



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

ESTG

Efeito do teor de nitrito na qualidade microbiológica e nas características físico-químicas de produtos
cárneos processados
Ana Luísa Azevedo Da Silva

2025



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Efeito do teor de nitrito na qualidade microbiológica e nas características físico- químicas de produtos cárneos processados

Escola Superior de Tecnologia e Gestão



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Ana Luísa Azevedo Da Silva

Efeito do teor de nitrito na qualidade microbiológica e nas
características físico-químicas de produtos cárneos processados

Mestrado em Engenharia Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria Alberta Pereira das Neves Fonseca Araújo
e do
Professor Doutor Paulo Alexandre da Costa Fernandes

Agosto de 2025

MEMBROS DO JÚRI

Presidente:

Doutora Maria Manuela de Lemos Vaz Velho

Professora Coordenadora da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo

Vogal:

Doutora Susana Maria Gomes Caldas da Fonseca

Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Vogal:

Doutora Maria Alberta Pereira das Neves Fonseca Araújo

Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo

Orientadora

DEDICATÓRIA

*Aos meus Pais.
Aos meus Avôs.
A toda a minha família.*

AGRADECIMENTOS

Dedico esta dissertação a todos aqueles que foram o meu alicerce ao longo desta caminhada e fizeram com que fosse possível a sua conclusão.

À empresa na qual realizei o estágio curricular, especialmente ao doutor Vítor Almeida (Diretor Geral), Engenheira Isabel Pinto (Diretora da Qualidade), Engenheira Catarina Gomes, Soraia Gomes e Inês Soares (Técnicas da Qualidade), Engenheira Regina Pereira (Diretora de Produção) e todos os colaboradores da empresa pelos conhecimentos que me foram transmitindo ao longo dos 6 meses, no seu apoio e disponibilidade no desenvolvimento deste projeto.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Alberta Araújo e ao Professor Doutor Paulo Fernandes, pelo seu apoio e dedicação, exigência e partilha de conhecimentos no desenvolvimento desta dissertação.

Aos Técnicos, Engenheiro Vítor Monteiro e Doutora Élia Fernandes, pelo seu apoio e partilha de conhecimentos no desenvolvimento de todo o trabalho laboratorial.

Ao professor Doutor Rui Alves pela partilha de conhecimentos no desenvolvimento de toda a análise estatística realizada.

Às assistentes técnicas, Luísa Imparadeiro e Isabel Alves pelo apoio.

Aos meus colegas, amigos e professores com quem privei durante o meu percurso académico no Instituto Politécnico de Viana do Castelo.

Aos meus colegas de trabalho com quem privei durante o meu percurso profissional, e que me fizeram evoluir a nível profissional e pessoal.

À minha família, em especial os meus pais pelos valores que me transmitiram ao longo dos anos da minha vida, pois o meu êxito é o nosso. Agradeço a todos os meus familiares que percorreram este caminho comigo.

RESUMO

De acordo com a FAO/OMS (JECFA), os nitritos e nitratos desempenham um papel relevante na conservação e segurança alimentar. Contudo, estão associados a potenciais riscos para a saúde, principalmente devido à formação de nitrosaminas, compostos reconhecidos como nocivos. A IARC/OMS (Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer da Organização Mundial da Saúde), reconhece o impacto epidemiológico, referindo que o consumo de carnes processadas, mesmo em quantidades moderadas, está associado a um risco acrescido de desenvolvimento de cancro de estômago. A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), em consonância com a FAO/OMS (JECFA), avaliou a utilização de nitritos e nitratos em carnes processadas e em géneros alimentícios em geral, concluindo que os níveis atualmente autorizados são considerados seguros. Todavia, a EFSA sublinha que o consumo elevado de carnes processadas aumenta o risco devido ao perigo da formação de nitrosaminas.

Neste contexto, e com base no parecer científico da EFSA, foi publicado, em outubro de 2023, o Regulamento (UE) 2023/2108, que estabelece limites mais restritivos para a utilização de nitritos e nitratos em produtos alimentares. O limite máximo foi reduzido de 150 mg/kg (expresso em nitrito) para 80 mg/kg (expresso em iões de nitrito). O limite de 150 mg/kg expresso em nitrito (NaNO_2) equivale a aproximadamente a 100 mg/kg expresso em iões de nitrito (NO_2^-). Adicionalmente, foram definidos novos requisitos de pureza para os aditivos e estabelecidos prazos de adaptação específicos, de acordo com a categoria de produto.

O presente estudo teve como objetivo comparar o efeito de duas formulações em três produtos à base de carne de suíno: a formulação atual, já comercializada pela empresa, e uma nova formulação com redução de nitritos, em conformidade com o novo regulamento. Para tal, foram analisados três produtos à base de carne de suíno: um enchido (chouriço de carne corrente com colorau), um cozido (fiambre da perna) e um curado (bacon extra). A análise foi conduzida ao longo de um período de 120 dias, tempo habitualmente previsto como tempo de vida útil destes produtos e englobando parâmetros microbiológicos e físico-químicos.

Os resultados evidenciaram diferenças ao longo do tempo de vida útil dos produtos, sendo a cor o parâmetro mais afetado, como esperado, uma vez que os nitritos são os principais responsáveis pela preservação da coloração característica. Estas alterações de cor observadas instrumentalmente refletem variações nos parâmetros de cor; no entanto, estas diferenças podem não ter relevância prática do ponto de vista comercial ou sensorial. De facto, os equipamentos utilizados para a medição de cor apresentam uma sensibilidade superior à perceção visual humana, podendo detetar diferenças que não são percecionadas pelo consumidor e que, portanto, não influenciam a aceitação do produto.

A segurança microbiológica de carnes processadas é fortemente influenciada por parâmetros intrínsecos, nomeadamente o pH, a atividade da água (a_w) e a concentração de nitrito, verificando-se que, níveis elevados de humidade, em associação com pH próximo da neutralidade e baixa concentração de sal/nitrito, favorecem o crescimento microbiano e reduzem o tempo de vida útil do produto. Importa salientar que nenhum destes fatores, controlado isoladamente (por exemplo, pH baixo, atividade de água reduzida ou presença de sal), assegura a inibição completa dos microrganismos. Todavia, a ação combinada de dois ou mais parâmetros cria condições que limitam a sobrevivência e multiplicação microbiana, configurando o denominado efeito barreira (*hurdle effect*).

De facto, do ponto de vista da qualidade microbiológica, a alteração da formulação não comprometeu a segurança alimentar e permitiu assegurar o cumprimento dos critérios microbiológicos legalmente definidos. No final do tempo de vida útil dos produtos, e para além do cumprimento dos requisitos legais em termos de segurança alimentar, os produtos estavam dentro dos limites definidos pelas linhas de orientação para avaliação da segurança microbiológica de alimentos prontos para consumo, reconhecidos internacionalmente (UK Health Security Agency, 2025).

PALAVRAS-CHAVE: nitrito; nitrato; chouriço de carne; fiambre da perna; bacon

ABSTRACT

According to the FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), nitrites and nitrates play a crucial role in food preservation and safety. However, their use is associated with potential health risks, primarily due to the formation of nitrosamines, compounds known for their toxic and carcinogenic potential. The International Agency for Research on Cancer (IARC/WHO) has recognized the epidemiological evidence indicating that the consumption of processed meat, even in moderate amounts, is associated with an increased risk of developing gastric cancer. The European Food Safety Authority (EFSA), in line with the FAO/WHO (JECFA), evaluated the use of nitrites and nitrates in processed meats and other food matrices, concluding that the currently authorized levels are considered safe. Nevertheless, EFSA highlighted that high consumption of processed meats increases the risk due to the potential formation of nitrosamines.

In this context, and based on EFSA's scientific opinion, Regulation (EU) 2023/2108 was published in October 2023, establishing more stringent limits for the use of nitrites and nitrates in food products. The maximum permitted level was reduced from 150 mg/kg (expressed as nitrite) to 80 mg/kg (expressed as nitrite ions). The limit of 150 mg/kg expressed as nitrite (NaNO_2) corresponds to approximately 100 mg/kg expressed as nitrite ions (NO_2^-). Furthermore, new purity criteria for these additives were defined, and specific adaptation periods were established according to the product category.

The present study aimed to compare the effects of two formulations in three pork-based products: the company's current commercial formulation and a new formulation with reduced nitrite content, in compliance with the new regulation. Three pork-derived products were analyzed: a cured sausage (traditional paprika pork sausage), a cooked product (leg ham), and a dry-cured product (extra bacon). The analysis was conducted over a 120 day period, corresponding to the typical shelf life of such products, and included microbiological and physicochemical assessments. The results revealed variations throughout the products' shelf life, with color being the most affected parameter, as expected, given that nitrites are primarily responsible for the stabilization of the

characteristic cured color. The instrumentally detected color changes reflected variations in chromatic parameters; however, these differences may not be of practical relevance from a commercial or sensory standpoint. Indeed, color-measuring instruments possess higher sensitivity than human visual perception, and may therefore detect differences imperceptible to consumers, which are unlikely to influence product acceptance.

