigências dos consumidores (Duan et al., 2020).

O objetivo deste projeto foi avaliar/analisar a rastreabilidade numa empresa de distribuição alimentar, identificando eventuais problemas na distribuição de alimentos usando como base um produto facilmente perecível, e de grande consumo, o peito de frango.

Para isso, foi realizada uma abordagem detalhada e prática com várias etapas. Primeiramente, foi realizada uma simulação no papel de consumidor, a fim de entender a experiência enquanto cliente e identificar possíveis falhas ou pontos de melhoria.

De seguida, foi feita uma análise físico-química e microbiológica do peito de frango ao longo do tempo até ao fim da sua vida útil, conforme definido pelo fornecedor. Além disso, foi avaliado o processo de rastreabilidade e distribuição, desde o fornecedor até ao consumidor final, de forma a identificar possíveis pontos críticos que possam comprometer a eficiência e segurança alimentar.

Por fim, com base nas análises e dados recolhidos, são propostas melhorias que poderão contribuir para um aumento da qualidade e segurança dos alimentos fornecidos pela empresa.

2. Revisão bibliográfica

2.1. A Importância da Segurança Alimentar

A segurança alimentar engloba os aspectos nutricionais, o acesso universal e a garantia da inocuidade dos alimentos. Existem três conceitos fundamentais para os sistemas alimentares que poderão ter implicações para a saúde da população, sendo estes, nutrição saudável, *food safety* e *food security* (Walls *et al.*, 2019).

A nutrição saudável está relacionada com a qualidade nutricional do regime alimentar, pressupondo que este deve ser completo, variado e equilibrado de forma a evitar problemas de saúde dos indivíduos (Walls *et al.*, 2019).

Food safety é o termo que está associado à segurança dos alimentos, englobando um conjunto de normas de produção, transporte e armazenamento dos mesmos, tendo em conta determinadas características físicas, microbiológicas e sensoriais que consideram o alimento seguro ao consumo, minimizando o risco de transmissão de doenças através dos alimentos (Walls *et al.*, 2019).

Food security é um termo descrito pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) como a garantia de que “todas as pessoas, em qualquer momento, têm acesso físico, social e económico a alimentos suficientes, seguros e nutritivos para satisfazer as necessidades dietéticas e as preferências alimentares para uma vida ativa e saudável” (Walls *et al.*, 2019).

No entanto, apesar dos esforços realizados mundialmente, quer pelos governos, quer por entidades não governamentais, no sentido de garantir os conceitos anteriormente descritos, a contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer fase, quer no abate ou na colheita, no armazenamento, na distribuição, no transporte e na preparação, o que poderá ser um risco para a saúde humana (Kamboj *et al.*, 2020).

Para evitar a contaminação e garantir a segurança dos alimentos, em qualquer uma das etapas acima referidas, a higiene alimentar é um requisito fundamental para a segurança do consumidor, evitando o aparecimento de doenças de origem alimentar (Kamboj *et al.*, 2020).

Consumidores de diferentes países têm diferentes perceções do que são os riscos para a segurança alimentar. A higiene alimentar não só é um fator muito importante quando se fala em segurança alimentar, mas também é um pré-requisito na prevenção de doenças, ter esta perceção sensibiliza o consumidor para os riscos de segurança alimentar ligados à saúde, tornando-se um fator determinante para uma mudança de comportamento (Djekic *et al.*, 2022).

A higiene alimentar é um requisito básico. Contudo existe a possibilidade de ser negligenciada, o que continua a ser uma questão crítica, sendo necessário o desenvolvimento de processos mais eficazes e eficientes, pois os surtos de doenças de origem alimentar originam custos elevados tanto para os indivíduos afetados como para a indústria alimentar, afetando a economia (Kamboj *et al.*, 2020).

Os alimentos são produtos naturalmente vulneráveis e requerem maior atenção no seu manuseamento, produção e armazenamento, por isso, os fatores extrínsecos, como a temperatura e

o acondicionamento durante o transporte, também interferem na qualidade e frescura dos alimentos. Os produtos alimentares que resultam de alimentos mais processados, ou seja, de uma mistura complexa de diversos ingredientes também são os que apresentam maiores riscos e é necessária uma maior atenção às matérias-primas e ao tipo de produção (Duan *et al.*, 2020).

Com o crescimento da globalização económica, a segurança alimentar torna-se um desafio a nível mundial para a saúde humana e para os sistemas de produção/distribuição alimentar. Existem diversos fatores, quer de origem ambiental, quer de origem antropogénica, que colocam em causa a segurança alimentar, e podem ser divididos em três tipos de perigos: físicos, químicos e biológicos (Cao *et al.*, 2019 & Li *et al.*, 2021).

Os perigos físicos, por norma, são os que se detetam mais facilmente, a olho nu. A presença de madeira, papel e metais, são alguns exemplos deste tipo de perigo. Os perigos químicos podem ser de diversa natureza, como toxinas naturais presentes em matérias-primas, resíduos de pesticidas e medicamentos veterinários, contaminantes do solo e da água e aditivos em quantidades excessivas. Os perigos biológicos englobam as contaminações causadas por agentes biológicos, sendo estes fungos, bactérias e vírus (Cao *et al.*, 2019).

Dos três tipos de perigos referidos, os agentes patogénicos, inseridos nos perigos biológicos, revelaram ser uma das maiores preocupações no setor alimentar por serem os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos e por doenças de origem alimentar. O grande número de incidências que se verifica devido a este tipo de perigo alimentar impulsionou diferentes áreas de investigação interdisciplinares (Li *et al.*, 2021 e Cao *et al.*, 2019).

Assim, deve existir o controlo/análise destes perigos que colocam em causa a segurança alimentar, em toda a cadeia de distribuição, ou seja, este controlo deve ser feito em todas as etapas, sendo estas: a produção, o processamento, o armazenamento e a distribuição dos produtos alimentares (Cao *et al.*, 2019).

2.2. Produtos Cárnicos e os Problemas de Segurança Alimentar

2.2.1. Carne de Frango

A carne é considerada um alimento nutritivo sendo um dos principais itens da dieta de muitas pessoas (Liu *et al.*, 2023).

A demanda por carne varia tanto em quantidade quanto em qualidade, devido às mudanças nas preferências e gostos dos consumidores. Na Índia, segundo (Liu *et al.*, 2023), o frango é a carne mais consumida, mas essa procura é bastante influenciada por fatores económicos, valores familiares, celebrações festivas e preocupações com o bem-estar animal. Este país ocupa a quarta posição mundial na produção de frangos, com uma produção anual de mais de 4 milhões de toneladas.

Além de ser a carne mais consumida na Índia, o frango é apreciado globalmente pela sua versatilidade e valor nutricional. É uma fonte rica em proteínas e é, de modo geral, mais acessível do que outras

carnes, tornando-se uma opção popular para uma vasta gama de consumidores. Adicionalmente, a carne de frango pode ser preparada de inúmeras maneiras, o que contribui para a sua popularidade. Desde receitas tradicionais até pratos internacionais, o frango é um ingrediente central em muitas cozinhas ao redor do mundo. A diversidade de cortes, como peito, coxa e asa, permite uma variedade de preparações culinárias, atendendo a diferentes gostos e preferências culturais (Joseph, M., 2023).

De acordo com os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), o consumo de carne em Portugal apresentou mudanças desde 2019 até 2023. O consumo per capita de carne de aves tem mostrado um crescimento contínuo, enquanto o consumo de carne de bovino tem diminuído. Esta é uma tendência que se verifica principalmente porque a carne de aves é mais acessível e considerada uma opção mais saudável. Além disso, o consumo da carne de suíno também apresentou algumas flutuações, no entanto manteve-se mais constante. Segundo os dados recolhidos pelo INE, em 2019, eram consumidos 44.3 kg/hab de carne de aves, já em 2023, verificou-se um aumento neste valor para 47.2 kg/hab.

Após o abate, o processo de transformação do musculo em carne pode ser dividido em duas fases distintas. Na primeira fase, há interrupções da circulação sanguínea privando o músculo de oxigénio e glicose. Na segunda fase, devido à ausência de oxigénio, a glicose é metabolizada anaerobicamente, resultando na formação de ácido láctico e na consequente diminuição do pH. Por isso, para que seja garantida a qualidade da carne, fatores anteriores ao abate, como o manuseamento e alimentação do animal, e fatores posteriores, como a temperatura, são cruciais (Pereira, 2018).

O abate, a preparação e o processamento de aves expõem a carne à contaminação microbiana de várias fontes. A possibilidade de ocorrências de oxidação lipídica e o crescimento microbiano podem resultar em períodos curtos de armazenamento até que as mudanças dos aspetos sensoriais começam a surgir. Procedimentos de higiene inadequados pelos fornecedores de carne de aves podem levar à contaminação do produto (Bhawana *et al*, 2023).

A qualidade da carne de frango é influenciada por diversos fatores, dos quais se destaca a temperatura de refrigeração e armazenamento e as variações de pH. O pH da carne é um indicador importante da sua qualidade, sendo que o pH ideal varia entre 5.8 e 6.2, afetando diretamente os seus atributos como a textura, a cor e a capacidade de retenção de água. O armazenamento a temperaturas não contantes causa variações no pH o que pode resultar numa textura indesejável (Sila *et al*, 2017).

Após o abate, o glicogénio muscular é convertido em ácido láctico, causando uma descida no pH da carne, sendo este um processo que depende da temperatura, pois temperaturas mais baixas retardam a glicólise *post-mortem*, resultando num pH mais elevado. Por isso, controlar a temperatura de armazenamento evita a descida brusca do pH, mantendo os seus níveis mais elevados e melhorando a qualidade da carne (Kim *et al*, 2022).

A cor é um indicador importante de frescura e aceitação por parte do consumidor. A temperatura de refrigeração e armazenamento tem um papel crucial na manutenção da cor da carne de frango, afetando diretamente a oxidação lipídica e as reações químicas no músculo.

A oxidação dos lípidos é um dos principais processos que influenciam a cor da carne ao longo do armazenamento. As variações de temperatura aumentam a taxa de oxidação lipídica, o que provoca a formação de compostos que causam descoloração, por isso o armazenamento em temperaturas mais baixas preserva melhor a cor da carne (Conchillo *et al*, 2005).

As reações que ocorrem dentro do músculo também são afetadas pela temperatura. Estas reações incluem a oxidação da mioglobina, que é responsável pela cor vermelha da carne fresca. Quando a mioglobina oxida, converte-se em metamioglobina, que tem uma cor acastanhada e é menos desejável visualmente. Temperaturas inadequadas durante o armazenamento podem acelerar esse processo, resultando numa aparência mais pálida ou escura da carne (Souza *et al*, 2019).

Desta forma, um sistema moderno de garantia de qualidade e segurança deve-se focar na prevenção em vez da inspeção, monitorizando, registrando e controlando parâmetros críticos durante todo o ciclo de vida da carne, desde o pós-processamento até ao consumo final. Há uma crescente atenção à logística de transporte, armazenamento e manipulação. A qualidade, o prazo de validade e os riscos dos produtos refrigerados são influenciados pelas condições de temperatura na cadeia de distribuição. Devido aos frequentes desvios dessas condições, a monitorização e o registo da temperatura são essenciais para controlar a cadeia alimentar (Nychas *et al*, 2008).

Armazenar a carne de frango a temperaturas refrigeradas prolonga a sua vida útil, retardando o crescimento de microrganismos, diminuindo a taxa de reações químicas e reduzindo a atividade enzimática. Normalmente, a refrigeração ocorre entre 0 °C e 7 °C. No entanto, mesmo sob refrigeração, a carne de aves continua perecível, e a sua qualidade depende da carga microbiana inicial e da embalagem utilizada (Kaewthong *et al*, 2019).

O prazo de validade da carne pode ser estendido utilizando embalagens apropriadas, como atmosferas modificadas ou através do embalamento a vácuo. Os processos que excluam o oxigénio, como embalagens a vácuo, ou que reduzam a sua presença, como embalagens de atmosfera modificada, podem prevenir ou reduzir a oxidação lipídica (Rojas & Cerveja, 2008).

A variedade de bactérias na carne é influenciada por fatores como processamento, transporte e armazenamento (Nychas *et al*, 2008) e a deterioração da carne ocorre quando as bactérias presentes na carne se multiplicam.

A maioria dos alimentos contém microrganismos, a não ser que sejam esterilizados. Durante a manipulação e processamento, os alimentos podem ser contaminados e, quando contaminados, estes fornecem um ambiente propício para o crescimento bacteriano (Cunha, 2017).

A relação entre o pH, a cor e a microbiótica do peito de frango cru é crucial para determinar a qualidade e a segurança do produto. O valor do pH da carne de frango é um indicador importante na qualidade da mesma, uma vez que carnes com valores de pH baixos, como a carne PSE (Pálida, Mole e Exsudativa), normalmente apresentam uma coloração mais pálida e uma textura mais mole. Este tipo de carne apresenta valores de pH entre 5.7 e 5.8, com valores de luminosidade (L*) superiores a 50, tratando-se de uma carne mais clara. Por outro lado, carnes com pH mais alto (superiores a 6.2)

são consideradas carnes DFD (Escuras, Duras e Secas), que apresentam uma coloração mais escura devido à retenção de água. Estes tipos de carne tornam-se menos desejáveis do ponto de vista do consumidor (Bhawana *et al*, 2023).

A contagem microbiana é, também, essencial para determinar a vida útil e a segurança da carne de frango. Contagens iniciais mais baixas de microrganismos resultam numa maior vida útil do produto. A presença de microrganismos psicrotróficos e mesófilos, são bactérias que crescem em temperaturas de refrigeração e à temperatura ambiente, respetivamente. A sua presença é monitorizada para garantir a segurança alimentar. Os padrões microbiológicos estabelecem que contagens acima de 10^6 a 10^7 UFC.g⁻¹ indicam o fim da vida útil da carne devido ao risco de deterioração e doenças (Galarz *et al*, 2010).

O pH e a microbiota do peito de frango estão intimamente interligados e afetam-se mutuamente. O pH é um fator crucial para o crescimento microbiano, de um modo geral, a maioria das bactérias patogénicas e deterioradoras preferem ambientes com pH neutro (perto de 7). Assim, alterações no pH do frango podem ajudar a controlar ou limitar a proliferação de certos tipos de bactérias (Pettersen *et al*, 2004).