The microbiological safety of processed meats is strongly influenced by intrinsic factors such as pH, water activity (a_w), and nitrite concentration. High moisture levels, combined with near-neutral pH and low concentrations of salt and nitrite, promote microbial growth and shorten product shelf life. It should be noted that none of these factors alone (e.g., low pH, reduced water activity, or salt content) can ensure complete inhibition of microorganisms. However, the combined effect of two or more factors creates conditions that limit microbial survival and proliferation, constituting the so-called “hurdle effect.”

From a microbiological quality standpoint, the reformulation did not compromise food safety and ensured compliance with legally established microbiological criteria. At the end of the products’ shelf life, and beyond fulfilling the legal food safety requirements, all samples remained within the limits defined by internationally recognized guidelines for the microbiological safety assessment of ready-to-eat foods (UK Health Security Agency, 2025).

KEYWORDS: nitrite, nitrate, pork sausage, ham (leg ham), bacon

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

DGAV - Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

IDA - Ingestão diária aceitável

BMDL - *Lower Confidence Limit of the Benchmark Dose* (dose de referência limite de confiança inferior)

PC - peso corporal

MetHb - meta-hemoglobina

EFSA - *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)

SCF - *Supply Chain Finance* (Financiamento da Cadeia de Suprimento)

JECFA - *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS em Aditivos Alimentares)

FAO/OMS - *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde)

VMR - valor máximo de referência

VMA - Valor Máximo Admissível

MAP- *Modified Atmosphere Packaging* (Embalagem com Atmosfera Modificada)

DFD - *Dark, Firm, Dry* (Escura, Firme, Seca)

PSE - *Pale, Soft, Exudative* (Pálida, Mole, Exsudativa)

LAB – Bactérias Lácticas

NOCs - Compostos N-nitrosos

POV – Peroxide Value (Valor de Peróxidos)

ABTS – Radical ABTS[•]. (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico))

RP – Reducing Power (RP assay) (Poder redutor)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

Gene 16S rRNA - gene que codifica o RNA ribossomal 16S, uma parte essencial da subunidade menor (30S) do ribossoma bacteriano

DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante)

EMRT-PCR - Enriquecimento + Multiplex Real-Time PCR.

MRT-PCR - Multiplex de PCR em tempo real

mapA – gene presente em *Campylobacter jejuni*

ceuE – gene presente em *Campylobacter coli*

cje – gene comum às duas espécies

CSM - carne separada mecanicamente

RTE - *Ready-To-Eat* (Pronto para Consumo)

INE - Instituto Nacional de Estatística

PORDATA - Base de Dados Portugal Contemporâneo

TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Points* (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABELAS	xxv
1. Enquadramento e objetivos do trabalho	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Nitratos e Nitritos	4
2.1.1. Estrutura Química.....	4
2.1.2. Efeito dos nitratos e nitritos em produtos cárneos	5
2.1.3. Riscos para a saúde	7
2.1.4. Substitutos naturais do nitrito em produtos cárneos	8
2.2. Perigos microbiológicos associados a produtos cárneos processados	9
2.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.2.2. <i>Campylobacter</i> spp.....	10
2.2.3. <i>Salmonella</i> spp.	10
2.2.4. <i>Escherichia coli</i>	10
2.2.5. <i>Clostridium botulinum</i>	11
3. Caracterização da empresa	12
3.1. Caracterização dos produtos	12
3.1.1. Chouriço carne corrente colorau.....	12
3.1.2. Fiambre da Perna	13
3.1.3. Bacon Extra	14
3.2. Processo produtivo por produto	15

3.2.1.	Chouriço de carne corrente de colorau.....	15
3.2.2.	Fiambre da perna	18
3.2.3.	Bacon extra	20
4.	Materiais e Métodos.....	22
4.1.	Desenho experimental	23
4.2.	Análises microbiológicas	24
4.2.1.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	24
4.2.2.	Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores.....	25
4.2.3.	Quantificação de <i>Escherichia coli</i>	25
4.2.4.	Quantificação de Microrganismos a 30°C.....	26
4.2.5.	Quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i>	26
4.2.6.	Quantificação de estafilococos coagulase positiva.....	26
4.2.7.	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
4.2.8.	Pesquisa de <i>Campylobacter</i>	27
4.2.8.1	Extração de DNA	28
4.2.8.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	28
4.3.	Análises Físico-químicas	29
4.3.1.	Determinação do teor de humidade.....	29
4.3.2.	Determinação da atividade da água (a_w)	29
4.3.3.	Determinação do pH.....	30
4.3.4.	Determinação das cinzas	30
4.3.5.	Determinação da cor	31
4.3.6.	Determinação da textura	32
4.3.7.	Determinação dos nitritos e nitratos	34
4.3.8.	Determinação das proteínas/Nitrogénio total.....	36
4.3.9.	Determinação dos cloretos	37
4.3.10.	Determinação do fósforo	37

4.3.11. Determinação das gorduras	38
5. Resultados e Discussão.....	39
5.1. Chouriço carne corrente colorau.....	39
5.1.1. Parâmetros microbiológicos no chouriço de carne corrente	39
5.1.2. Parâmetros físico-químicos analisados na massa.....	40
5.1.3. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos no chouriço de carne corrente.....	43
5.1.4. Parâmetros físico-químicos no chouriço de carne corrente	47
5.1.5. Textura	50
5.2. Fiambre da Perna	50
5.2.1. Parâmetros microbiológicos do fiambre da perna.....	51
5.2.2. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do fiambre da perna	52
5.2.3. Parâmetros físico-químicos do fiambre da perna	55
5.2.4. Textura	58
5.3. Bacon Extra	59
5.3.1. Parâmetros microbiológicos do bacon extra.....	59
5.3.2. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do bacon extra	60
5.3.3. Parâmetros físico-químicos do bacon extra.....	64
5.3.4. Textura	66
5.4. Resultados da pesquisa de Campylobacter	68
5.5. Discussão geral dos resultados	69
6. Conclusões	74
7. Referências Bibliográficas.....	76
ANEXOS	1

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química, atividade e relação dos nitratos/nitritos (Omar et al., 2012).	5
Figura 2. Chouriço de carne corrente colorau com a formulação atual (CA) e Chouriço de carne corrente colorau com a formulação redução (CR).	13
Figura 3. Fiambre da perna com a formulação atual (FA) e Fiambre da perna com a formulação redução (FR).	14
Figura 4. Bacon extra com formulação atual (BA) e Bacon extra com a formulação redução (BR).	14
Figura 5. Chouriço de carne corrente colorau em câmara de climatização.	16
Figura 6. Fluxograma do processo produtivo do chouriço carne corrente colorau.	17
Figura 7. Processo produtivo do fiambre da perna: salmoura (a), injeção (b), enchimento (c), moldagem (d), armazenamento em câmara de refrigeração (e).	18
Figura 8. Fluxograma do processo produtivo do fiambre da perna.	19
<i>Figura 9.</i> Processo produtivo do bacon extra: peças são suspensas antes do tratamento térmico inicial (a), câmara de estabilização (b), embalagem primário (c), e túnel de retração (d).	20
Figura 10. Fluxograma do processo produtivo do bacon extra.	21
Figura 11- Chouriço de carne corrente colorau (a), fiambre da perna (b) e bacon extra (c).	31
Figura 12. Teste de corte utilizando uma sonda Blade Set HDP/BS para o caso do chouriço corrente.	32
Figura 13. Ensaio de compressão, utilizando uma sonda de placa de compressão P/75 Fiambre da perna (a) e bacon extra (b).	32
Figura 14. Resultado gráfico do ensaio de compressão no fiambre da perna e bacon extra, utilizando uma sonda de placa de compressão P/75.	34
Figura 15. Resultado gráfico do teste de corte ao chouriço carne corrente colorau utilizando uma sonda Blade Set HDP/BS.	34
Figura 18. Quantificação de microrganismos a 30 °C ao longo do tempo para cada uma das duas formulações de chouriço de carne corrente (CA e CR).	39