Por outro lado, a microbiota presente no peito de frango também pode afetar o pH do produto. Durante a deterioração, as bactérias presentes no frango produzem ácidos orgânicos fracos como subprodutos da degradação dos nutrientes, como proteínas e hidratos de carbono. Esse processo de acidificação faz com que o pH do frango diminua, o que tem impacto na qualidade e segurança do alimento (Pettersen *et al*, 2004).

Para além da cor, o cheiro do peito de frango é, também, influenciado pelo pH, temperatura e microbiota. À medida que o pH diminui devido à acidificação causada pelo crescimento microbiano, ocorre a produção de compostos voláteis que resultam em odores desagradáveis. Além disso, as temperaturas inadequadas aceleram o crescimento de bactérias deterioradoras, aumentando a produção desses compostos. Desta forma, o controlo do pH, a manutenção de temperaturas adequadas e a gestão da microbiota são essenciais para prevenir odores indesejáveis e garantir a qualidade sensorial do produto (Pettersen *et al*, 2004).

Na indústria alimentar, a contaminação pode ocorrer devido a problemas no equipamento, limpeza inadequada, uso de produtos de limpeza inadequados, infestações de pragas ou armazenamento impróprio. A contaminação cruzada pode correr em várias etapas de manipulação, sendo os manipuladores considerados uma das principais fontes da contaminação dos alimentos, devido a mãos contaminadas, sujas ou mal lavadas (Cunha, 2017).

O manuseamento pré e pós-abate e as condições de armazenamento, afetam significativamente a qualidade do peito de frango cru (Galarz *et al*, 2010).

Desta forma, um importante papel de um fornecedor de carne é garantir a proteção dos clientes contra doenças transmitidas por alimentos por ele distribuídos. Nas sociedades em desenvolvimento, a componente microbiológica da segurança alimentar é uma preocupação crescente. Toxinfecções

causadas por *E. coli*, *Salmonella* enterica serovar Enteritidis e *S. aureus* são prevalentes nessas comunidades e representam uma séria ameaça à saúde humana.

Para controlar doenças de origem alimentar e reduzir a carga microbiana da carne crua, é essencial a implementação de sistemas de gestão e garantia da segurança alimentar como o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) (Bhawana *et al*, 2023).

2.2.2. Doenças de Origem Alimentar

Doenças de origem alimentar são infeções ou intoxicações causadas pelo consumo de alimentos contaminados por um microrganismo patogénico, toxinas ou substâncias químicas nocivas. Esses agentes contaminantes podem estar presentes em qualquer etapa da cadeia de produção de alimentos, desde o cultivo e colheita até ao processamento, armazenamento e preparo (Greening, B. *et al*, 2022).

As causas mais comuns de doenças de origem alimentar incluem bactérias como *Salmonella* enterica serovar Enteritidis, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes*. Além disso, toxinas produzidas por certos tipos de bactérias, como *Staphylococcus aureus*, podem contaminar alimentos e causar sérias intoxicações.

Os sintomas de doenças de origem alimentar variam amplamente, dependendo do patogénico envolvido, mas geralmente incluem náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais e febre. Em casos mais graves, as doenças que daí advêm podem levar a complicações, como desidratação severa, danos aos órgãos e até à morte, especialmente em populações vulneráveis como crianças, idosos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos (Greening, B. *et al*, 2022).

Assim, como a carne de frango se trata de um alimento popular e versátil, esta representa também uma fonte potencial de doenças de origem alimentar, tais como:

- Salmonelose, causada pela bactéria *Salmonella* enterica serovar Enteritidis, sendo esta uma das doenças de origem alimentar mais comuns associadas ao frango. Os sintomas incluem diarreia, febre e cólicas abdominais que surgem geralmente até 48h após a ingestão de alimentos contaminados. Em casos graves, a infeção pode-se espalhar do intestino para a corrente sanguínea, podendo ser fatal sem tratamento adequado (Greening, B. *et al*, 2022).
- Campilobacteriose, provocada pela bactéria *Campylobacter jejuni*. Esta doença pode ser contraída através do consumo de frango mal cozinhado ou do contacto com superfícies contaminadas. Os sintomas incluem diarreia, em que por vezes há presença de sangue, dor abdominal, febre e náuseas, sendo que esta infeção pode levar a complicações graves (USDA, 2020)
- Listeriose, causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*, contudo menos comum, mas particularmente perigosa para grávidas, recém-nascidos, idosos e indivíduos com sistema imunológico comprometido (USDA, 2020)

- Doença causada por *Staphylococcus aureus*, sendo esta uma bactéria que pode produzir toxinas que causam intoxicação alimentar. A contaminação geralmente ocorre devido à má higienização durante o manuseamento do frango. Assim, entre 30 min a 8h após a ingestão do alimento contaminado, podem surgir náuseas, vômitos e/ou dor abdominal (MAYO, 2024)

A prevenção destas doenças requer medidas rigorosas de higiene e segurança alimentar, incluindo uma preparação adequada dos alimentos, a lavagem frequente das mãos e utensílios de cozinha, a prevenção da contaminação cruzada e o armazenamento correto dos alimentos para evitar a proliferação de patógenos. A OMS (Organização Mundial da Saúde), assim como os Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, oferece diretrizes detalhadas para ajudar a minimizar o risco de doenças de origem alimentar e proteger a saúde pública (Greening, B. *et al*, 2022).

Controlar a propagação de *Campylobacter* spp. na produção primária de frangos de corte traz benefícios significativos para a saúde pública, mais do que o controlo de etapas subsequentes, uma vez que a bactéria se pode disseminar de outras formas na carne de frango. Medidas rigorosas de biossegurança na produção primária e a implementação de Boas Práticas de Fabrico e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) durante o abate podem reduzir a colonização dos frangos e a contaminação das carcaças (Andreoletti *et al*, 2011).

Segundo dados da EFSA, em 2011, estimava-se que na União Europeia (UE) ocorriam aproximadamente 9 milhões de casos de campilobacteriose humana anualmente. Dos casos reportados, 20% a 30% ocorreram pelo consumo de carne de frango, enquanto 50% a 80% são atribuídos ao conjunto dos reservatórios de frango (frangos de corte e galinhas poedeiras).

Em 2022, as zoonoses mais notificadas em humanos foram, respetivamente, campilobacteriose e salmonelose, com números estáveis em relação a 2021. A yersiniose foi a terceira mais frequente, seguida pelas infeções causadas por *E. coli* produtora da toxina *Shiga* (STEC) e *L. monocytogenes*. Houve um aumento superior a 600% nos casos locais de infeção humana pelo vírus do nilo ocidental, uma doença transmitida por mosquitos, comparado a 2021. Na União Europeia, o número de surtos alimentares, hospitalizações e mortes, em 2022, foi superior ao registado no ano anterior (EFSA, 2023).

Foram registados 5.146 surtos de origem alimentar, no consumo de carne, em 2018. Estes surtos tiveram uma importância significativa dado que 17,9% destes ocorreram por infeção de *Salmonella* spp., sendo este o agente mais comum. Contudo, a presença de *Campylobacter* spp. e toxinas bacterianas manifestaram ao longo da cadeia alimentar uma grande preocupação de saúde pública. Assim, a OMS verificou que cerca de 600 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos e 420.000 mortes estão intimamente ligadas a estes patógenos (Khalid *et al*, 2020).

2.3. Cadeias de Distribuição Alimentar

Uma cadeia de abastecimento alimentar pode ser definida como um conjunto de empresas interdependentes que colaboram entre si, para orientar o fluxo de bens e serviços ao longo da cadeia de produtos agrícolas e alimentares com valor acrescentado, com o fim de obter lucro com os custos mais baixos possíveis para o cliente (Duan et al., 2020).

A rede da cadeia de abastecimento deste sistema é formada pelo fornecedor, armazém central, armazém local e, por fim, as lojas, situadas em áreas urbanas e rurais. As entidades responsáveis do setor alimentar diferem das restantes por fornecerem produtos que são essenciais na vida diária, por isso, enfrentam desafios com o intuito de satisfazer a crescente procura que existe por parte do consumidor (Barman et al., 2021).

O acesso a informações reais, relevantes e atempadas acerca dos produtos alimentares, ou seja, a transparência por parte das empresas do setor alimentar, surgiu também como um elemento essencial para as cadeias de abastecimento alimentar. Assim sendo, a implementação de novas tecnologias nas cadeias de abastecimento alimentar, que garantam esta transparência, resulta no aumento de confiança por parte do consumidor e facilita a aprovação por parte dos organismos reguladores. Contudo, apesar desta necessidade de transparência, por parte do consumidor, existem, ainda, alguns problemas que não são do conhecimento público, como, por exemplo, respostas tardias, diagnósticos insuficientes nos surtos de origem alimentar e alguns casos de adulteração de alimentos (Astill et al., 2019).

Nas cadeias de distribuição alimentar, a rastreabilidade é a capacidade de investigar a “história” de um produto, ou seja, conhecer qual a origem do alimento e todos os processos que o mesmo sofreu até ser adquirido pelo consumidor. Este processo tem muita importância para todas as partes interessadas, incluindo o consumidor, e é durante um surto que se entende a importância de um sistema de rastreabilidade. Devido à complexidade das cadeias de abastecimento alimentar, investigar um surto é cada vez mais difícil, pois os alimentos que lhes dão origem e as doenças alimentares são muito diversos (Astill et al., 2019).

Os sistemas de distribuição alimentar são complexos e estão em constante mudança, graças à exportação e à ligação entre fornecedores e empresas do setor alimentar, geograficamente distantes, bem como à maior exigência por parte do consumidor, no que toca à qualidade e segurança dos alimentos. Os surtos de origem alimentar são uma realidade em todo o mundo, e foram crescendo devido ao aumento da globalização na última década. A distância geográfica entre produtores e consumidores também demonstrou ser um desafio no que toca à qualidade dos alimentos (Duan et al., 2020). Desta forma, a segurança alimentar continua a ser um desafio à escala mundial, para todas as cadeias de abastecimento alimentar, e, por isso, uma grande parte dos países decidiu criar leis e regulamentos que garantem a segurança alimentar (Li et al., 2021).

Em virtude da complexidade e dimensão que caracterizam as cadeias de distribuição alimentar, com diversos setores envolvidos, como o armazenamento e o transporte dos produtos alimentares, a

comunicação entre as partes interessadas é fundamental, uma vez que a segurança alimentar é uma responsabilidade partilhada entre todos (Astill et al., 2019). Assim, a organização da cadeia de abastecimento é um fator essencial para ajudar a resolver a insegurança alimentar e os problemas de saúde pública (Duan et al., 2020).

Para melhorar a eficácia dos sistemas regulamentares e garantir a segurança pública, são necessários estudos para desenvolver métodos analíticos mais sensíveis, robustos, eficientes e económicos que garantam a segurança, qualidade e rastreabilidade dos produtos alimentares, sem colocar em causa as características nutricionais, funcionais e sensoriais de acordo com a legislação e a procura do consumidor. O aumento do interesse em segurança, características sensoriais, qualidade, rastreabilidade e conformidade com os regulamentos/leis, impulsionou o desenvolvimento e implementação de técnicas analíticas, que consigam prever e compreender questões críticas (Li et al., 2021). Assim, quando se fala numa cadeia de distribuição complexa, é necessário que esteja implementado um sistema eficiente de rastreabilidade contribua para a saúde pública, permitindo detetar, isolar e recolher determinados produtos e ingredientes que sejam a origem de um problema (Duan et al., 2020).

Os problemas nos produtos alimentares englobam as doenças transmitidas por alimentos, intoxicações alimentares, alimentos com fraca qualidade, produtos falsificados ou rotulagem incorreta e presença de ingredientes não declarados depois da produção (Duan et al., 2020). De um modo geral, os incidentes de segurança alimentar são notificados na cadeia de abastecimento e ao longo dos anos o número tem vindo a aumentar. Um incidente de segurança alimentar acontece no momento em que se sabe que a segurança dos alimentos foi comprometida por algum motivo e são necessárias ações que protejam os consumidores. Embora os sistemas de vigilância e notificação tenham melhorado e a consciencialização dos consumidores tenha aumentado, a preocupação com a segurança alimentar continua a crescer. As doenças de origem alimentar ainda são uma realidade significativa, resultando em morbilidade e mortalidade (Soon et al., 2020).

3. Materiais e Métodos

3.1. Planeamento Experimental

Neste estudo, foi analisado peito de frango embalado a vácuo fornecido ao Armazém de Frescos para posterior comercialização nas lojas de retalho. Para tal foram consideradas três embalagens do peito de frango embalado, recolhidas aleatoriamente, tendo em atenção o volume de produto rececionado em cada momento e a capacidade analítica. As amostras foram retiradas para serem monitorizados os parâmetros da qualidade ao longo do percurso de distribuição, desde o momento da receção no armazém central, até ao balcão da secção do talho de uma das lojas da empresa.

Os parâmetros da qualidade a monitorizar foram definidos de acordo com os procedimentos internos do grupo e ainda tendo em atenção a necessidade de perceber as fragilidades deste produto/processo durante a sua distribuição.

As várias etapas consideradas neste estudo estão resumidas no esquema apresentado na Figura 3.1.