Figura 19. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos analisados na massa das duas formulações de chouriço e no produto final ao longo do tempo.	41
Figura 20. Representação gráfica da CP1 e CP2. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados. Parâmetros físico-químicos analisados: proteína, fósforo, cloretos e cinza.	41
Figura 21. Representação gráfica da CP2 e CP3. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados. Parâmetros físico-químicos analisados: gordura, cloretos, cinza, pH e nitratos.	42
Figura 22. Representação gráfica da CP1 e CP3. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados. Parâmetros físico-químicos analisados: proteína, fósforo, humidade pH e nitritos.	43
Figura 23. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nas duas formulações de chouriço e no produto final ao longo do tempo (0, 60 e 120 dias).....	44
Figura 24. Representação gráfica da CP1 e CP2. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: cloretos, cinza, humidade, nitratos, nitritos, pH, L, a_w , b^* , gordura e microrganismos a 30 °C.	44
Figura 25. Representação gráfica da CP1 e CP3. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: humidade, cinza, cloretos, nitratos, proteína, gordura, a_w , parâmetros a^* e b^* de cor.	45
Figura 26. Representação gráfica da CP1 e CP4. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: nitratos, humidade, parâmetro a^* , cinza, cloretos, fósforo, parâmetro b^* , a_w e gordura.....	46
Figura 27. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos analisados nas duas formulações de chouriço e no produto final ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias).....	47
Figura 28. Representação gráfica da CP1 e CP2. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros	

físico-químicos analisados: pH, nitratos, nitritos, humidade, parâmetro a^* , b^* e L, cinza, cloretos e gordura.	48
Figura 29. Representação gráfica da CP1 e CP3. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: humidade, parâmetro a^* , b^* e L, cinza, cloretos e proteína.	48
Figura 30. Representação gráfica da CP1 e CP4. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: humidade, parâmetro a^* , b^* e L, cinza, cloretos, gordura e fósforo.	49
Figura 31. Representação gráfica da CP1 e CP2. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros de textura analisados: dureza e fraturabilidade.	50
Figura 32. Quantificação de microrganismos a 30 °C ao longo do tempo para cada uma das duas formulações de fiambre da perna (FA e FR).	51
Figura 33. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nas duas formulações do fiambre da perna ao longo do tempo (0, 60 e 120 dias).	52
Figura 34. Representação gráfica da CP1 e CP2. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados: nitritos, parâmetro L da cor, a_w , gordura, nitratos, pH, microrganismos a 30°C e humidade.	53
Figura 35. Representação gráfica da CP1 e CP3. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados: gordura, nitratos, fósforo, cinza, humidade e proteína.	54
Figura 36. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos analisados nas duas formulações de fiambre e no produto final ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias).	55
Figura 37. Representação gráfica da CP1 e CP2. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros	

físico-químicos analisados: nitratos e gordura, parâmetro de cor a^* e L e proteína.	56
Figura 38. Representação gráfica da CP1 e CP3. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: nitratos, proteína e gordura.	56
Figura 39. Representação gráfica da CP1 e CP4. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: nitratos, proteína, cloretos e gordura.....	57
Figura 40. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros de textura analisados nas duas formulações do fiambre da perna ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias).	58
Figura 41. Representação gráfica da CP1 e CP2. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros de textura analisados: dureza, fraturabilidade, mastigabilidade, gomosidade e coesividade.	58
Figura 42. Quantificação de microrganismos a 30 °C ao longo do tempo para cada uma das duas formulações de bacon extra (BA e BR).	59
Figura 43. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nas duas formulações do bacon extra ao longo do tempo (0, 60 e 120 dias). .	60
Figura 44. Representação gráfica da CP1 e CP2. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados: pH, proteína, microrganismos a 30 °C, parâmetros de cor a^* , b^* e L^* , fosforo, cloretos, humidade, nitratos, nitritos, gordura e cinza.....	61
Figura 45. Representação gráfica da CP1 e CP3. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados: microrganismos a 30 °C, gordura, nitratos, nitritos, fosforo, cloretos, humidade e cinza.....	62
Figura 46. Representação gráfica da CP2 e CP3. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados: nitratos, parâmetros de cor b^* e L^* , proteína, atividade da água.	63

Figura 47. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros de físico químicos analisados nas duas formulações do bacon extra ao longo do tempo (0,15, 30, 60, 90 e 120 dias).	64
Figura 48. Representação gráfica da CP1 e CP2. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: pH, a_w , nitratos, gordura, parâmetros de cor b^* , fósforo, humidade, cloretos e cinza.	64
Figura 49. Representação gráfica da CP1 e CP3. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: parâmetros de cor a^* , humidade, cloretos, fosforo, gordura e proteína.	65
Figura 50. Representação gráfica da CP2 e CP3. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: parâmetros de cor a^* e L^* , pH, a_w e proteína.	66
Figura 51. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros textura analisados nas duas formulações do bacon extra ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias).	67
Figura 52. Representação gráfica da CP1 e CP2. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros de textura analisados: dureza, fraturabilidade, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade.	67
Figura 53. Reação de amplificação do gene mapA (para C. jejuni) – Controlo positivo.	68
Figura 54. Reação de amplificação do gene cej (para C. jejuni e C. coli) – Controlo positivo.	68
Figura 55. Reação de amplificação do (controlo interno) do gene V3, onde as diferentes curvas representam as reações de amplificação de cada uma das amostras testadas, sendo que todas elas revelaram a existência de amplificação.	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Análises realizadas aos 3 produtos: chouriço carne corrente colorau, fiambre da perna e bacon extra, nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias.	22
Tabela 2. Condições dos ensaios de textura em cada um dos produtos analisados no texturómetro.	33
Tabela 3. Tabela comparativa dos resultados obtidos, de ião nitrato e ião nitrito, no final do tempo de vida útil dos 6 produtos em análise.	72
Tabela 4. Tabela comparativa dos resultados obtidos nas contagens de microrganismos a 30 °C dos 6 produtos em análise.	1
Tabela 5. Tabela comparativa dos resultados obtidos, de nitrato, em N-NO_3^- (mg/kg) e nitrito, em N-NO_2^- (mg/kg) no t0 e t120 dos 6 produtos em análise.	1
Tabela 6. Tabela comparativa dos resultados obtidos nos restantes parâmetros em análise dos 6 produtos em análise.	2
Tabela 7. Quadro síntese dos valores médios obtidos nas análises físico químicas realizadas ao chouriço de carne corrente colorau (CA e CR).	3
Tabela 8. Quadro síntese dos valores médios obtidos nas análises físico químicas realizadas ao fiambre da perna (FA e FR).	4
Tabela 9. Quadro síntese dos valores médios obtidos nas análises físico químicas realizadas ao Bacon extra (BA e BR).	5

1. Enquadramento e objetivos do trabalho

A segurança alimentar tem adquirido uma relevância crescente no âmbito das políticas públicas e da investigação científica, refletindo-se na necessidade de garantir produtos seguros, de elevada qualidade e produzidos de forma sustentável. As alterações nos padrões de consumo, aliadas a requisitos legais e às inovações tecnológicas, têm vindo a impor uma reflexão contínua sobre a qualidade e a sustentabilidade dos sistemas alimentares.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da redução de nitritos no tempo de vida útil de três produtos processados à base de carne de suíno, nomeadamente, o chouriço de carne corrente com colorau, fiambre da perna e bacon extra, considerando as recentes alterações legislativas, com entrada em vigor a 9 de outubro de 2025, do Regulamento (UE) 2023/2108.

Os portugueses consomem muitos produtos processados à base de carne de porco. O consumo estimado de carne processada anual (cerca de 31,9 kg per capita) representa uma parcela significativa do total de carne de porco consumida. Contudo, segundo os dados do INE e PORDATA existe uma tendência de redução do consumo de carne de porco e bovino desde os anos 2000. O consumo geral teve ligeira queda relativamente ao passado. A tradição cultural ligada às carnes suínas processadas continua bem presente na dieta portuguesa, mas atualmente existe uma grande percentagem da população com um regime alimentar diferente, ou com preocupações com a sua saúde, pelo que se torna fundamental criar produtos que continuem a satisfazer todas as necessidades dos consumidores. O mercado alimentar mostra também o crescimento de alternativas vegetais, incluindo o “fiambre” e “bacon” de origem vegetal, enchidos vegetarianos (chouriço vegetal, tofu fumado, seitan temperado), entre outros.

O enquadramento regulamentar europeu relativo à segurança alimentar tem vindo a consolidar-se desde o início dos anos 2000, com a implementação de um conjunto de normas fundamentais. Destacam-se, neste âmbito, o Regulamento (CE) nº 853/2004, que estabelece disposições gerais de higiene aplicáveis a todas as fases da produção, transformação e distribuição de géneros

alimentícios, e o Regulamento (CE) nº 853/2004, que define regras específicas dirigidas aos operadores do setor alimentar de géneros alimentícios de origem animal, complementando o Regulamento (CE) nº 852/2004 (Parlamento Europeu e do Conselho, 2021).