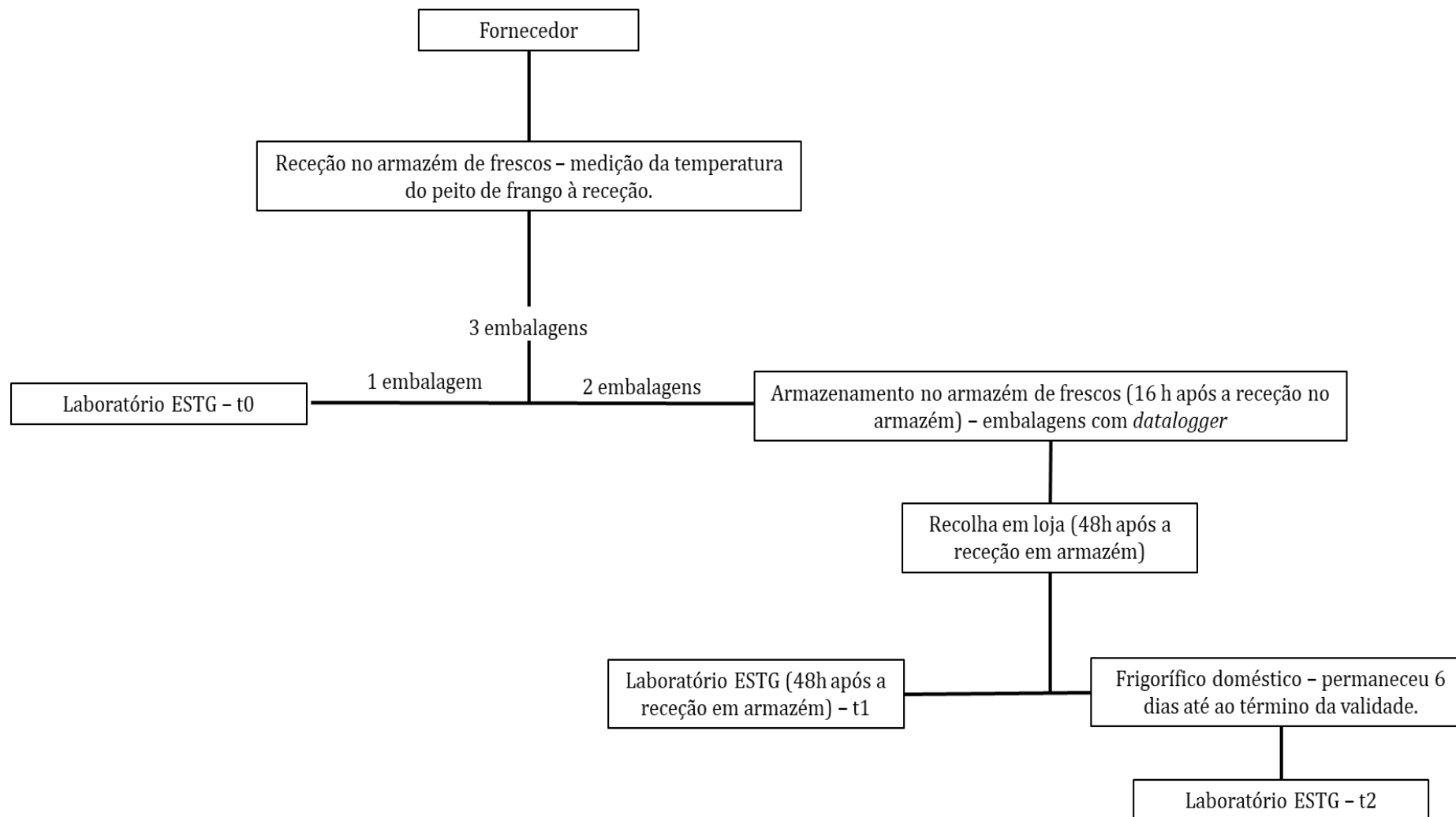


Figura 3. 1: Fluxograma do planeamento experimental.

3.2. Armazém de Frescos

No armazém acima referido, são controlados diversos produtos que, depois de verificados, seguem para as lojas da zona norte de Portugal. Assim, os produtos frescos, como iogurtes, queijos, charcutaria, refeições prontas a consumir, produtos de 4^a gama e carne são devidamente rececionados.

Neste armazém existem processos adaptados à logística que melhor se adequam a cada produto. O processo de receção dos artigos em armazém é realizado conforme o esquema apresentado na Figura 3.2.

Primeiramente, o camião com a mercadoria vindo do fornecedor é descarregado. De seguida, é realizada a verificação da mercadoria por parte do controlo de qualidade. Estando tudo conforme, é rececionado o produto e colocado em paletes (execução), para posteriormente ser expedido para as lojas. – Colocar nos Materiais e Métodos

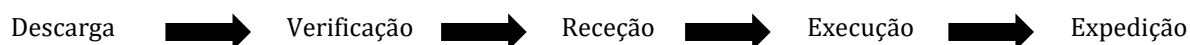


Figura 3. 2: Diferentes fases do processo de receção dos artigos em armazém.

3.3. Registo de Temperaturas

À receção do frango embalado em armazém foi verificada a temperatura do mesmo, utilizando um termómetro de laser, disponibilizado pela empresa. Das três embalagens recolhidas, uma foi levada para o laboratório da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, para análise (amostras t_0).

As outras duas embalagens seguiram para a loja pertencentes à cadeia de distribuição alimentar em estudo. Nestas embalagens foi introduzido um *datalogger*, permitindo o registo da temperatura ao longo do tempo (conforme descrito na Figura 3.2) de estudo.

Dois dias depois, as amostras que seguiram para a loja de Viana do Castelo foram recolhidas. Estas foram abertas e os peitos de frango foram colocados em sacos de plástico do talho, simulando a situação da parte do consumidor.

Das duas embalagens, retirou-se uma para analisar e a outra permaneceu armazenada num frigorífico doméstico, de forma a avaliar o comportamento do artigo, simulando o percurso do consumidor. No último dia de validade do artigo (8 dias após a receção em armazém) foi feita a leitura registada pelo *datalogger* nela introduzido.

3.4. Medição do pH

A medição de pH foi realizada de acordo com Kaic *et al* (2021) utilizando um medidor de pH, com um eléctrodo para alimentos sólidos com eléctrodo da CRISON, Barcelona.

A determinação do pH foi feita após a recolha da quantidade necessária para as análises microbiológicas, para evitar a contaminação das amostras em estudo. Para cada amostra foi determinado o pH em duas zonas distintas do peito de frango. Todas as determinações foram feitas em triplicado e os resultados apresentados como média e desvio padrão das medições realizadas.

3.5. Medição da Cor

À semelhança da medição de pH, a medição da cor era realizada após a recolha da quantidade para as análises microbiológicas e de acordo com a metodologia adotada por Kaic *et al* (2021).

Para a determinação da cor utilizou-se um colorímetro Minolta CR-300 (Konica Minolta, USA) utilizando o sistema CIE $L^* a^* b^*$, sendo L^* , o parâmetro de luminosidade (de 0 – preto a 10 – branco), a^* representa a variação no eixo verde/vermelho e b^* a variação no eixo azul/amarelo. O colorímetro era calibrado com o branco (placa com o branco padrão) e definido o iluminante D65 em cada momento de amostragem.

Realizou-se a avaliação dos parâmetros de cor nas amostras, encostando a cabeça do medidor foram registados os valores ($L^* a^* b^*$). Para cada tipo de amostra foram efetuadas catorze leituras.

Foram ainda determinados os parâmetros H (tonalidade) e o parâmetro C (saturação -que avalia a gradação da tonalidade para o cinza), obtidos através das Equações 1 e 2 respetivamente.

$$H = \arctan(b^*/a^*) \quad \text{Equação (1)}$$

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Equação (2)}$$

Os resultados são expressos como média das leituras e respetivo desvio padrão dos parâmetros L^* , a^* , b^* , H e C.

3.6. Análises Microbiológicas

3.6.1. Preparação da Suspensão-mãe

Primeiramente, foram colocadas 25g de amostra de peito de frango e meio APT (Buffered Peptone Water, Merck, Alemanha) em sacos de homogeneização numa proporção de 1:10, respetivamente. Este procedimento foi realizado em 5 unidades de peito de frango, e, de seguida, foram feitas diluições decimais com esta suspensão-mãe. A inoculação em placas foi feita em duplicado.

3.6.2. Detecção de Microrganismos a 30 °C

Para avaliar o crescimento de Microrganismos a 30 °C, foi utilizado o meio PCA (Plate Count Agar, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), seguindo as indicações descritas na ISO 4833-1:2013. Foram feitas 6 diluições, e de cada uma foi colocado 1 mL em placas de Petri esterilizadas, sendo o meio de cultura adicionado posteriormente. As placas foram incubadas durante ± 72 h a 30 °C.

3.6.3. Quantificação de *E. coli*

O crescimento seletivo da bactéria *E. coli* foi realizado em meio TBX (Tryptone Bile x-glucuronide agar, VWR International, LLC, Pensilvânia), tendo por base as indicações descritas na norma ISO

16649-1:2001. Foram realizadas 4 diluições, colocando-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas, sendo o meio de cultura adicionado posteriormente. As placas foram incubadas durante 18 h a 24 h a uma temperatura de 45 °C.

3.6.4. Quantificação de *Enterobacteriaceae*

Para a quantificação de *Enterobacteriaceae* foi utilizado o meio VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar, BIODAR Diagnostics, França), de acordo com a norma ISO 21528-2:2017. Para esta análise foram realizadas 5 diluições, das quais foi retirado 1 mL e colocado em placas de Petri esterilizadas, posteriormente foi adicionado o meio de cultura e após a solidificação do meio, foi colocada uma segunda camada do mesmo, tendo sido as placas incubadas durante 24 h a 37 °C.

Para confirmar a presença de *Enterobacteriaceae* foi realizado o teste da oxidase. Na presença de oxigénio, o sistema citocromo oxidase/citocromo C pode reduzir uma série de substâncias orgânicas, nomeadamente o reagente NaDi (1-naftol+dimetilparafenileno diamina), formando a molécula de condensação azul de indofenol.

Além do teste de oxidase, as colónias foram colocadas em tubos com meio GOF (Glucose OF Medium, Condalab, Espanha). Neste meio a digestão enzimática da caseína é a responsável pelo fornecimento de azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos; o cloreto de sódio é o responsável por fornecer eletrólitos que mantém o equilíbrio osmótico; o fosfato dipotássio atua como tampão e a glucose é o hidrato de carbono responsável pelo fornecimento de carbono e de energia. O indicador de pH presente no meio, azul de bromotimol, indica se após o tempo de incubação ocorreu ou não a fermentação da glucose.

3.6.5. Quantificação de *Listeria monocytogenes*

A quantificação de *L. monocytogenes* foi realizada de acordo com a ISO 11290-2:2017. Foram realizadas 4 diluições. As suspensões foram colocadas na superfície do meio ALOA (Chromogenic Listeria Agar, Condalab, Espanha). Foi realizado o espalhamento à superfície de 0,1 mL da suspensão-mãe numa placa de Petri de 90mm, e 1 mL da mesma suspensão numa placa de 140mm. Das restantes diluições foi retirado 0,1 mL de suspensão e colocado no meio de cultura em placas de 90mm. Por fim, foi realizado o espalhamento nas placas com meio e as mesmas foram colocadas a incubar durante 24 h a 37 °C.

De seguida, as colónias suspeitas de se tratar de *L. monocytogenes* foram retiradas com uma ansa esterilizada e colocadas no meio TSEYA (meio TSB (Tryptone Soya Broth, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) e extrato de levedura (BIODAR Diagnostics, França), um meio não seletivo que permite o desenvolvimento de colónias isoladas.

Após o crescimento de colónias isoladas, realizou-se o teste da catalase. A catalase é uma enzima comum presente na maior parte dos organismos vivos expostos ao oxigénio. Esta enzima acelera a decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, sendo que uma das características da bactéria *L. monocytogenes* é ser catálase-positiva.

Além do teste da catalase foi também realizada o teste da coloração de Gram. *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, ou seja, quando submetida ao processo de coloração de Gram adquire a cor azul-violeta.

Nos casos em que os testes de confirmação anteriormente descritos se verificaram positivos, foi realizada outra etapa de confirmação, o teste CAMP. Na realização deste teste, é utilizada uma estirpe de *S. aureus* e uma estirpe de *Rhodococcus equi*. Cada uma das culturas é colocada numa linha simples ao longo da placa de agar-sangue, de modo que as duas culturas fiquem paralelamente oposta. De seguida, de forma similar, são colocadas perpendicularmente as culturas das estirpes em estudo, de maneira que não toquem nas culturas de *S. aureus* e de *R. equi*.

3.6.6. Quantificação de *Staphylococcus aureus*

A quantificação de *S. aureus*, foi realizada usando o meio BPA (Baird Parker Base Agar, VWR International, LLC, Pensilvânia), segundo a norma ISO 6888-1:1999. Foram feitas 4 diluições, e as suspensões foram usadas para inoculação de placas com meio BPA, por espalhamento à superfície, tendo sido colocado 0,1 mL da suspensão-mãe numa placa de Petri de 90mm, e 1 mL da mesma suspensão numa placa de 140mm. Das restantes diluições foi retirado 0,1 mL de suspensão e colocado no meio de cultura em placas de 90mm. Por fim, foi feito o espalhamento nas placas e as placas foram colocadas a incubar durante 24 h a 37 °C.

Ao fim das 24h de incubação, ocorreu crescimento de colónias em placas BPA, e como tal foi necessário proceder aos testes de confirmação para se verificar se se tratava de Estafilococos coagulase positiva. Foi realizado o teste da coagulase, no qual se retira uma colónia do meio de cultura e se transfere para um tubo com o meio BHI (Brain-Heart Broth, VWR International, LLC, Pensilvânia). De seguida colocou-se a cultura a incubar durante 24 h. Posteriormente, em tubos de polipropileno de 1,5 ml, colocou-se 0.1ml de suspensão e 0.3ml de plasma de coelho (Biokar Diagnostics, França). O teste é considerado positivo se, ao fim de 4/6h de incubação, ao inclinar o tubo, se verificar mais de metade do volume coagulado.

3.6.7. Deteção de *Salmonella* spp.

Para verificar a existência de *Salmonella* spp. foram realizados os procedimentos descritos na norma ISO 6579-1:2017. A suspensão-mãe foi colocada a incubar a 37 °C durante 18h. Após o tempo de incubação foram inoculados tubos com meio RVS (Rappaport - Vassiliadis Soja, Biokar Diagnostics, França) e MKTT (Muller-Kauffmann-Tetrathionate Novobiocin, Biokar Diagnostics, França) e, de seguida, foram incubados a 41.5 °C e 37 °C, respetivamente, durante 24h. Posteriormente, do crescimento obtido nesta etapa, foram inoculadas placas com meio seletivo de XLD (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar, Biokar Diagnostics, França) e SMID (ChromID Salmonella Agar, Biomerieux, França) e incubadas a 37 °C por 24h.

O meio XLD apresenta características que inibem o crescimento de bactérias gram-positivas e promovem crescimento de bactérias gram-negativas, como *Salmonella* spp. Após a fermentação da xilose presente no meio a espécie *Salmonella* spp. descarboxila a lisina (via lisina descarboxilase) em

cadaverina, o que provoca um aumento de pH. As colónias formadas são vermelhas devido ao indicador vermelho de fenol. Este meio de cultura contém lactose e sacarose o que permite que bactérias coliformes descarboxilem a lisina, promovendo a produção de excesso de acidez, tornando o indicador de pH amarelo. As colónias de *Salmonella* spp. distinguem-se das restantes espécies, capazes de crescer em meio XLD, por produzir H₂S, o que causa o escurecimento das colónias. Por isso, as colónias de *Salmonella* spp. crescem vermelhas com o centro preto, o que as distingue de colónias de *Shigella* spp. e de outros coliformes.

O meio de cultura SMID é um meio seletivo e de diferenciação utilizado para a deteção de *Salmonella* spp. Tem uma base nutritiva com uma variedade de peptonas e 3 substratos cromogénicos que permitem o crescimento de diferentes espécies de *Salmonella* spp. e detetar a atividade de enzimas específicas. A distinção de *Salmonella* spp. é possível pela observação de crescimento de colónias entre o rosa e o roxo.

Posteriormente aos resultados obtidos no crescimento em placas com meios seletivos, nos casos em que verificou o aparecimento de colónias típicas de *Salmonella* spp. foram realizados testes de confirmação. O teste de oxidase foi realizado para se verificar se se tratava de *Enterobacteriaceae*. O teste ONPG permite detetar a presença de beta-galactosidase, uma vez que as bactérias da espécie *Salmonella* não conseguem utilizar a lactose como fonte de carbono.

O meio TSI agar (Triple Sugar Iron Agar, Liofilchem, Itália) é constituído por três hidratos de carbono (glicose, lactose e sacarose), que permite identificar se os organismos que fermentam os três hidratos de carbono presentes no meio ou não, bem como a produção de ácido e a formação de gás. Se a bactéria em estudo se tratar de *Salmonella* spp. irá utilizar apenas a glucose como fonte de carbono que se verifica pela mudança de cor do meio, que passará a ser amarelo devido à fermentação da glucose e consequente produção de ácidos orgânicos. Contudo, uma vez que a quantidade de glucose é reduzida, a bactéria utiliza esses ácidos como fonte de carbono quando a glucose se esgota, o que origina compostos alcalinos, ou seja, o meio passa a ter cor vermelha apenas na rampa do meio, por ser uma reação que ocorre na presença de oxigénio.

Outro teste de identificação utilizado foi o teste da urease. Se a presença de urease for positiva o meio passará a ser cor-de-rosa, por outro lado se for negativo o meio irá manter a cor inalterada. Como bactérias do género *Salmonella* não são capazes de degradar a ureia, as bactérias em estudo deverão revelar um resultado negativo para este teste.

O teste de citrato foi também utilizado e consiste no uso do meio SCA (Simmons Citrate Agar, Itália) que contém como fonte de carbono o citrato. Como a fonte de carbono deste meio é um dos elementos do Ciclo de Krebs, apenas as bactérias aeróbias o conseguem utilizar para a produção de ATP, como é o caso de *Salmonella* spp. Desta forma, se a bactéria em estudo se tratar de *Salmonella* spp. o meio irá tornar-se azul.

3.6.8. Detecção de *Campylobacter* spp.

A detecção foi realizada após o enriquecimento em meio Preston, de acordo com a norma ISO 10272-1:2017. Em sacos estéreis de homogeneização foram pesados e colocados, assepticamente, 25 g de amostra e adicionados 225g de meio Preston, perfazendo 250 g. A incubação ocorreu em microaerofilia a 41.5 °C (Estufa Memmert – MEMMERT, Alemanha) durante 24h.

3.6.8.1. Obtenção do DNA

O DNA foi obtido utilizando o procedimento descrito na norma ISO 20837:2006. Após a etapa de enriquecimento, 1mL da cultura, em microtubos de polipropileno, foi centrifugada a 10 000 rpm (centrífuga Hettich – HETTICH, Alemanha) durante 10 min. Após a lavagem do *pellet* com tampão fosfato salino 0,01 M a pH 7.4 realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições. O *pellet* foi ressuspenso em 100 µl de água estéril ultrapura e colocado em banho-maria a ferver durante 15 min. Os tubos foram imediatamente arrefecidos em gelo e após agitação em vortex, os tubos foram centrifugados a 10 000 rpm durante 3 min. O sobrenadante, contendo o DNA extraído, foi transferido para novo micro tubo de polipropileno e guardado a 4 °C até ser usado nas reações de PCR.

3.6.8.2. Polymerase Chain Reaction

A detecção de DNA de *Campylobacter* spp. foi realizada tendo por base um procedimento previamente publicado (Lanz *et al*, 2022). A detecção de presença dos genes *cje* (*C. jejuni* e *C. coli*) e *mapA* (*C. jejuni*) foi realizada por PCR (Biorad CFX96TM – Real Time System).

As reações de amplificação foram realizadas num volume total final de 13 µl contendo 6.5 µl de iTaq supermix (BioRad, USA), 3µl de solução de DNA e 50 pmol de cada *primer* (ver Tabela 3.1). foram realizadas reações multiplex para detecção de cada um dos genes alvo e um par de *primers* para controlo interno de amplificação (V3F e V3R) (Muyser *et al*, 1993).

A reação de amplificação decorreu nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 60 s a 95 °C, 30 segundos a 57 °C e 15 s a 72 °C. Um passo final de extensão a 72 °C durante 10 min foi realizado.

Tabela 3. 1: Primers utilizados.

Primer	Sequência	Gene Alvo	Produto gerado (tamanho em pb)	Referência
V3F	5' – CCTACGGGAGGCAGCAG – 3'	16S rDNA	193 pb	Muyzer <i>et al</i> , 1993
V3R	5' – ATTACCGCGGCTGCTGG – 3'	16S rDNA		
cje F	5' – AGT GCC GAT AAA GGC TCA – 3'	<i>cje</i>	135 pb	Lanz <i>et al</i> , 2022
cje R	5' – ACT CGT CGA GCT TGA AGA ATA CG – 3'	<i>cje</i>		

mapA F	5' – CTG GTG GTT TTG AAG CAA AGA TT – 3'	<i>mapA</i>	96 pb	Lanz <i>et al</i> , 2022
mapA R	5' – CAA TAC CAG TGT CTA AAG TGC GTT TAT – 3'	<i>mapA</i>		

3.6.8.3. Análise Eletroforética dos Produtos de PCR

Após amplificação, os produtos de PCR (5 µl) foram analisados por eletroforese horizontal num E-Gel™ 48 (Thermo Fischer Scientific) 2% usando um sistema E-Gel™ Power (Thermo Fischer Scientific) e como padrão o E-Gel™ 50 bp ladder. Após a eletroforese, o gel foi registrado fotograficamente usando o E-Gel™ Power Snap Electrophoresis System (Thermo Fischer Scientific).

3.7. Tratamento de Dados e Análise Estatística

A análise estatística dos resultados experimentais foi efetuada utilizando o Excel para análise da variância ANOVA com a finalidade de investigar a significância das eventuais diferenças detetadas durante os procedimentos analíticos. Nesta abordagem, amostras cujos resultados da ANOVA e respetivo *post hoc* teste de t de *Student* com $p < 0,05$ foram consideradas como sendo significativamente diferentes.

4. Resultados e Discussão

4.1. Registo da Temperatura do Peito de Frango

À receção do artigo em armazém, foi avaliada a temperatura do mesmo e colocado o *datalogger*, tendo sido registada temperatura de 1.9 °C. O artigo peito de frango a vácuo deve ser conservado a uma temperatura entre 0 °C e 4 °C conforme se encontra descrito na rotulagem do mesmo. O gráfico da Figura 4.1 apresenta as temperaturas registadas ao longo do tempo desde a receção do artigo em armazém até ao último dia de validade. A amostra t_0 corresponde ao momento de receção, a amostra t_1 corresponde à amostra após 48h da receção em armazém e a amostra t_2 diz respeito à amostra após 7 dias da receção em armazém.



Figura 4. 1: Registo de temperatura ao longo do tempo (A – pico registado um dia após a receção em armazém; B – Pico registado dois dias após a receção em armazém).

Um dos objetivos da colocação de um *datalogger* junto dos peitos de frango foi registar a temperatura e possíveis desvios. Pela análise deste gráfico, pode verificar-se que a temperatura de armazenamento e de transporte até à loja manteve-se constante, isto é nos dois primeiros dias deste percurso. O pequeno pico de temperatura registado um dia após a receção em armazém (pico A), pode estar relacionado com o momento de descarga da viatura para o interior da loja, uma vez que esta temperatura ligeiramente mais elevada, apenas se verificou durante uma hora, tendo normalizado posteriormente.

Dois dias após a receção em armazém (pico B), dia de recolha das amostras em loja, foi simulada uma situação de compra por parte do cliente e posterior viagem do mesmo até colocar o peito de frango no frigorífico. Por esta razão, foi registado neste mesmo dia um grande aumento de temperatura

(quase 15 °C) que, posteriormente, voltou a estabilizar, ao fim de, aproximadamente, 4 h (amostra t_2)

A monitorização da amostra no frigorífico doméstico mostrou que a temperatura se manteve constante num frigorífico comum, mesmo com a sua utilização diária, até ao último dia de validade do artigo.

A temperatura tem um impacto significativo no crescimento e na taxa de multiplicação dos microrganismos nos alimentos. A refrigeração é, portanto, considerada uma forma de retardar, mas não de evitar completamente, a deterioração dos alimentos causada por bactérias e fungos (ASAE).

Temperaturas abaixo de 5 °C diminuem a taxa de crescimento da maioria das bactérias, enquanto temperaturas acima de 60 °C a 65 °C são eficazes na destruição da grande maioria dos microrganismos.

Ultrapassar as temperaturas críticas de armazenamento é um dos fatores que mais contribui para a degradação da qualidade dos produtos alimentares perecíveis (Nychas *et al*, 2008).

4.1. Análises Físico-Químicas

Os parâmetros físico-químicos da carne de peito de frango realizados foram o pH e a cor. A medição do pH é um parâmetro importante que influencia a qualidade e conservação da carne, refletindo diretamente a sua frescura e potencial crescimento microbiano. Valores de pH inadequados podem indicar degradação e impactar negativamente a textura e o sabor do produto (Pettersen *et al*, 2004).

O pH foi medido nos dias que foram realizadas as amostragens para análise microbiológica do produto. Os resultados destas medições estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4. 1: Registo dos valores de pH (valores médios $\pm$ desvio padrão).

Amostra	pH
t_0	6,00 $\pm$ 0,06
t_1	5,91 $\pm$ 0,09
t_2	6,00 $\pm$ 0,07

O pH da carne de frango é um indicador importante da qualidade, pois influencia a sua textura, sabor e consequentemente a sua conservação. O pH do músculo antes do abate é aproximadamente de 7,2. Após o abate, o pH diminui devido à presença de ácido láctico que é produzido durante o metabolismo anaeróbico. Por isso, o peito de frango fresco apresenta normalmente, valores de pH entre 5.8 e 6.3. Ao longo do tempo o pH tende a subir, o que se torna favorável para a proliferação de bactérias. Por isso a monitorização de controlo do pH da carne de frango é essencial para garantir um produto de boa qualidade e prolongar a vida útil durante o armazenamento (Pires *et al*, 2018).

Como é possível observar os valores de pH mantiveram-se estáveis ao longo do tempo e dentro dos valores esperados. Para isto poderá ter contribuído o facto de já se tratar de carne desossada

mecanicamente. De acordo com Akramzadeh *et al* (2020), as amostras de frango desossadas mecanicamente, principalmente carcaças inteiras e peito de frango, apresentaram os valores mais baixos de pH, 6.79 e 6.64, respetivamente. Comparativamente, o presente estudo apresentou valores mais baixos de pH, tendo em conta que o valor mais elevado foi 6, no entanto ao longo do tempo, o pH manteve-se estável.

Os valores de pH mais baixos resultam numa melhor qualidade e maior vida útil do alimento. Além disso, quanto menor o pH, menor a possibilidade de proliferação de bactérias. O pH mais baixo causa danos à membrana celular das bactérias, resultando na perda da sua integridade, na hidrólise enzimática e num menor crescimento microbiano em ambientes desfavoráveis (Akramzadeh *et al*, 2020), existindo um menor número de bactérias com desenvolvimento favorável a pH ácidos.

A avaliação da cor é outro indicador essencial da qualidade da carne, não só para o consumidor, mas como indicador da sua degradação. A avaliação instrumental, é uma metodologia rápida que permite averiguar a evolução desta propriedade sem recurso a análise sensorial (Conchillo *et al*, 2005). Neste estudo, a cor das amostras foi monitorizada ao longo do percurso de distribuição, até chegar ao momento de consumo previsto pelo prazo de validade inscrito na embalagem, determinando-se as coordenadas tridimensionais L, a* e b*. Estes parâmetros ajudam a identificar alterações na aparência da carne, que podem ser causadas por fatores como oxidação, armazenamento inadequado ou variações no processo de produção.

Através dos resultados obtidos de L, a* e b*, foram ainda calculados os seguintes parâmetros: a variação total de cor, ΔE_{ab} , a saturação da cor, C (*Chroma*) e a tonalidade H* (*Hue angle*). A variação de cor, ΔE_{ab} , é utilizado para quantificar a diferença de cor entre duas amostras, avaliando a uniformidade e a consistência das cores das diferentes amostras. Os valores mais altos de C indicam cores mais saturadas e intensas, enquanto valores mais baixos indicam cores mais suaves ou acinzentadas. O ângulo de matriz, H*, permite saber a que cor corresponde. Na Tabela 4.2, estão representados os resultados da determinação colorimétrica realizada neste estudo.

Tabela 4. 2: Valores de cor CIE, L, a, b, saturação (C) e tonalidade (H) (valores médios $\pm$ desvio padrão).