Em 2017, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) publicou pareceres científicos relativos à reavaliação dos nitritos e nitratos adicionados a alimentos (Comissão Europeia, 2024). Estes pareceres fundamentaram a decisão da Comissão Europeia em reduzir os limites máximos permitidos para a utilização de nitritos e nitratos como aditivos alimentares, tradicionalmente aplicados na conservação de produtos cárneos curados, no âmbito do Plano Europeu de luta contra o cancro. A medida foi aprovada por unanimidade pelos Estados-Membros e oficializada através do Regulamento (UE) 2023/2108 da Comissão, de 6 de outubro de 2023, publicado no Jornal Oficial da União Europeia a 9 de outubro de 2023. Este regulamento introduz alterações ao Anexo II do Regulamento (CE) nº 1333/2008 e Anexo do Regulamento (UE) nº 231/2012, relativamente ao uso dos aditivos nitritos (E 249-250) e nitratos (E 251-252).

A presente investigação foi desenvolvida em colaboração com uma empresa de produção e comercialização de produtos cárneos e consistiu na comparação de duas concentrações de nitritos aplicadas nos três produtos em estudo: a concentração atualmente usada e outra concentração de acordo com a nova regulamentação.

Os produtos foram caracterizados em termos físico-químicos e microbiológicos ao longo de 120 dias, com o objetivo de avaliar o impacto da redução de sal nitrificado relativamente à formulação atualmente comercializada.

Com esta abordagem, pretende-se verificar a necessidade de ajustar o tempo de vida útil ou redefinir a formulação dos produtos em análise, de acordo com a redução de nitritos prevista, assegurando simultaneamente a segurança alimentar do consumidor e a conformidade com o novo enquadramento legislativo europeu.

2. Revisão bibliográfica

Os sais de nitrito e nitrato são amplamente utilizados na conservação de carnes e outros alimentos perecíveis, devido à sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos como *Clostridium botulinum*, agente do botulismo, além de contribuírem para a fixação da cor e sabor característicos dos produtos curados. No organismo humano, os nitratos e nitritos provenientes da dieta são rapidamente absorvidos e, em grande parte, excretados como nitrato. Uma fração significativa do nitrato circulante é concentrada nas glândulas salivares e convertido em nitrito pela microbiota oral. O nitrito absorvido pode oxidar a hemoglobina em meta-hemoglobina, reduzindo a capacidade do sangue de transportar oxigênio, podendo originar nitrosaminas, compostos de reconhecido potencial carcinogénico, sobretudo em condições de pH ácido (Hord et al., 2009).

As ingestões diárias aceitáveis (IDA) foram definidas pelo Supply Chain Finance (Financiamento da Cadeia de Suprimento- SCF) (1997) e pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS em Aditivos Alimentares – JECFA) (2002) e posteriormente reavaliadas pela EFSA, para nitrito: 0,07 mg/kg de peso corporal por dia e para nitrato: 3,7 mg/kg de peso corporal por dia (Mortensen et al., 2017).

A avaliação científica concluiu que a exposição a nitratos provenientes apenas de aditivos alimentares representa menos de 5 % da ingestão total e não excede a IDA em nenhum grupo populacional. Para nitritos adicionados como aditivos, a ingestão estimada encontra-se geralmente dentro dos níveis seguros, mas com um ligeiro excesso em crianças (1 a 6 anos), sobretudo nos percentis mais elevados de consumo de carnes processadas, quando são consideradas todas as fontes dietéticas (naturais, aditivos e contaminantes). A IDA pode ser ultrapassada em bebés, crianças e indivíduos com elevada ingestão alimentar (Authrity, 2017; Mortensen et al., 2017).

Nos níveis toxicológicos, o aumento dos níveis de meta-hemoglobina foi identificado como o principal efeito crítico na derivação da IDA para nitritos. Estudos *in vivo* não indicaram potencial genotóxico relevante para sais de sódio e potássio. Utilizando uma abordagem de BMD (*Benchmark Dose*), a EFSA

reafirmou a IDA de 0,07 mg de ião nitrito/kg pc/dia. Embora em percentis elevados (95 a 99 %), algumas estimativas em crianças ultrapassem esse valor, o excesso é considerado marginal e não crítico, já que a IDA já incorpora margens de segurança (Mortensen et al., 2017).

Apesar dos riscos associados, os benefícios nutricionais do consumo de vegetais, principal fonte dietética de nitrato, superam os potenciais efeitos adversos.

2.1. Nitratos e Nitritos

2.1.1. Estrutura Química

O nitrato inorgânico são sais que contêm o ião nitrato (NO_3^-), e o nitrito inorgânico, são sais que contêm o ião nitrito (NO_2^-), são sais de ácido nítrico e ácido nitroso, respetivamente. Os aniões de nitrato e nitrito estão ligados a um catião metálico, comumente sódio (Na^+) ou potássio (K^+). São sais solúveis em água e ocorrem naturalmente no ambiente como parte do ciclo do Nitrogénio, resultantes de processos de fixação e oxidação do nitrogénio (Omar et al., 2012b).

Nitratos (NO_3^-) são sais ou ésteres do ácido nítrico (HNO_3), a sua estrutura é constituída por um átomo de nitrogénio central ligado covalentemente a três átomos de oxigénio, com uma carga negativa distribuída por ressonância. Nitritos (NO_2^-) são sais ou ésteres do ácido nitroso (HNO_2), a sua estrutura é constituída por um átomo de nitrogénio ligado a dois átomos de oxigénio, com carga negativa e geometria angular ($\sim 115^\circ$). Como é visível na figura 1, a principal diferença entre nitratos e nitritos são que o nitrato (NO_3^-) tem três oxigénios ligados ao nitrogénio, enquanto nitrito (NO_2^-) tem dois oxigénios, que

influenciam as propriedades químicas, a reatividade e as vias de metabolização no organismo (Omar et al., 2012a; Serôdio, 2022).

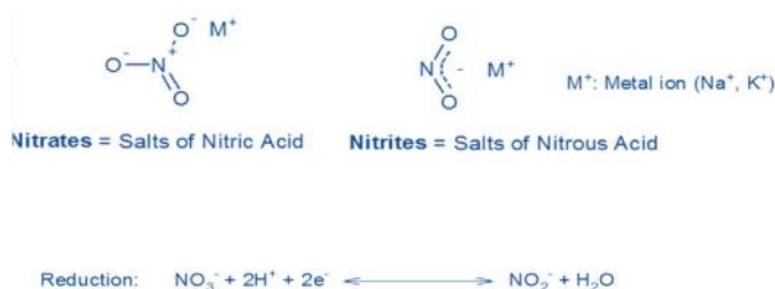


Figura 1. Estrutura química, atividade e relação dos nitratos/nitritos (Omar et al., 2012).

2.1.2. Efeito dos nitratos e nitritos em produtos cárneos

A adição de nitrato (NO_3^-) ou de nitrito (NO_2^-) à carne é prática comum para preservar as suas características sensoriais, microbiológicas e de segurança alimentar. O processo inicia-se com a conversão do nitrato em nitrito e, subsequentemente, do nitrito em óxido nítrico (NO), em meio ácido ($\text{pH} < 7$) e na presença de agentes redutores como o ácido ascórbico ou eritorbato. O NO liga-se à mioglobina, originando a nitrosomioglobina, pigmento responsável pela cor vermelha estável. Durante a cozedura, esta converte-se em nitrosomocromogénio, que confere a cor rosa típica dos produtos curados (Shakil et al., 2022).

O nitrito é um aditivo multifuncional, fundamental na cor da indústria cárnea, garantindo uma tonalidade rosa ou vermelha característica das carnes curadas, através da formação de nitrosilmioglobina, pigmento estável ao calor e à luz, preservando o aspeto atrativo do produto durante armazenamento e cocção. Atua diretamente no sabor e aroma, através de compostos nitrogenados, e indiretamente, ao inibir a oxidação lipídica de ácidos gordos insaturados, prevenindo rancificação e preservando o aroma característico, mantendo sabor, aroma e valor nutricional.

O nitrito possui forte ação antimicrobiana, inibindo microrganismos patogénicos e deteriorantes. Destaca-se o seu papel na prevenção do crescimento de *Clostridium botulinum* e da produção da toxina botulínica (altamente letal), por inibição de enzimas respiratórias dependentes de ferro e alteração da permeabilidade celular. Também atua contra *Listeria monocytogenes*,

Clostridium perfringens, *Bacillus cereus* e *Salmonella* (Lee et al., 2018; Nikolova & Belichovska, 2024). A sua eliminação total comprometeria a segurança microbiológica, tornando essencial encontrar um equilíbrio entre eficácia tecnológica e a segurança do consumidor (Honikel, 2008).