AMOSTRA	L*	a*	b*	ΔE_{ab}	C	H*
t ₀	56,27 $\pm$ 3,0	2,80 $\pm$ 2,7	4,43 $\pm$ 3,2		5,24	1,01
t ₁	60,40 $\pm$ 2,0	1,29 $\pm$ 1,0	5,93 $\pm$ 0,9	4,65	6,07	1,36
t ₂	60,58 $\pm$ 2,4	0,92 $\pm$ 2,2	5,31 $\pm$ 2,4	4,79	5,39	1,40

Genericamente, a análise de variância (ANOVA) realizada aos dados que deram origem aos valores apresentados na Tabela 4.2, permitiu detetar diferenças significativas de cor ao longo do tempo de estudo, isto é as amostras apresentavam variação de cor nos tempos t₀ (dia de receção), t₁ (1 dia depois da receção em armazém) e t₂ (7 dias após a receção). Os valores nas amostras t₁ e t₂, mostram algumas diferenças, mas é entre o t₀ e o t₁ que se verifica uma maior diferença em todos os parâmetros.

Os valores de H^* aumentaram ao longo do tempo, o que indica uma alteração na tonalidade da cor para tons mais amarelados e esverdeados, o que sugere um processo de descoloração. Souza *et al* (2019) verificou que, os produtos embalados em plástico comercial, ou seja, feitos de material não biodegradável, têm maior tendência para sofrer descoloração. Por outro lado, a utilização de sistemas de embalagens ativas, isto é, com recurso a filmes de quitosana, permitiu manter a cor mais estável ao longo do tempo. A maior descoloração da carne embalada com plástico comercial, seja polietileno (PE) ou polipropileno (PP), deve-se principalmente à maior permeabilidade ao oxigénio desses materiais quando comparado com o filme de quitosana. A quitosana não só proporciona uma barreira física mais eficaz contra o oxigénio, mas também possui propriedades antioxidantes que ajudam a proteger a carne da oxidação. Portanto, ao usar filme cuja composição uma camada de quitosana, a carne mantém a sua cor por mais tempo devido à menor taxa de oxidação da mioglobina (Souza *et al*, 2019).

Desta forma, os resultados obtidos na Tabela 4.2, podem ser explicados pelo armazenamento do peito de frango em sacos de plástico comuns (compostos por polipropileno), que de facto aconteceu a partir do dia seguinte à receção do peito de frango no armazém, altura em que as amostras t_1 e t_2 foram colocadas em sacos de plástico utilizados no quotidiano, após a abertura das embalagens de origem.

A alteração da cor durante o armazenamento refrigerado de produtos cárneos é explicada pela oxidação lipídica e alterações na microbiota, resultando na formação de metamioglobina, que pode afetar a cor e o sabor da carne. Por isso, a presença e a estabilidade destas moléculas são importantes na indústria alimentar para garantir a qualidade dos produtos cárneos, assim como a sua aceitabilidade (Souza *et al*, 2019).

A ANOVA permitiu ainda verificar se existem diferenças significativas entre os resultados obtidos de L^* , a^* e b^* em t_0 , t_1 e t_2 .

No que diz respeito aos valores de L^* verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre todas as amostragens ($p < 0,05$). Para identificar quais pares de tempos apresentavam diferenças significativas, foi realizado o *post hoc de t* student. Os resultados mostraram que houve uma diferença significativa nos valores de L^* entre t_0 e t_1 ($p < 0,05$) (Tabela 2 do Anexo I), bem como entre t_0 e t_2 ($p < 0,05$) (Tabela 3 do Anexo I). No entanto, não houve diferença significativa nos valores de L^* entre t_1 e t_2 ($p > 0,05$). Isto significa que a luminosidade mudou significativamente entre t_0 (dia de receção do artigo) e t_1 e t_2 (um dia após a receção e sete dias pós a receção, respetivamente), mas permaneceu constante entre t_1 e t_2 .

A análise de variância dos valores de a^* mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) (Tabela 5 do Anexo I). Tal como já observado nos valores de L^* , as diferenças entre t_0 e t_1 (Tabela 6 do Anexo I) e entre t_0 e t_2 (Tabela 7 do Anexo I) são significativas ($p < 0,05$). Contudo entre t_1 e t_2 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 8 do Anexo I), o que leva a crer que a intensidade da cor no eixo verde-vermelho mudou significativamente entre o dia de receção em armazém (t_0) e ao fim de um e sete dias de receção (t_1 e t_2 , respetivamente).

No caso dos valores b^* (Tabela 9 do Anexo I) indicou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre t_0 , t_1 e t_2 ($p>0.05$), o que sugere que a intensidade da cor no eixo azul-amarelo permaneceu constante ao longo do tempo.

Segundo o estudo realizado por Çapan e Bagdatli (2021), com peitos de frango convencionais (frangos até 42 dias) apresentaram valores de L^* de 64.3, e peitos de frango d origem biológica (frangos até 81 dias) apresentaram valores de L^* de 59.65. Comparativamente com o presente estudo, os valores de L^* obtidos estão mais próximos dos valores das amostras de frango biológicos.

Por outro lado, os valores de a^* para peitos de frango convencionais e biológicos foram 8,1 e 10,25, respetivamente e os valores de b^* foram 14,81 e 14,86, para frangos convencionais e biológicos, respetivamente. Estes valores são bastante superiores aos resultados obtidos neste estudo pois os valores de a^* variam entre 2.8 a 0.92 e de b^* entre 4.43 e 5.93, em termos visuais as amostras deste estudo apresentavam-se mais esbranquiçadas o que as referidas no estudo de Capan e Bagdatli (2021) mas mais próximos do estudo de Qiao *et al* (2001).

No estudo de Qiao *et al* (2001), o autor comparou três tipos de carne de frango (mais claro que o normal, claro e mais escuro que o normal), tendo obtido valores de a^* semelhantes ao presente estudo. A carne de frango mais clara, apresentou valores de a^* de aproximadamente 2.78 na medição realizada no dia da recolha, tendo aumentado para 3.42 após um período de incubação de 24h a 4 °C. No que toca aos valores de b^* , o autor obteve valores de b^* de 4.87 aquando da colheita e 5.56 após 24h de armazenamento.

Comparando os resultados obtidos com os resultados descritos por Qiao *et al* (2001), verificamos que o peito de frango em estudo apresentou valores mais próximos de a^* e de b^* para o tipo de carne de frango mais clara que o normal.

Os valores de L^* , a^* e b^* não estão diretamente relacionados com o facto de se tratar de frangos convencionais ou não, pois estes resultados são consequência de características genéticas e das rações dos frangos (Çapan & Bagdatli, 2021).

No presente estudo, foi ainda determinada a variação total de cor ao longo do tempo de estudo, ΔE_{ab} de 4.65 e 4.79 (Tabela 4.2), o que indica uma diferença perceptível na cor entre as amostras. Valores de ΔE_{ab} acima de 2 são, geralmente, considerados visíveis a olho nu, sugerindo que há variações de cor, nas amostras analisadas, suficientes para serem detetadas visualmente (Barbin *et al*, 2016).

Quanto aos valores de C^* obtidos, estes sugerem uma saturação moderada das cores, indicando que as cores do peito de frango não são muito intensas. Estes resultados são semelhantes ao estudo de Takma & Korel (2019), que comparou a utilização de um novo filme para preservar a qualidade da carne utilizando uma embalagem ativa e o uso de uma embalagem sem a adição de filme ativo. Segundo os autores, não houve diferenças significativas nos valores de C^* entre as duas embalagens. Apesar dos valores dos autores serem muito semelhantes aos obtidos neste estudo, o valor mais elevado de C^* foi verificado nas amostras de t_1 (48 h após a receção em loja), enquanto os autores, verificaram o valor mais elevado ao fim de 5 dias.

Por outro lado, os valores de H^* obtidos apresentam-se bastantes distintos do estudo de Takma & Korel (2019), que verificou valores bastante elevados, entre 74.96 e 83.55, nas amostras embaladas em plástico. Já no presente estudo, cujo peito de frango avaliado estava também embalado numa embalagem anaeróbica de plástico, os resultados de H^* variaram apenas entre 1.01 e 1.4, o que indica que a cor tem uma tonalidade mais próxima do vermelho.

A relação entre o pH, a cor e a qualidade da carne já tem sido estudada e com resultados muito consistentes para as carnes vermelhas e também já há muitos estudos publicados relativos a carne de aves de capoeira, contudo a sua influência na qualidade da carne de aves não é tão clara como casos de estudo de carnes de bovino e suíno, como por exemplo a definição de casos de PSE (Pálida, Mole e Exsudativa) e carne escura, firme e seca em suínos e bovinos. Alguns estudos associam a cor pálida da carne de peru a um pH mais baixo, semelhante à condição de PSE em suínos. Diferenças de pH também foram observadas entre peitos de frango de aves, claros e escuros, afetando propriedades funcionais de forma similar às condições de PSE e carne escura, firme e seca em carnes vermelhas (Qiao *et al*, 2001).

A quebra de temperatura durante a refrigeração e o armazenamento do peito de frango cru afeta significativamente a cor da carne. Flutuações na temperatura aumentam a oxidação dos lípidos e outras reações químicas no músculo, resultando em descoloração. Isso geralmente leva a uma aparência mais pálida ou escura, impactando negativamente a qualidade visual do produto.

Segundo Kim *et al* (2022), as condições de armazenamento influenciam significativamente a oxidação e a cor do peito de frango. Os autores afirmam que a carne armazenada a temperaturas mais baixas manteve uma melhor qualidade de cor, enquanto as flutuações de temperaturas levaram a uma deterioração mais rápida e uma coloração menos atraente.

Também de acordo com o estudo de Conchillo *et al* (2005), os autores destacaram que temperaturas de armazenamento inadequadas podem acelerar a deterioração microbiana e química, resultando numa mudança de cor da carne, que é um indicativo visual importante para a frescura do alimento.

4.3. Análises Microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas às amostras de peito de frango, nomeadamente, contagem de microrganismos a 30 °C, de *E. coli*, de *Enterobacteriaceae*, de *S. aureus* e de *L. monocytogenes*, e foi avaliada a presença de *Salmonella* spp. e de *Campylobacter* spp..

Para a contagem de microrganismos a 30 °C, foi utilizado o meio PCA, representado a Figura 4.2 um exemplo do crescimento observado numa placa deste meio.



Figura 4. 2: Crescimento numa placa de PCA ao fim de 72h de incubação.

A quantificação de *E. coli* foi realizada através da utilização do meio TBX, por se tratar de um meio seletivo e diferencial para esta espécie. A hidrólise do substrato cromogénico BCIG (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolilo- β -D-glucorónico) provoca a formação de colónias azuis ou azuis-esverdeadas (β -D-glucoronidase positiva), indicando a presença de *E. coli*. A Figura 4.3 representa o crescimento numa placa com este meio ao fim de 24 h.

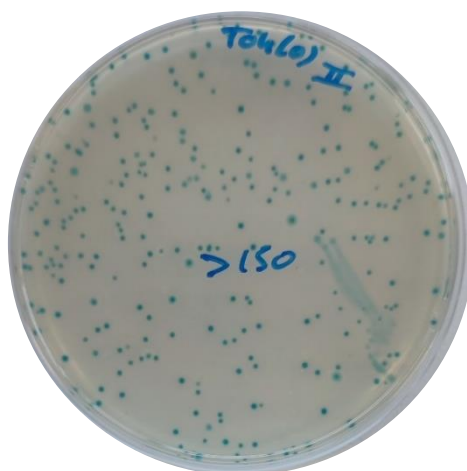


Figura 4. 3: Crescimento numa placa de TBX ao fim de 24h de incubação.

Para contagens de *Enterobacteriaceae* presente nas amostras em estudo foi utilizado o meio VRBGA, uma vez que este se trata de um meio seletivo para bactérias gram-negativas, pois o violeta de cristal e os sais biliares, presentes na composição deste meio, inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas. O crescimento em placa de VRBGA pode ser observado na Figura 4.4. Após o crescimento em meio VRBGA, as colónias negativas para o teste da oxidase e positivas para o teste da glucose, foram consideradas positivas para *Enterobacteriaceae*.

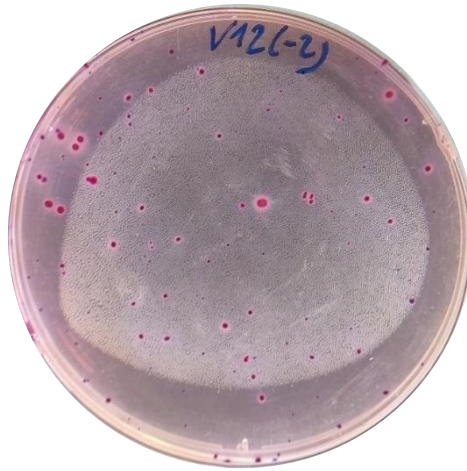


Figura 4. 4: Crescimento numa placa de VRBGA ao fim de 24h de incubação.

Quanto ao estudo da presença de *S. aureus* foi utilizado o meio BPA, que é um meio seletivo para esta espécie. O crescimento em meio BPA pode ser observado na Figura 4.5.



Figura 4. 5: Crescimento numa placa de BPA ao fim de 24h de incubação.

A quantificação de *L. monocytogenes* foi realizada, utilizando o meio ALOA. Este meio é muito utilizado por se tratar de meio seletivo para o isolamento e identificação de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. em amostras alimentares e clínicas. As colónias características de *L. monocytogenes* crescem neste meio com uma cor azul e formam uma auréola branca e opaca. O crescimento em placa de ALOA pode ser observado na Figura 4.6.



Figura 4. 6: Crescimento numa placa de ALOA ao fim de 24h de incubação.

Na Tabela 4.3 estão representados os resultados obtidos após as contagens das placas e dos testes de confirmação de cada microrganismo em análise.

Tabela 4. 3: Síntese dos resultados das análises microbiológicas (UFC/g).