Apesar dos benefícios, o nitrito pode originar N-nitrosaminas, compostos potencialmente cancerígenos. Contudo, a ingestão proveniente da carne é relativamente baixa, já que a maior parte provém de vegetais e da saliva. Mesmo assim, a indústria procura reduzir a sua utilização. Os limites legais variam entre países, sendo que na União Europeia o máximo permitido é de 150 ppm de nitrito de sódio. No entanto, os níveis residuais nos produtos finais são geralmente muito inferiores, diminuindo a exposição efetiva do consumidor a estes produtos químicos (Nikolova & Belichovska, 2024).

Diversos estudos confirmam os efeitos do nitrito na carne, nomeadamente: Bozkurt & Erkmén (2004), ao estudarem a linguiça turca fermentada (*sucuk*), observaram que a adição de nitrito/nitrato favoreceu a formação de nitrosomioglobina, atingindo o máximo aos 12 dias de maturação, além de reduzir a flora microbiana indesejada e melhorar a qualidade sensorial. De forma semelhante, Aksu et al. (2016), ao testarem concentrações de 150, 90, 70 e 50 ppm, verificaram que, a adição de 150 ppm proporcionaram melhor controlo microbiano, menores valores de oxidação lipídica (TBARS) e maior intensidade da cor vermelha (a^*), com efeito antimicrobiano mais evidente. Marco et al. (2006), num estudo sobre linguiça cantonesa, concluíram que a concentração de 90 mg/kg foi a mais eficaz para equilibrar segurança microbiológica e qualidade físico-química e sensorial, sugerindo que reduções moderadas são viáveis, quando associadas a outros parâmetros tecnológicos. Por sua vez, Lee et al. (2018) demonstraram que concentrações inferiores a 60 - 70 ppm podem ser insuficientes para assegurar a segurança, a menos que sejam aplicadas medidas complementares, como redução do pH, maior teor de sal ou a adição de agentes antimicrobianos naturais, como o lactato de sódio.

O nitrito é essencial na produção de carnes processadas, garantindo segurança microbiológica, desenvolvimento de cor característica e estabilidade oxidativa. Contudo, devido aos riscos associados à formação de N-nitrosaminas, a tendência é para a redução controlada das concentrações, desde que associada

a estratégias complementares que assegurem a proteção contra microrganismos patogénicos.

2.1.3. Riscos para a saúde

O uso de nitrito em carnes processadas levanta preocupações de saúde pública, sobretudo pela formação de N-nitrosaminas, compostos reconhecidamente carcinogénicos. Estas resultam da reação do nitrito com aminas secundárias presentes na carne, principalmente em condições de elevada temperatura (fritura, fumagem intensa) ou pH ácido (como no estômago). A formação é favorecida por níveis elevados de nitrito residual, processos térmicos prolongados e baixa presença de antioxidantes como a vitamina C. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) classifica as carnes processadas como carcinogénicas para humanos, associando o seu consumo regular ao aumento do risco de cancro colorretal (Shakil et al., 2022).

Outro risco é a meta-hemoglobina, condição em que o ferro da hemoglobina (Fe^{2+}) é oxidado em Fe^{3+} , originando meta-hemoglobina incapaz de transportar oxigénio. Esta condição, conhecida como “síndrome do bebé azul”, ocorre sobretudo em lactantes com menos de 6 meses, devido à baixa maturidade das enzimas redutoras que reconvertem a meta-hemoglobina em hemoglobina funcional. Os casos estão frequentemente associados à ingestão de altos níveis de nitrato na água potável ou vegetais, uma vez que o nitrato é convertido em nitrito no organismo (Omar et al., 2012b).

Apesar destes riscos, os níveis residuais de nitrito nos produtos finais são geralmente muito inferiores aos valores adicionados inicialmente, devido à sua degradação durante a cocção, armazenamento e reações químicas. Esta diferença é fundamental na definição dos limites legais. Assim, a concentração utilizada deve garantir a eficácia tecnológica ao longo da vida útil do produto, mas sem exceder os níveis de segurança.

Para mitigar os efeitos adversos, a indústria recorre a estratégias como a adição de antioxidantes (ex.: vitamina C), o controlo de condições de processamento e a utilização de substitutos naturais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reforça que o consumo regular de carnes processadas está associado a maior

risco de doenças crônicas, incluindo cancro colorretal, sendo essencial o cumprimento rigoroso dos limites legais e a adoção de medidas preventivas (Honikel, 2008; Nikolova & Belichovska, 2024).

2.1.4. Substitutos naturais do nitrito em produtos cárneos

Estudos recentes têm explorado a utilização de agentes naturais de cura como alternativa ao nitrito sintético em produtos cárneos. Jin et al. (2018) avaliaram pó de aipo, extratos de frutas e vegetais em linguças com e sem nitrito durante 4 semanas de armazenamento em refrigeração, demonstrando que esses agentes naturais podem manter as propriedades físico-químicas e microbiológicas desejáveis, substituindo parcialmente o nitrito sintético. Lee et al. (2018) destaca que, as alternativas naturais, como extratos de aipo ou especiarias (sálvia, noz-moscada, cravo), possuem potencial antimicrobiano, embora sejam menos eficazes contra *Clostridium botulinum*, do que o nitrito purificado, sendo necessários estudos adicionais para comprovar segurança equivalente. A redução do nitrito adicionado diretamente como aditivo químico de origem industrial é viável, mas a substituição total apresenta ainda desafios, principalmente na manutenção de cor, sabor e proteção contra *C. botulinum*. Algumas estratégias envolvem o uso de vegetais ricos em nitrato (aipo, beterraba, espinafre, acelga), que podem ser convertidos em nitrito por ação microbiana durante a cura, permitindo a rotulagem como “natural” ou “sem conservantes artificiais”. Além disso, a combinação com antioxidantes naturais (ácido ascórbico, vitamina C, eritorbato) ajuda a reduzir a formação de N-nitrosaminas, competindo com as aminas pela reação com o nitrito. Tecnologias combinadas como a redução do pH via fermentação, controle da atividade de água (secagem ou adição de sal), atmosfera modificada ou embalagem em vácuo permitem reduzir a quantidade de nitrito sintético, mantendo a segurança microbiológica e estabilidade do produto (Shakil et al., 2022).

2.2. Perigos microbiológicos associados a produtos cárneos processados

Produtos cárneos processados estão sujeitos a diversos perigos microbiológicos, que podem comprometer a segurança alimentar e causar doenças transmitidas por alimentos. Esses perigos podem surgir durante a produção, manipulação, transporte, armazenamento ou consumo. Segundo a EFSA (2024), carne e produtos cárneos representaram uma proporção significativa das notificações de surtos de origem alimentar na UE, destacando-se carne de aves, suínos, bovinos e produtos derivados. Os agentes mais frequentemente implicados são *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* produtora de toxina *Shiga* (STEC), entre outros também relevantes como o *Clostridium botulinum* e *S. aureus* por exemplo.

2.2.1. *Listeria monocytogenes*

A listeriose é uma doença de baixa incidência, mas elevada letalidade, afetando particularmente grávidas, recém-nascidos, idosos e imunodeprimidos (pessoa com o sistema imunitário fragilizado). A contaminação ocorre principalmente pelo consumo de alimentos prontos a consumir (RTE) contaminados, como carnes curadas, enchidos e produtos refrigerados, que permitem a sobrevivência e multiplicação da bactéria, mesmo em condições mais adversas (refrigeração, altos níveis de sal). São necessárias aplicar medidas de controlo eficazes, nomeadamente boas práticas de higiene na produção e abate, o cumprimento rigoroso das temperaturas de armazenamento e a aplicação de sistemas de gestão de segurança alimentar, como o HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*).

Em 2023, na UE, foram confirmados 2 738 casos de listeriose, com 1 497 hospitalizações e 335 mortes, a maioria em pessoas acima de 65 anos. Portugal registou ≤ 10 casos confirmados, mantendo elevada letalidade (~13%). A epidemiologia mostra que a maioria dos casos humanos é esporádica e raramente rastreada até uma fonte alimentar específica (EFSA Journal, 2024; Manuela & Almeida, 1996).

2.2.2. Campylobacter spp

A campilobacteriose é atualmente a zoonose mais notificada na UE, transmitida principalmente pelo consumo de carne de aves mal cozida ou por contaminação cruzada. A bactéria é sensível ao sal, fumo e calor, tornando o risco menor em produtos de porco processados, mas ainda presente em carnes cruas ou mal cozidas (*Campylobacter coli*).