Amostra	Microrganismos a 30 °C		
	Nmáx	Nmin	Nmédia
t ₀	1,1x10 ⁶	2,9x10 ⁴	2,5x10 ⁵
t ₁	5,3x10 ⁴	8,4x10 ³	2,2x10 ⁴
t ₂	6,0x10 ⁷	1,2x10 ⁷	4,3x10 ⁷
<i>E.coli</i>			
t ₀	2,7x10 ²	<10	1,3x10 ²
t ₁	4,4x10 ²	9,0x10 ¹	2,3x10 ²
t ₂	1,5x10 ²	3,0x10 ¹	7,5x10 ¹
<i>Enterobacteriaceae</i>			
t ₀	5,3x10 ²	<10	2,4x10 ²
t ₁	9,1x10 ²	2,4x10 ²	5,1x10 ²
t ₂	1,4x10 ⁵	2,8x10 ²	7,7x10 ⁴
<i>S. aureus</i>			
t ₀	3,0x10 ¹	<10	5,5x10 ⁰
t ₁	5,6x10 ⁰	<10	1,1x10 ⁰
t ₂	<10	<10	<10

<i>L. monocytogenes</i>			
t ₀	<10	<10	<10
t ₁	<10	<10	<10
t ₂	<10	<10	<10

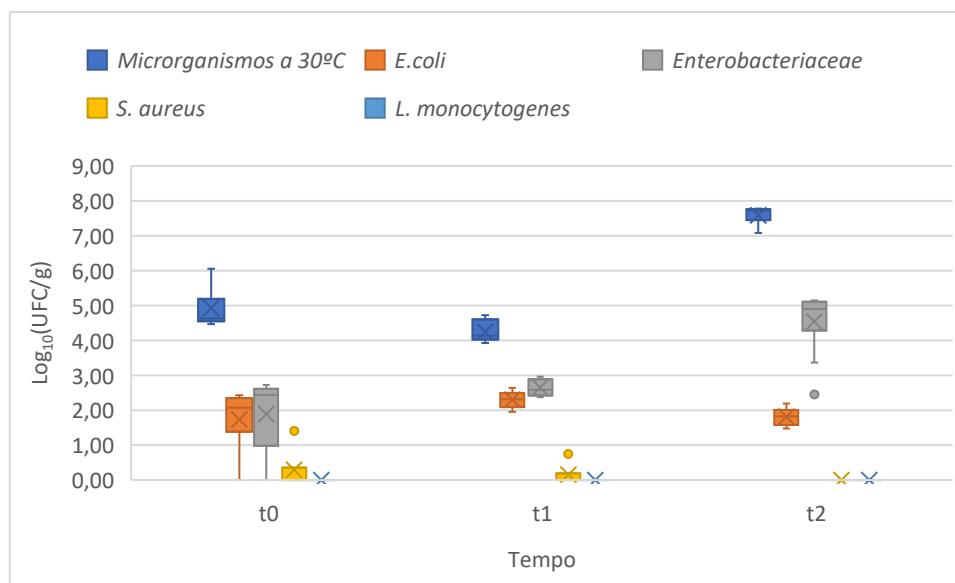


Figura 4. 7: Evolução do crescimento microbiano ao longo do tempo.

O tecido muscular de animais saudáveis, abatidos sob condições higiénicas, é geralmente isento de microrganismos internamente. A contaminação microbiana ocorre durante o processo de abate e nas operações subsequentes. Os microrganismos contaminantes e os patogénicos podem ter origem no trato intestinal dos animais e do ambiente externo (Pereira, 2018).

Algumas bactérias deterioram os alimentos, o que diminui o seu prazo de validade, enquanto outras causam infeções alimentares ou intoxicações, como por exemplo *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, entre outras (Pereira, 2018).

Pela análise dos resultados apresentados (gráfico da Figura 4.7 e Tabela 4.3) é possível verificar que existe um claro crescimento dos microrganismos totais a 30 °C. no fim do prazo de validade, sendo que, algumas amostras chegam a atingir valores indicativos de crescimento microbiano excessivo (10^6 a 10^7) (Galarz *et al*, 2010).

Contrariamente aos resultados verificados na quantificação de Microrganismos a 30 °C, os valores mais elevados de *E. coli* foram obtidos na amostra t₁ e não na amostra t₂. Este comportamento pode ser explicado pelo facto de estarmos perante uma microbiota mista, havendo competição natural pelos mesmos nutrientes. Aparentemente, alguma outra espécie, possivelmente também *Enterobacteriaceae* (pois os seus níveis também aumentam de t₁ para t₂), está mais adaptada ao meio “peito de frango”, conseguindo ter vantagem competitiva em relação à *E. coli*.

Em todas as amostras analisadas foi detetada a presença de *E. coli* e a sua presença pode ser consequência de contaminações ambientais, falta de higiene no processamento, matérias-primas contaminadas, condições de armazenamento não adequadas, entre outras (Akramzadeh *et al.*, 2020).

A maioria das bactérias que contaminam os alimentos são mesófilas, ou seja, crescem em temperaturas entre 25 °C a 40 °C, o que torna crucial manter a cadeia de frio em todas as etapas de armazenamento. No entanto, a deterioração da carne é frequentemente causada por bactérias psicotróficas, que crescem em temperaturas de refrigeração (≈ 4 °C). Por isso, o armazenamento a uma temperatura próxima de 0 °C pode inibir o crescimento destas bactérias e prolongar o tempo de vida útil do produto (Pereira, 2018).

Sendo assim, uma vez que as amostras de t_1 e t_2 sofreram manipulação com oscilação de temperatura que ultrapassam as temperaturas recomendadas, o crescimento microbiano apresentado pode ser explicado devido a todo o manuseamento e alterações de temperatura que este sofreu. As amostras de t_0 foram retiradas da embalagem em laboratório, em ambiente asséptico, pelo que a contaminação deverá ter ocorrido ainda no processo de produção/embalamento.

Como já referido, verifica-se o aumento dos níveis de *Enterobacteriaceae*, ao longo do tempo, atingindo o seu máximo em t_2 .

A bactéria *S. aureus* está presente em diversas partes do corpo humano, nomeadamente, na pele. Os resultados obtidos nas contagens das placas de BPA podem ser explicados pela manipulação do artigo peito de frango. Pela análise da Tabela 4.3 pode-se observar que a amostra t_0 foi a que apresentou maior quantidade de *S. aureus*, o que pode ser explicado pela manipulação do artigo ainda antes do seu embalamento.

Além disso, esta bactéria também é encontrada, frequentemente, na microbiota da carne crua de aves. São necessárias concentrações de 10^5 e 10^6 UFC de *S. aureus* por grama de alimento para produzir toxinas em níveis que podem causar intoxicação alimentar (Casanova *et al.*, 2022), pelo que, os produtos analisados não deverão ser problemáticos a este nível, pois o valor máximo obtido nas amostras analisadas foi de $3,0 \times 10$ UFC.g⁻¹.

No entanto, os resultados obtidos indiciam potenciais rotas de contaminação cruzada, nomeadamente pela manipulação manual das amostras, o que merece ser investigado. De facto, a potencial produção de toxina pelo *S. aureus* pode ser um problema grave, em particular, pela resistência que estas apresentam a temperaturas elevadas, permanecendo um perigo no alimento, mesmo após a sua confeção ter destruído as células de *S. aureus*.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que as contagens de *L. monocytogenes* estão abaixo do limite de deteção (LD). Este resultado é importante e positivo, pois indica que a presença desta bactéria nas amostras em estudo era insignificante, ou mesmo inexistente.

O peito de frango em estudo, apresentava na sua rotulagem a menção de ser consumido apenas após a sua confeção até atingir, pelo menos, 70 °C. À luz do Regulamento (CE) 2073/2005, mesmo que a carne seja destinada a ser cozinhada, a presença em carne crua de *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *L.*

monocytogenes, *S. aureus* e Microrganismos a 30 °C, deve ser monitorizada para garantir que os níveis estão dentro dos limites de segurança, pois a confeção da carne não elimina a necessidade de controlar o crescimento microbiano.

No caso do estudo de *Salmonella* spp., após a incubação em tubos com os meios RVS e MKTT, a presença presuntiva de *Salmonella* spp. foi verificada através da inoculação em placas de XLD e SMID.

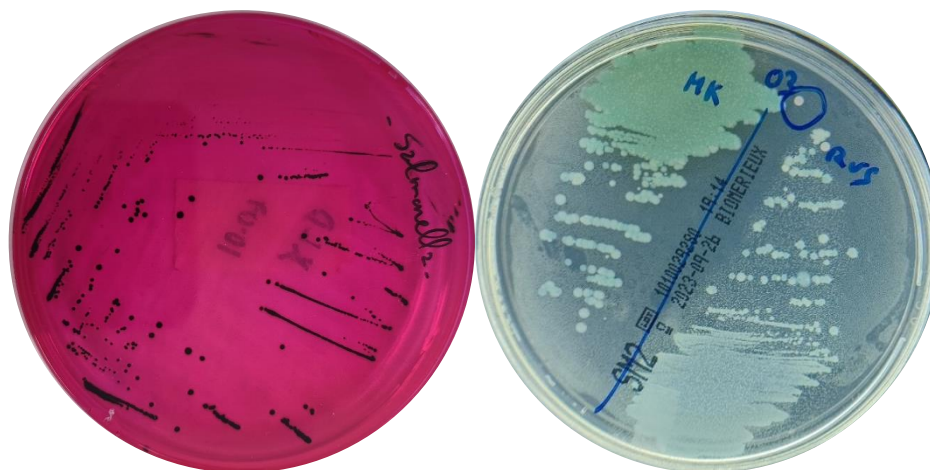


Figura 4. 8: Crescimento de *Salmonella* spp. numa placa de XLD e SMID, respetivamente.

De facto, obtiveram-se colónias típicas que se verificou ser presuntivamente da *Salmonella* spp. em virtude dos resultados obtidos nos testes bioquímicos realizados. Foram realizados testes serológicos usando anti-O, depois anti-H e anti-Vi. Os resultados de anti-O e anti-H foram positivos, ocorrendo aglutinação. Verificou-se, assim, que a bactéria em estudo se tratava de *Salmonella* spp, ou seja, os resultados dos testes de confirmação realizados provaram que a bactéria *Salmonella* spp. está presente em 25 g da amostra em análise (presente numa unidade de t_0).

O peito de frango em estudo é desossado mecanicamente, pois devido ao aumento do consumo de carne de aves foi necessário que a indústria alimentar se tornasse mais mecanizada. Este processo tem a vantagem de diminuir a contaminação por manipuladores, mas não é isento de riscos, nomeadamente a nível de contaminações, uma vez que a carne desossada mecanicamente constitui uma fonte de bactérias patogénicas devido à exposição da carne aos equipamentos e à temperatura durante todo o processamento (Akramzadeh *et al.*, 2020).

De acordo com o Regulamento (CE) 2073/2005, em produtos à base de carne, separados mecanicamente, não se pode detetar a presença de *Salmonella* spp., uma vez que o regulamento determina que não pode ser detetada em 10 g (Anexo II) de nenhuma das unidades que compõem a amostra. Neste estudo, após os testes de confirmação verificou-se a existência de *Salmonella* spp. apenas numa unidade de amostra (t_0).

De realçar, ainda, que foram analisados 25 g de cada unidade de peito de frango, sendo que a legislação apenas obriga a que a *Salmonella* spp. esteja ausente em 10 g (figura 4.9). Assim, os resultados não indicam que a amostra não estava satisfatória à luz do Regulamento (CE) 2073/2005, mas sim que existia efetivamente *Salmonella* spp. em 25 g o que poderá ser problemático, sobretudo

se ocorrerem abusos de temperatura no acondicionamento da carne. Segundo (Akramzadeh *et al.*, 2020), a presença desta bactéria pode ser uma consequência de diferentes fases do abate de aves, como a sangria, a remoção de órgãos internos e a imersão em água, aquando do atordoamento dos animais.

Categoria de alimentos	Microrganismos/respectivas toxinas e metabólitos	Plano de amostragem (1)		Limites (2)		Método de análise de referência (3)	Fase em que o critério se aplica
		n	c	m	M		
1.5 Carne picada e preparados de carne obtidos a partir de carne de aves de capoeira destinados a serem consumidos cozinhados	<i>Salmonella</i>	5	0	►M9 Não detetado ◄ em 25 g		►M9 EN ISO 6579-1 ◄	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
1.6 Carne picada e preparados de carne, excepto os obtidos a partir de carne de aves de capoeira, destinados a serem consumidos cozinhados	<i>Salmonella</i>	5	0	►M9 Não detetado ◄ em 10 g		►M9 EN ISO 6579-1 ◄	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
1.7 Carne separada mecanicamente (4)	<i>Salmonella</i>	5	0	►M9 Não detetado ◄ em 10 g		►M9 EN ISO 6579-1 ◄	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil

Figura 4. 9: Critérios de segurança dos géneros alimentícios (Regulamento (CE) 2073/2005).

As bactérias *Salmonella* spp. são consideradas mesófilas, capazes de se multiplicarem em ambientes com temperaturas entre os 5 °C e os 50 °C. Segundo Herron (2022), determinadas estirpes, não são capazes de se desenvolverem em temperaturas abaixo de 5 °C.

Para além disso, as principais causas de salmonelose são consequência do consumo de produtos de origem de aves e ao facto de as mesmas conterem, nas suas vísceras, *Salmonella* spp. (USFDA, 2020). Desta forma, uma vez que a presença de *Salmonella* spp. foi detetada apenas numa das amostras, pode ser resultado de contaminação, prévia ao embalamento.

A deteção de *Campylobacter* spp. por métodos clássicos, usando meios de cultura, encontra-se normalizada (ISO 10272-1:2017), mas a sua deteção laboratorial é por vezes difícil em virtude das condições exigidas por este microrganismo para crescer em laboratório. A utilização de métodos moleculares, como o PCR, vem facilitar a sua deteção (Adekune *et al.*, 2019).

No presente trabalho a deteção de *Campylobacter* spp. foi realizada tendo por base um método já publicado (Lanz *et al.*, 2022).

Os gráficos obtidos de PCR em tempo real mostram a fluorescência emitida durante os ciclos de amplificação (Figura 4.10).

Uma vez que não foram usadas sondas Beacon e TaqMan, após os resultados obtidos em PCR, foi realizada a análise eletroforética dos produtos de PCR, técnica usada para separar e visualizar fragmentos de DNA obtidos do fim da reação de PCR.

A comparação das bandas observadas com um marcador de peso molecular, que contém fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, permitiu a determinação do tamanho dos produtos de PCR (Figura 4.11).

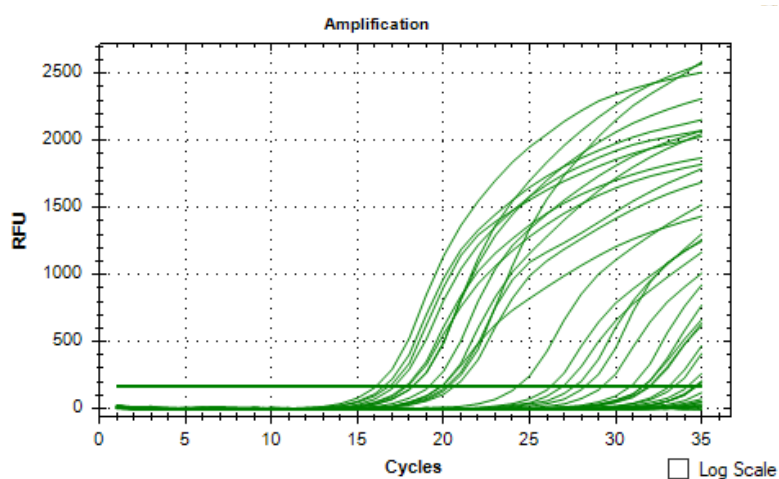


Figura 4. 10: Resultado de PCR.

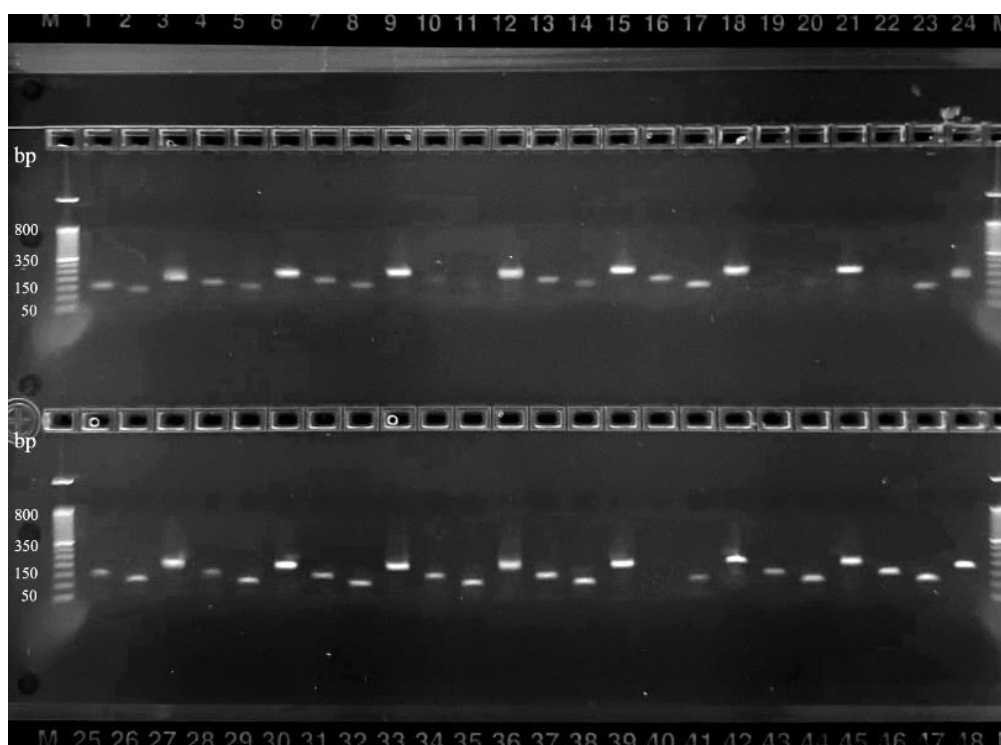


Figura 4. 11: Separação eletroforética dos produtos de amplificação obtidos.

Legenda:

M- 50 bp(base pairs) DNA ladder (padrão utilizado)

t₀: 1-BR001 cej; 2- BR001 mapA; 3-BR001 V3; 4-BR002 cej; 5- BR002 mapA; 6-BR002 V3; 7-BR003 cej; 8-BR003 mapA; 9-BR003 V3; 10-BR004 cej; 11- BR004 mapA; 12-BR004 V3; 13-BR005 cej; 14-BR005 mapA; 15-BR005 V3
t₁: 16-BR006 cej; 17-BR006 mapA; 18-BR006 V3; 19-BR007 cej; 20-BR007 mapA; 21-BR007 V3; 22-BR008 cej; 23-BR008 mapA; 24-BR008 V3; 25-BR009 cej; 26-BR009 mapA; 27-BR009 V3; 28-BR0010 cej; 29-BR0010 mapA; 30-BR0010 V3
t₂: 31-BR0011 cej; 32-BR0011 mapA; 33-BR0011 V3; 34-BR0012 cej; 35-BR0012 mapA; 36-BR0012 V3; 37-BR0013 cej; 38-BR0013 mapA; 39-BR0013 V3; 40-BR0014 cej; 41-BR0014 mapA; 42-BR0014 V3; 43-BR0015 cej; 44-BR0015 mapA; 45-BR0015 V3
46-Camp+ cej; 47-Camp+ mapA; 48-Camp+ V3

Considerando os resultados obtidos com os controlos negativos (água) e positivos utilizados, pode concluir-se que a realização da reação de PCR às diferentes amostras foi bem-sucedida, não havendo qualquer problema de amplificação resultante da presença de inibidores. Verificou-se ainda que todos os *primers* utilizados garantiam amplificações dos fragmentos de tamanho esperado. Apenas foi utilizado um controlo positivo para a presença de *Campylobacter jejuni*, uma vez que não existia nenhuma estirpe de *Campylobacter coli* disponível no laboratório.

De acordo com Lanzl et al (2022), a deteção de *Campylobacter jejuni*, por PCR após enriquecimento, deve ser considerada positiva caso exista amplificação simultânea dos fragmentos resultantes da deteção do gene *cje* e *mapA*. A análise dos resultados (Figura 4.10) permite assim concluir que todas as amostras possuíam *Campylobacter jejuni*, exceto as amostras 7 (t_1), 8(t_1) e 14 (t_2). O resultado pouco conclusivo da amostra 4 levou a uma repetição da análise desta amostra, verificando-se a amplificação de ambos os genes, *cje* e *mapA*, pelo que se confirmou como positiva para a presença de *Campylobacter jejuni*.

De acordo com os critérios estabelecidos no Regulamento (CE) 2073/2005, apesar da análise ter sido realizada com a metodologia de deteção, os resultados obtidos indicam uma prevalência considerável de *Campylobacter jejuni*, o que requer uma maior avaliação, pois as normas de segurança alimentar implicam uma monitorização contínua deste microrganismo.

A contaminação por *Campylobacter* spp. pode aumentar significativamente nos processos de captura e colocação de aves em gaiolas. Para além disso, a mudança de ambiente das estirpes, no tocante a aves vivas e carcaças processadas, pode levar a uma contaminação cruzada, ou até durante o processamento (Slader et al, 2002).

No que diz respeito às infeções humanas por *Campylobacter* spp. a carne de aves é considerada o veículo mais importante, e devido às dificuldades em controlar a sua propagação, seja ela em cozinhas ou matadouros, torna-se mais eficaz o seu controlo nos locais de produção (Slader et al, 2002).

De acordo com os dados da EFSA (2023), a campilobacteriose foi a infeção gastrointestinal de origem alimentar mais frequente e reportada na União Europeia em 2022, com 137.107 casos confirmados.

Assim, estudos recentes indicam que o meio de ambiente, a água potável e a transmissão vertical, são possíveis fontes de colonização de aves, de galinhas. Melhorar a higiene nas explorações, como a desinfecção das botas e a troca de calçados, pode prevenir a introdução da bactéria nos galinheiros (Slader et al, 2002).

Além disso, os veículos de transporte e as caixas podem contaminar os lotes durante o transporte, introduzindo *Campylobacter* spp. em bandos previamente não afetados, especialmente durante o desbaste dos bandos (Slader et al, 2002).

5. Conclusão

No presente trabalho foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas ao peito de frango de um fornecedor de uma cadeia de distribuição alimentar, com o objetivo de avaliar o processo ao nível de armazenamento e distribuição.

O estudo realizado destaca a importância crucial de manter o controlo rigoroso da temperatura e das práticas de processamento durante o armazenamento do peito de frango. Foi evidenciado que flutuações na temperatura podem causar alterações na cor e na qualidade visual da carne devido à oxidação e outras reações químicas. A preservação da cor e da qualidade do peito de frango é diretamente impactada pela estabilidade térmica, enfatizando a necessidade de controlo contínuo.

Ao longo do estudo as alterações de cor foram registadas, no entanto em termos de aparência global não parece que tenha uma influencia muito relevante, mas tanto as alterações de cor como outras propriedades organoléticas de igual importância, como por exemplo cheiro e outros após confeção como textura e *flavour* devem ser estudadas em trabalhos futuros, uma vez que impacta diretamente a perceção de qualidade por parte do consumidor.

Além disso, a análise microbiológica revelou a presença de diversas bactérias patogénicas, incluindo *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., em algumas amostras, apesar de ter sido usado um critério mais restritivo que o critério legal. A deteção de *Salmonella* spp. numa amostra sugere possíveis falhas no controlo da qualidade durante o processo ou armazenamento, e a presença de *Campylobacter jejuni* sublinha a importância de controlar a contaminação em todas as fases da cadeia de produção e transporte.

Os resultados da presença de *Salmonella* spp. e de *Campylobacter jejuni*, são fatores críticos para a segurança alimentar. Estes microrganismos devem ser rigorosamente monitorizados, pois a sua presença pode comprometer a saúde pública, especialmente se o processo de confeção não for adequado.

Por outro lado, a presença de *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* funciona como indicador de higiene e qualidade, fornecendo evidências das condições de manipulação, armazenamento e processamento da carne. A ausência ou presença destes microrganismos não está diretamente associado a riscos imediatos de doenças alimentares, mas o seu controlo é muito importante para assegurar que os produtos alimentares mantêm padrões elevados de higiene e qualidade.

O pH do frango, que influencia diretamente a qualidade e a vida útil do produto, foi observado como um fator crítico. A monitorização do pH e práticas adequadas de manuseamento são essenciais para prevenir a proliferação de microrganismos e garantir a segurança do alimento. As diferenças de pH e a presença de *E. coli* em algumas amostras indicam a necessidade de práticas rigorosas de controlo de qualidade, por forma a garantir padrões elevados nas condições de manuseamento das amostras, e a higienização dos equipamentos e utensílios.

Salienta-se, também, a implementação de melhores práticas de higiene e controlo rigoroso de temperatura, tendo em conta que a contaminação por *Campylobacter* spp. pode ser mitigada através de medidas preventivas, como a desinfecção e o controlo rigoroso durante o transporte e processamento.

É, também, importante realçar que, embora microrganismos indicadores não sejam diretamente regulamentados como os patogénicos, a carne crua, destinada a ser consumida cozinhada, deve cumprir com padrões microbiológicos adequados para evitar riscos relacionados a uma preparação inadequada ou à contaminação cruzada. Por isso, a implementação de um sistema eficaz de HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo) depende dos pré-requisitos, como um controlo das condições de higiene e do ambiente de produção. A presença de *Campylobacter jejuni* e de *Salmonella* spp., juntamente com os indicadores de qualidade, enfatiza a importância de práticas rigorosas de segurança alimentar que, quando bem implementadas, ajudam a garantir a segurança do produto final e a proteção do consumidor.

Assim, e atendendo aos resultados obtidos, é fundamental otimizar o controlo de temperatura ao longo de toda a cadeia de distribuição, a implementação de sistemas de monitorização em tempo real e alertas automáticos, para garantir que a carne seja mantida a temperaturas ideais, minimizando o risco de deterioração.

Além disso, aprimorar as práticas de higiene e processamento nas instalações é essencial. A introdução de procedimentos de desinfecção mais rigorosos e a formação contínua dos funcionários sobre a segurança alimentar podem reduzir a contaminação e melhorar a qualidade dos produtos.

A monitorização e o controlo da qualidade devem ser intensificados com testes regulares para detetar microrganismos patogénicos e analisar parâmetros como o pH. Um programa de controlo de qualidade mais robusto ajudará a garantir que os padrões de segurança serão mantidos.

Investir na formação e consciencialização dos funcionários sobre os riscos de contaminação e a importância dos protocolos de controlo é fundamental para a melhoria contínua dos padrões de segurança alimentar.

Algumas amostras apresentaram uma contaminação indesejável, logo à partida, ou seja, na sua receção no entreposto. É assim, importante estabelecer parcerias com fornecedores que compartilhem os mesmos padrões para garantir consistência e segurança ao longo da cadeia alimentar. A inovação das embalagens deve também ser explorada nesta parceria. Novas tecnologias, como filmes ativos e inteligentes, podem contribuir para a preservação da qualidade do produto e a redução da contaminação durante o transporte e armazenamento.

Em suma, a otimização do controlo da temperatura, o aprimoramento das práticas de higiene, o fortalecimento da rastreabilidade, a intensificação da monitorização da qualidade, a formação contínua, a seleção de fornecedores e a inovação das embalagens, poderão garantir melhorias do sistema de distribuição tornando-o mais eficiente e seguro e assegurando a qualidade e a segurança dos produtos oferecidos aos consumidores.