Dados de 2023 indicam 148 181 casos confirmados na UE, com 247 surtos atribuídos a *Campylobacter*, tornando-o o terceiro agente mais comum em surtos alimentares. A bactéria apresenta forte sazonalidade, com aumento no verão, associada à temperatura e, possivelmente a alterações climáticas. Animais como frangos, suínos e bovinos são reservatórios importantes, com taxas de incidência até 60 % em suínos de engorda. Em Portugal foram registados 265 casos confirmados (EFSA Journal, 2024).

2.2.3. Salmonella spp.

A salmonelose é a segunda zoonose mais reportada na UE e uma das principais causas de surtos alimentares. A infeção está associada principalmente a ovos e produtos derivados, mas também pode ocorrer em carne de porco e produtos curados, quando há falhas de higiene ou processamento insuficiente.

Em 2023, a UE registou 65 208 casos confirmados, com 1 013 surtos alimentares atribuídos a *Salmonella*, representando 18% de todos os surtos. A variedade *Salmonella Enteritidis* foi a mais prevalente. Em Portugal foram confirmados 337 casos (EFSA Journal, 2024).

2.2.4. Escherichia coli

A *Escherichia coli* é normalmente indicadora de contaminação fecal, e muitas das estirpes presentes em alimentos não são consideradas patogénicas. No entanto, existem estirpes de *E. coli* de grande virulência. A *E. coli* produtora de toxina *Shiga* (STEC), por exemplo, é um grupo de microrganismos patogénicos com capacidade para produzir toxinas *Shiga*, responsáveis por efeitos citotóxicos relevantes para a saúde humana. As infeções por STEC podem

causar gastroenterite, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urémica (SHU), condição potencialmente fatal, especialmente em populações vulneráveis.

De acordo com o relatório da EFSA, em 2023, foram reportados 10 217 casos de infeções por STEC na União Europeia, representando uma taxa de 3,1 casos por 100 000 habitantes. Este valor representa um aumento de 30 % em comparação com o ano anterior (EFSA Journal, 2024).

2.2.5. *Clostridium botulinum*

O botulismo é uma intoxicação rara mas extremamente grave, causada pela toxina produzida por *Clostridium botulinum*, que provoca paralisia flácida progressiva e pode ser fatal sem tratamento imediato. O risco está associado a conservas caseiras, produtos fermentados ou enchidos artesanais mal processados, devido à ausência de controlo de sal, nitratos/nitritos e condições de conservação.

Em 2023 foram reportados 17 casos de botulismo humano na UE, com 3 surtos relacionados. Nenhum caso foi registado em Portugal. Apesar da baixa incidência, o botulismo permanece sob forte vigilância devido à sua elevada gravidade clínica e potencial de surtos significativos (EFSA Journal, 2024).

3. Caracterização da empresa

O presente estudo foi desenvolvido numa empresa localizada na região norte de Portugal, especializada no abate, desmancha e processamento de carnes, em particular a carne de suíno. Fundada em 1974, a empresa conta atualmente com mais de 200 colaboradores e dispõe de instalações equipadas para garantir elevados padrões de qualidade, higiene e segurança alimentar.

A sua atividade comercial passa pela comercialização de produtos transformados, incluindo produtos curados, enchidos e fumados, fornecendo serviços à distribuição alimentar, talhos e à indústria alimentar. A empresa opera no comércio local, mas também para a grande distribuição.

Com um forte foco na inovação e sustentabilidade, a empresa investe continuamente na melhoria dos seus processos e assegura o cumprimento rigoroso das normas legais e ambientais, contribuindo para o desenvolvimento económico da região norte de Portugal.

Toda a vertente laboratorial associada ao presente estudo foi realizada nos laboratórios da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, garantindo a aplicação de metodologias adequadas e normas em vigor.

3.1. Caracterização dos produtos

3.1.1. Chouriço carne corrente colorau

O chouriço de carne corrente colorau é um enchido fumado, composto por carne e gordura de suíno, fragmentadas em dimensões superiores a 2 cm, e enriquecido com condimentos e aditivos alimentares. A sua formulação inclui carne e gordura de suíno, proteína de soja, água, carne separada mecanicamente de suíno, massa de pimentão (pimentos, água e sal), sal refinado, mistura de especiarias, conservante (E250), emulsionantes (E451, E450, E452), alho em pó (contendo sulfitos) e antioxidante (E316).

A conservação deve ser efetuada em local seco e fresco, e o transporte realizado em veículos equipados com caixa isotérmica adequada, mantendo uma temperatura entre 0 e 5 °C.



Figura 2. Chouriço de carne corrente colorau com a formulação atual (CA) e Chouriço de carne corrente colorau com a formulação redução (CR).

Na figura 2 apresenta-se à esquerda o chouriço de carne corrente de colorau com a formulação atual (CA), que apresenta 0,25 % de sal nitrificante e 1,29 % do conservante “Sal”. E do lado direito a formulação com redução de nitritos (CR), correspondendo a 0,15 % de sal nitrificante e 1,39 % do conservante “Sal”. O sal nitrificante apresenta 5 % de nitrito de sódio.

3.1.2. Fiambre da Perna

O fiambre da perna é obtido a partir da perna de suíno desprovida de ossos, cartilagens, tendões, ligamentos isolados e coágulos sanguíneos. Após tratamento em salmoura, o produto é prensado e submetido a tratamento térmico. Pode apresentar ou não courato numa das suas superfícies.

A sua composição inclui perna de suíno (57,1 %), água, sal, proteína de soja, açúcar, emulsionante (E451, E450), maltodextrina, gelificantes (E407, E407a, E415, E471), antioxidantes (E316, E331), intensificadores de sabor (E621, E627, E631), aromas, lactose, dextrose e conservante (E250).

O fiambre deve ser conservado em ambiente refrigerado ($0\text{ }^{\circ}\text{C} \leq T \leq 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e transportado em viatura com caixa isotérmica adequada.

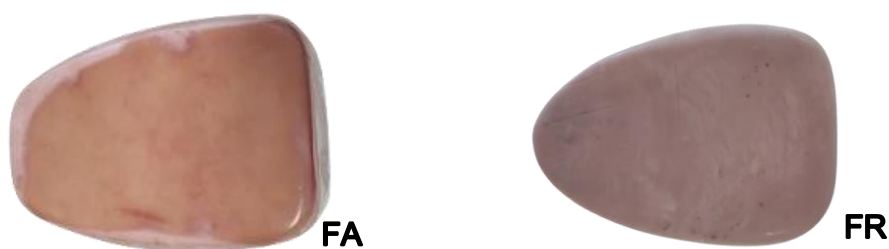


Figura 3. Fiambre da perna com a formulação atual (FA) e Fiambre da perna com a formulação redução (FR).

Na figura 3 apresenta-se à esquerda o fiambre da perna com a formulação atual (FA), que apresenta 0,30 % de sal nitrificante e 1,20 % do conservante “Sal”. E do lado direito a formulação com redução de nitritos (FR), os valores correspondem a 0,15 % de sal nitrificante e 1,34 % do conservante “Sal”. O sal nitrificante apresenta 5 % de nitrito de sódio.

3.1.3. Bacon Extra

O bacon extra é constituído por entremeada de suíno com courato, desossada individualmente, apresentando dimensões aproximadas de 50 cm de comprimento por 20 cm de largura. O produto é tratado em salmoura, submetido a tratamento térmico e aplicação de fumo.

A sua composição inclui entremeada de suíno, água, sal refinado, dextrose, emulsionante (E451), antioxidante (E316), conservante (E250), aroma de fumo e hemoglobina.

A conservação deve ser efetuada em local seco e fresco, com transporte em veículo com caixa isotérmica, mantendo temperatura entre 0 e 5 °C.



Figura 4. Bacon extra com formulação atual (BA) e Bacon extra com a formulação redução (BR).

Na figura 4 apresenta-se à esquerda o bacon extra com a formulação atual (BA), com 0,08 % de sal nitrificante e 2.16 % do conservante “Sal”. E do lado direito a formulação com redução de nitritos (BR), os valores correspondem a 0.05 % de sal nitrificante e 2.19 % do conservante “Sal”. O sal nitrificante apresenta 15 % de nitrito de sódio.

3.2. Processo produtivo por produto

3.2.1. Chouriço de carne corrente de colorau

Na figura 6 está representado o processo produtivo do chouriço de carne corrente colorau que se inicia com a receção e seleção da carne e gordura, seguida da pesagem da matéria-prima (carne e gordura) e dos ingredientes, bem como da preparação da mistura. A matéria-prima deve ser mantida a uma temperatura entre 0 e 5 °C.