6. Referências Bibliográficas

- Adekunle, O. C., Onilude, A. A. & Sanusi, T. O. (2019). Molecular Identification of *Campylobacter* Species from Positive Cultural Stool Samples of Diarrhoeic Children in Osun State. *Open Journal of Medical Microbiology*, 9, 8-15.
- Akramzadeh, N., Ramezani, Z., Ferdousi, R., Akbari-Adergani, B., Mohammadi, A., Karimian-Khosroshahi, N., Famenin, B. K., Pilevar, Z., & Hosseini, H. (2020). Effect of chicken raw materials on physicochemical and microbiological properties of mechanically deboned chicken meat. *ARTICLE Veterinary Research Forum*, 11(2), 153–158.
- Andreoletti, O., Budka, H., Buncic, S., Collins, J. D., Griffin, J., Hald, T., Havelaar, A., Hope, J., Klein, G., McLauchlin, J., Müller-Graf, C., Nguyen-The, C., Noerrung, B., Peixe, L., Prieto Maradona, M., Ricci, A., Sofos, J., Threlfall, J., Vågsholm, I. & Romero Barrios, P. (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain; Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); *EFSA Journal*, 9(4), 2105.
- Astill, J., Dara, R. A., Campbell, M., Farber, J. M., Fraser, E. D. G., Sharif, S., & Yada, R. Y. (2019). Transparency in food supply chains: A review of enabling technology solutions.
- Barman, A., Das, R., & De, K. (2021). Impact of COVID-19 in food supply chain: Disruptions and recovery strategy. *Current Research in Behavioral Sciences*, 2, 100017.
- Bhawana I, Malik A, Raposo A, Singh S, Yadav S, Zandonadi RP, Lho LH, Han H, Thakur N. (2023). Physico-chemical, sensory, and microbiological quality of raw chicken meat: an exploratory study in the Hisar city of Haryana, India. *Frontiers in Nutrition*, 1-10.
- Cao, Y., Feng, T., Xu, J., & Xue, C. (2019). Recent advances of molecularly imprinted polymer-based sensors in the detection of food safety hazard factors.
- Çapan, B. & Bagdatli, A. (2021). Investigation of physicochemical, microbiological and sensorial properties for organic and conventional retail chicken meat. *Food Science and Human Wellness*, 10, 183-190.
- Casanova, C. F., Souza, M. A., Fisher, B., Colet, R., Marchesi, C. M., Zeni, J., Cansian, R. L., Backes, G. T. & Steffens, C. (2022). Bacterial growth in chicken breast fillet submitted to temperature abuse conditions. *Food Science and Tecnology*, 42, 1-5.
- Conchillo, A., Ansorena, D. & Astiasarán, I. (2005). Use of microwave in chicken breast and application of different storage conditions: consequences on oxidation. *Eur Food Res Technol*, 221, 592–596
- Cunha, M. C. A. (2017). Execução de ensaios microbiológicos nas áreas alimentar, ambiental e técnica em contexto empresarial. Universidade do Minho. 97 pp.
- Djekic, I., Nikolic, A., Mujcinovic, A., Blazic, M., Herljevic, D., Goel, G., Trafiałek, J., Czarniecka-Skubina, E., Guiné, R., Gonçalves, J. C., Smole-Mozina, S., Kunčič, A., Miloradovic, Z., Miocinovic, J., Aleksic, B., Gómez-López, V. M., Osés, S. M., Ozilgen, S., & Smigic, N. (2022). How do consumers perceive food safety risks?-Results from a multi-country survey. *Food Control*, 142, 956–7135.
- Duan, J., Zhang, C., Gong, Y., Brown, S., & Li, Z. (2020). A Content-Analysis Based Literature Review in Blockchain Adoption within Food Supply Chain.

- Galarz, L. A., Fonseca, G. G. & Prentice-Hermández, C. (2010). Crescimento microbiano em produtos à base de peito de frango durante simulação da cadeia de abastecimento, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 870-877.
- EFSA (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. URL: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2023.8442> (Consultado a Agosto 2024)
- INE (2023). Consumo humano de carne per capita (kg/ hab.) URL: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&contecto=pi&indOcorrCod=0000211&selTab=tab0&xlang=pt (Consultado Maio 2024)
- Kaewthong, P., Pomponio, L., Carrascal, J. R., Knochel, S., Wattanachant, S. & Karlsson, A. H. (2019). Changes in the Quality of Chicken Breast Meat due to Superchilling and Temperature Fluctuations during Storage. *Journal of Poultry Science*, 56, 308-317.
- Kaic, A., Janjecic, Z., Zgur, S., Sikic, M. & Potocnik, K. (2021). Physicochemical and Sensory Attributes of Intact and Restructured Chicken Breast Meat Supplemented with Transglutaminase. *Animals*, 9, 11, 1-8.
- Kamboj, S., Gupta, N., Bandral, J. D., Gandotra, G., & Anjum, N. (2020). Food safety and hygiene: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 358–368.
- Khalid, T., Hdaifeh, A., Federighi, M., Cummins, E., Boué, G., Guillou, S. & Tesson, V. (2020). Review of Quantitative Microbial Risk Assessment in Poultry Meat: The Central Position of Consumer Behavior. *Foods*, 9, 1-26.
- Kim, YY., Park, SJ., Kim, JS. & Shin, HS, (2022). Development of freshness indicator for monitoring chicken breast quality and freshness during storage. *Food Sci Biotechnol*, 31, 377–385
- Lanz, M. I., Zwietering M. H., Abe, T. & den Besten, H. M. W. (2022). a detecção abaixo do limite de *L. monocytogenes*. *Food Microbiology*, 108, 1-8.
- Li, S., Tian, Y., Jiang, P., Lin, Y., Liu, X., & Yang, H. (2021). Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(9), 1448–1469.
- Liu, R., Pinto, E., Pérez, E., Thakur, N., Heejung Lho, L., Han, H., Bhawana, I., Malik, A., Raposo, A., Singh, S., Yadav, S., & Puppini Zandonadi, R. (2023). OPEN ACCESS EDITED BY Physico-chemical, sensory, and microbiological quality of raw chicken meat: an exploratory study in the Hisar city of Haryana, India.
- MAYO. Food poisoning. URL: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/food-poisoning/symptoms-causes/syc-20356230> (Consultado Maio, 2024).
- Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78, 77-89.
- Pettersen, M. K., Nissen, H., Eie, T. & Nilsson, A. (2004). Effect of Packaging Materials and Storage Conditions on Bacterial Growth, Off-odour, pH and Colour in Chicken Breast Fillets. *Packaging Technology and Science*, 17, 3, 165-174.
- Pires, J. R. A., Souza, V. G. L. & Fernando, A. L. (2018). Chitosan/montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary and ginger essential oil as packaging for fresh poultry meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 17, 142-149.

- Qiao, M., Fletcher, D.L., Smith, D.P. & Northcutt, J.K. (2001). The Effect of Broiler Breast Meat Color on pH, Moisture, Water-Holding Capacity, and Emulsification Capacity. *Poultry Science*, 80, 5, 676-680.
- Rojas, M. C. & Cerveja, M. S. (2008). EFFECT OF NATURAL ANTIOXIDANTS ON OXIDATIVE STABILITY OF FROZEN, VACUUM-PACKAGED BEEF AND PORK. *Journal of Food Quality*, 31, 173-188.
- Silva, D. C. F., Arruda, A. M. V. & Gonçalves, A. A. (2017). Quality characteristics of broiler chicken meat from free-range and industrial poultry system for the consumers. *J Food Sci Technol*, 54, 1818–1826.
- Slader, J., Domingue, G., Jorgensen, F., McAlpine, K., Owen, R. J., Bolton, F. J. & Humphey, T. J. (2002). Impact of Transport Crate Reuse and of Catching and Processing on *Campylobacter* and *Salmonella* Contamination of Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 713-719.
- Soon, J. M., Brazier, A. K. M., & Wallace, C. A. (2020). Determining common contributory factors in food safety incidents – A review of global outbreaks and recalls 2008–2018. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 76–87.
- Souza, V. G. L., Pires, J. R. A., Vieira, E. T., Coelho, I. M., Duarte, M. P. & Fernando, A. L. (2019). Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: From in vitro assays to application in fresh poultry meat. *Food Hydrocolloids*, 89, 241-252.
- Takma, D. K. & Korel, F. (2019). Active packaging films as a carrier of black cumin essential oil: Development and effect on quality and shelf-life of chicken breast meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 210-217.
- União Europeia. Regulamento (CE) 2073/2005, de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.
- Unites States Food and Drug Administration. (2020) Get the facts about *Salmonella*. <https://www.fda.gov/animal-veterinary/animal-health-literacy/get-facts-about-salmonella> (Consultado Maio, 2024).
- USDA (United States Department of Agriculture) (2020). Foodborne Illness and Disease. URL: <https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease> (Consultado Maio, 2024).
- Walls, H., Baker, P., Chirwa, E., & Hawkins, B. (2019). Food security, food safety & healthy nutrition: are they compatible? <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.05.005>

APÊNDICES

ANEXOS

Anexo I

Tabela 1: ANOVA entre os valores de L^* .

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	166,6488	2	83,3244	8,860921	0,000672	3,238096135
Dentro de grupos	366,7397	39	9,403582			
Total	533,3885	41				

Tabela 2: T student entre t_0 e t_1 .

	t_0	t_1
Média	56,26671	60,39686314
Variância	9,714374	7,543525688
Observações	14	14
Hipótese de diferença de média	0	
gl	26	
Stat t	-3,71994	
$P(T \leq t)$ uni-caudal	0,000483	
t crítico uni-caudal	1,705618	
$P(T \leq t)$ bi-caudal	0,000966	
t crítico bi-caudal	2,055529	

Tabela 3: T Student entre t_0 e t_2 .

	t_0	t_2
Média	56,06271	60,31545
Variância	9,89271	8,071621
Observações	13	13
Hipótese de diferença de média	0	
gl	24	
Stat t	-3,61772	
$P(T \leq t)$ uni-caudal	0,000688	
t crítico uni-caudal	1,710882	
$P(T \leq t)$ bi-caudal	0,001376	
t crítico bi-caudal	2,063899	

Tabela 4: T student entre t_1 e t_2 .

	t_1	t_2
Média	60,31545	60,73528
Variância	8,071621	11,50731

Observações	13	13
Hipótese de diferença de média	0	
gl	23	
Stat t	-0,3421	
P(T<=t) uni-caudal	0,36769	
t crítico uni-caudal	1,713872	
P(T<=t) bi-caudal	0,73538	
t crítico bi-caudal	2,068658	

Tabela 5: ANOVA entre os valores de a^* .

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	27,61111	2	13,80555	6,581411	0,003445	3,238096
Dentro de grupos	81,80869	39	2,097659			
Total	109,4198	41				

Tabela 6: T student entre t_0 e t_1 .

	t_0	t_1
Média	2,871643	1,26311
Variância	4,563745	1,195379
Observações	13	13
Hipótese de diferença de média	0	
gl	18	
Stat t	2,416703	
P(T<=t) uni-caudal	0,013251	
t crítico uni-caudal	1,734064	
P(T<=t) bi-caudal	0,026502	
t crítico bi-caudal	2,100922	

Tabela 7: T student entre t_0 e t_2 .

	t_0	t_2
Média	2,871643	0,957403
Variância	4,563745	0,939876
Observações	13	13
Hipótese de diferença de média	0	
gl	17	
Stat t	2,942008	
P(T<=t) uni-caudal	0,004556	
t crítico uni-caudal	1,739607	
P(T<=t) bi-caudal	0,009113	
t crítico bi-caudal	2,109816	

Tabela 8: T student entre t_1 e t_2 .

	t_1	t_2
Média	1,26311	0,957403
Variância	1,195379	0,939876
Observações	13	13
Hipótese de diferença de média	0	
gl	24	
Stat t	0,754316	
P(T<=t) uni-caudal	0,228999	
t crítico uni-caudal	1,710882	
P(T<=t) bi-caudal	0,457998	
t crítico bi-caudal	2,063899	

Tabela 9: ANOVA entre os valores de b^* .

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	15,96481	2	7,982406	1,381123	0,263315	3,238096
Dentro de grupos	225,4063	39	5,77965			
Total	241,3712	41				

Anexo II

▼M1

Capítulo 1. Critérios de segurança dos géneros alimentícios

Categoria de alimentos	Microorganismos/respectivas toxinas e metabólitos	Plano de amostragem (*)		Limites (2)		Método de análise de referência (3)	Fase em que o critério se aplica
		n	c	m	M		
1.1. Alimentos prontos para consumo destinados a lactentes e alimentos prontos para consumo destinados a fins medicinais específicos (*)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	►M9 Não detetado ◀ em 25 g		EN/ISO 11290-1	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
1.2. Alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (1)		EN/ISO 11290-2 (6)	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
		5	0	►M9 Não detetado ◀ em 25 g (1)		EN/ISO 11290-1	Antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produz
1.3. Alimentos prontos para consumo não susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos (2) (6)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (6)	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
1.4. Carne picada e preparados de carne destinados a serem consumidos crus	<i>Salmonella</i>	5	0	►M9 Não detetado ◀ em 25 g		►M9 EN ISO 6579-1 ◀	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
▼M2 1.5. Carne picada e preparados de carne obtidos a partir de carne de aves de capoeira destinados a serem consumidos cozinhados	<i>Salmonella</i>	5	0	►M9 Não detetado ◀ em 25 g		►M9 EN ISO 6579-1 ◀	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
▼M1 1.6. Carne picada e preparados de carne, excepto os obtidos a partir de carne de aves de capoeira, destinados a serem consumidos cozinhados	<i>Salmonella</i>	5	0	►M9 Não detetado ◀ em 10 g		►M9 EN ISO 6579-1 ◀	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
1.7. Carne separada mecanicamente (2)	<i>Salmonella</i>	5	0	►M9 Não detetado ◀ em 10 g		►M9 EN ISO 6579-1 ◀	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil

02005R073 — PT — 28.02.2019 — 008 001 — 10

Figura 1: Critérios de segurança dos géneros alimentícios (Regulamento (CE) 2073/2005).

ANEXO III

Gel	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	M	22	23	24
volume amostra (µL)	20	BR001 cej	BR001 mapA	BR001 V3	BR002 cej	BR002 mapA	BR002 V3	BR003 cej	BR003 mapA	BR003 V3	BR004 cej	BR004 mapA	BR004 V3	BR005 cej	BR005 mapA	BR005 V3	BR006 cej	BR006 mapA	BR006 V3	BR007 cej	BR007 mapA	BR007 V3	BR008 cej	BR008 mapA	BR008 V3
		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
volume amostra (µL)	20	BR009 cej	BR009 mapA	BR009 V3	BR010 cej	BR010 mapA	BR010 V3	BR011 cej	BR011 mapA	BR011 V11	BR012 cej	BR012 mapA	BR012 V3	BR013 cej	BR013 mapA	BR013 V3	BR014 cej	BR014 mapA	BR014 V3	BR015 cej	BR015 mapA	BR015 V3	Camp+ cej	Camp+ mapA	Camp+ V3
		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Figura 2: Legenda Eletroforese.