Posteriormente, a carne é processada através de picagem em picadoras, seguida da mistura inicial das matérias-primas com os ingredientes. Segue-se o enchimento, realizado em tripas e efetuado mecanicamente. Após o enchimento, realiza-se a deteção de metais e o tratamento térmico inicial, com 3 h 30 de secagem até que a temperatura interna do produto atinja 69 °C.

O processo prossegue com a fumagem tradicional durante 12 horas, utilizando madeira não resinosa, seguida da secagem em câmara de climatização (figura 5). Posteriormente, o produto é cortado manual ou mecanicamente, embalado a vácuo e submetido a túnel de retração. O armazenamento é efetuado em local

seco e fresco, após o que ocorre a pesagem, rotulagem, acondicionamento em caixas e expedição.



Figura 5. Chouriço de carne corrente colorau em câmara de climatização.

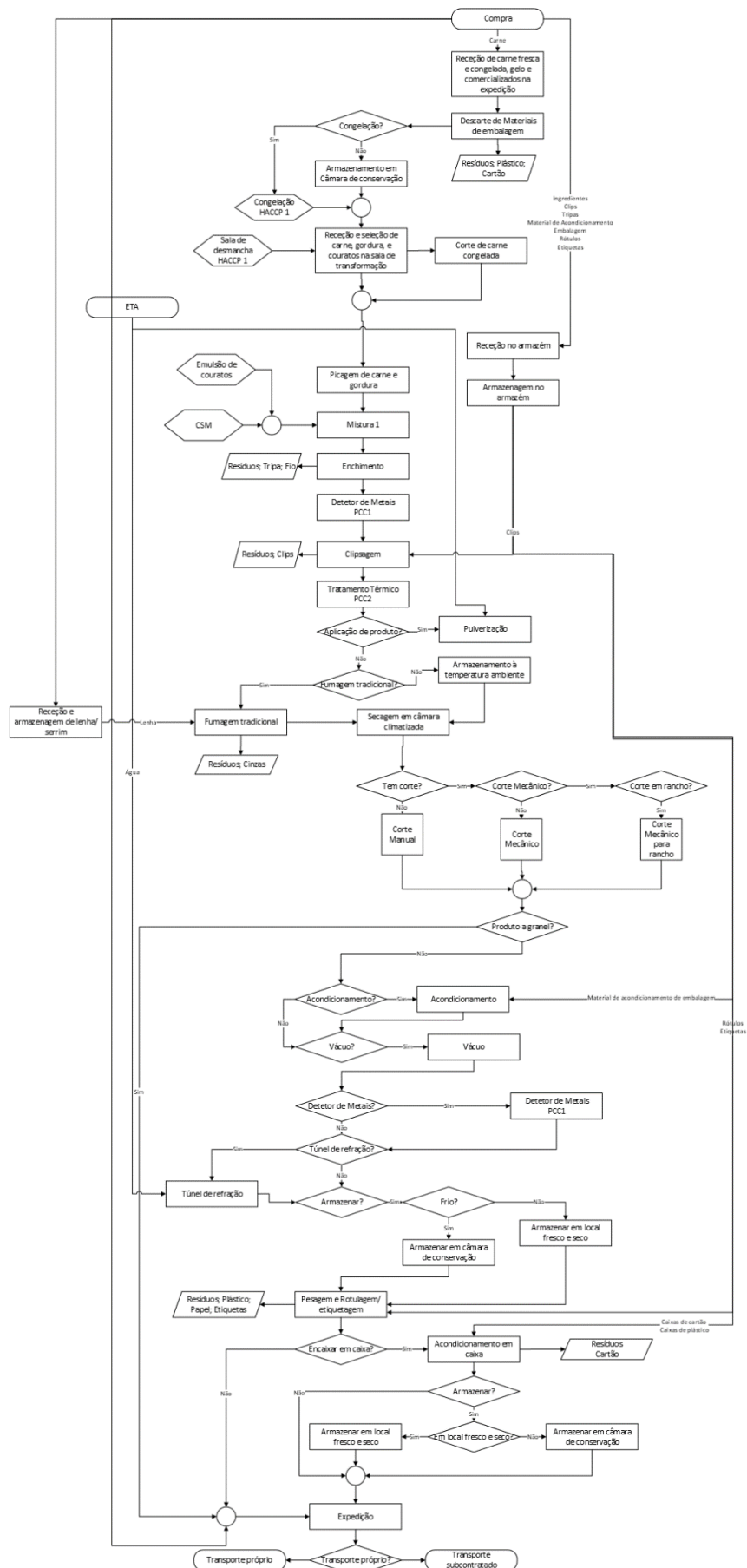


Figura 6. Fluxograma do processo produtivo do chouriço carne corrente colorau.

3.2.2. Fiambre da perna

Na figura 8 está representado o processo produtivo do fiambre da perna que se inicia com a receção e seleção da carne e couratos, seguida da pesagem da carne e dos ingredientes. Aplica-se, seguidamente a injeção de salmoura com agulhas (figura 7a), tenderização (amaciamento da carne) (figura 7b) e massagem em bombo durante 20 horas, em câmaras de conservação, com temperaturas entre 0 °C a 5 °C.

O enchimento (figura 7c) é realizado com ou sem courato (lavado e raspado manualmente), seguido da deteção de metais e clipsagem a vácuo, podendo ser aplicada retração por banho à temperatura de 65 a 70 °C. O produto é então enformado e prensado (figura 7d), seguido do tratamento térmico, com cozedura a vapor durante 3 h 30 até que a temperatura interna atinja 69 °C.

Após o tratamento térmico, o fiambre é colocado em câmara de arrefecimento rápido, seguindo-se a desenformagem e colocação em câmara de armazenamento (figura 7e), pesado, rotulado, acondicionado e expedido, com transporte realizado por via própria ou subcontratada com temperaturas entre 0 a 5 °C.



Figura 7. Processo produtivo do fiambre da perna: salmoura (a), injeção (b), enchimento (c), moldagem (d), armazenamento em câmara de refrigeração (e).

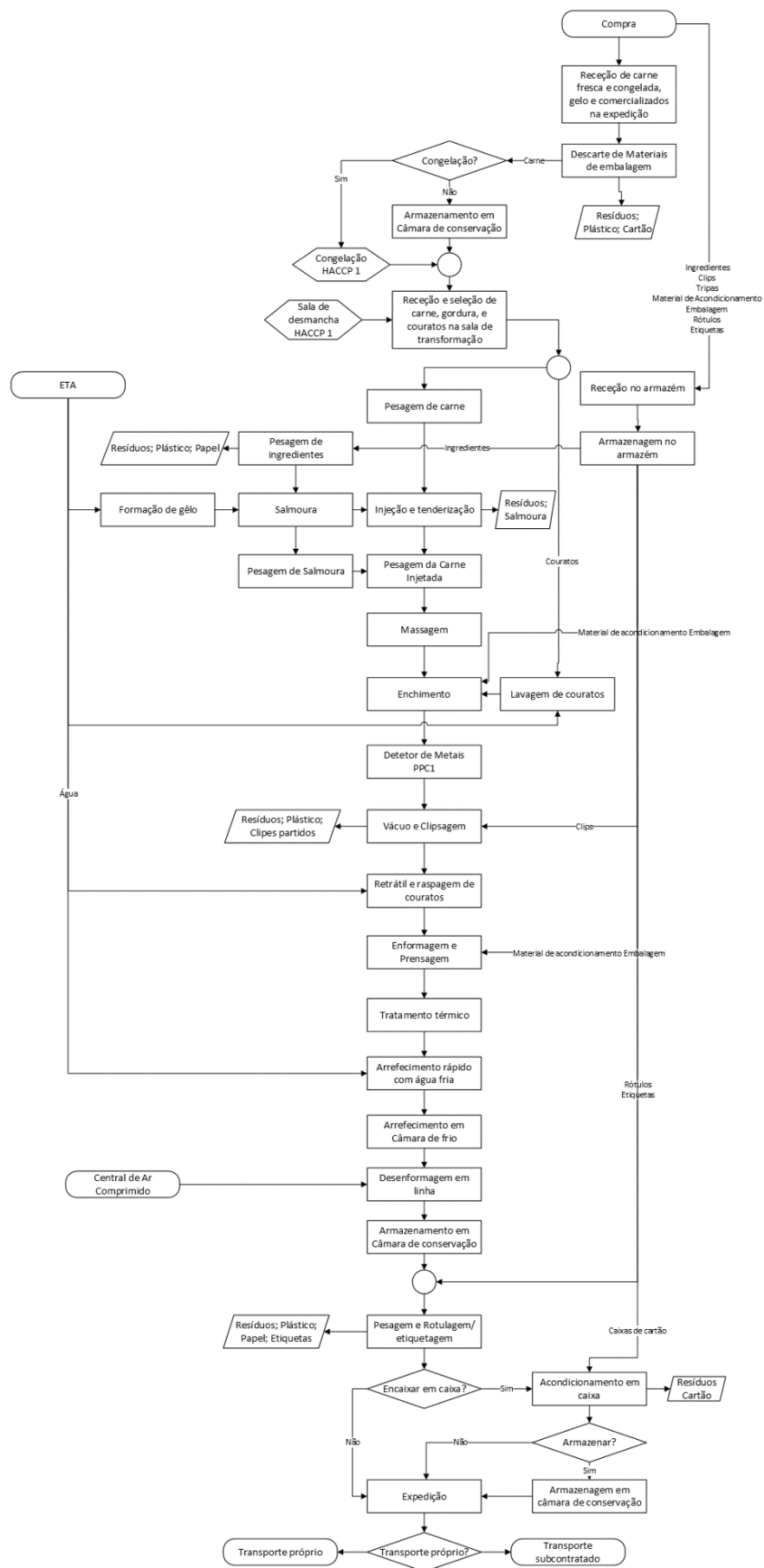


Figura 8. Fluxograma do processo produtivo do fiambre da perna.

3.2.3. Bacon extra

Na figura 10 está representado o processo produtivo que inicia-se com a receção e seleção da carne, seguida da pesagem da barriga de porco (com gordura e músculo) e dos ingredientes, e preparação da salmoura. A injeção da salmoura e a massagem no bombo duram aproximadamente 20 horas, seguidas de repouso e maturação, com temperaturas entre 0 a 5°C.

As peças são suspensas em ganchos, sendo colocado o fio (figura 9a), antes do tratamento térmico inicial, que inclui secagem em estufa por 3 horas a 80 °C, com 2 h 40 de fumagem elétrica, garantindo que a temperatura interna do produto alcance 69 °C. Segue-se a secagem em câmara de estabilização (figura 9b), corte manual, embalagem primário (figura 9c), deteção de metais e túnel de retração (figura 9d).

Os produtos são armazenados em local seco, pesados, rotulados, acondicionados em caixas e expedidos, com transporte realizado por via própria ou subcontratada, com temperaturas aceitáveis de 0 a 5°C.



Figura 9. Processo produtivo do bacon extra: peças são suspensas antes do tratamento térmico inicial (a), câmara de estabilização (b), embalagem primário (c), e túnel de retração (d).

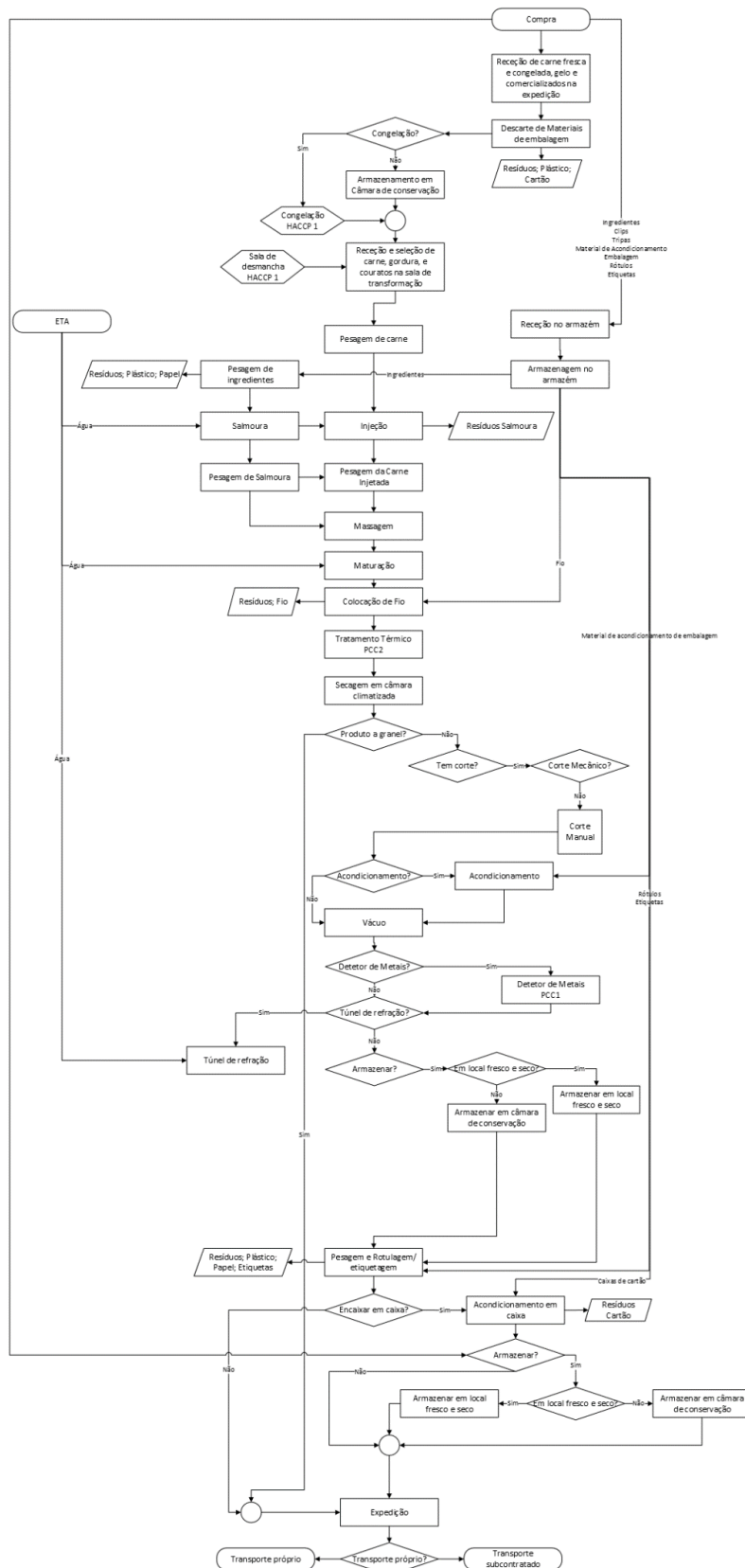


Figura 10. Fluxograma do processo produtivo do bacon extra.

4. Materiais e Métodos

Neste estudo avaliaram-se seis produtos processados com duas formulações: formulação atual (A) e formulação com redução de nitritos adicionados (R) em chouriço de carne corrente, fiambre da perna e bacon extra durante 120 dias. Analisaram-se parâmetros microbiológicos e físico-químicos ao longo de 0, 60 e 120 dias e 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias, respetivamente. A amostragem foi realizada, sempre, em triplicado. A tabela 1 descreve as análises realizadas aos 3 produtos ao longo do período de conservação.

Tabela 1. Análises realizadas aos 3 produtos: chouriço carne corrente colorau, fiambre da perna e bacon extra, nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias.

Análises realizadas	Tempo (dias)					
	0	15	30	60	90	120
Quantificação de Microrganismos a 30°C (UFC/g)	X			X		X
Quantificação <i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	X			X		X
Quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	X			X		X
Quantificação de estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	X			X		X
Deteção e quantificação Esporos Clostridio Sulfitoredutores (UFC/g)	X			X		X
Deteção de <i>Listeria monocytogenes</i> (Presente ou ausente em 25 g)	X			X		X
Deteção de <i>Salmonella spp.</i> (Presente ou ausente em 25 g)	X			X		X
Deteção de <i>Campylobacter spp.</i> (Presente ou ausente em 10 g)	X			X		X
pH	X	X	X	X	X	X
Atividade da água	X	X	X	X	X	X

Parâmetros de cor (L, a*, b*)	X	X	X	X	X	X
Textura ¹	X	X	X	X	X	X
Humidade (%)	X	X	X	X	X	X
Cinza (%)	X	X	X	X	X	X
Cloretos (%)	X	X	X	X	X	X
Proteínas (%)	X	X	X	X	X	X
Gorduras (%)	X	X	X	X	X	X
Nitratos (mg/kg)	X	X	X	X	X	X
Nitritos (mg/kg)	X	X	X	X	X	X
Fósforo (mgP/100g)	X	X	X	X	X	X

¹ Chouriço de carne corrente: Fraturabilidade (Newton) e Dureza (Newton); Fiambre da perna e Bacon extra: Fraturabilidade (Newton), Dureza (Newton), Elasticidade, Gomosidade (Newton) e Mastigabilidade (N/mm).

Para uniformizar a identificação das amostras, o tempo de armazenamento foi codificado de acordo com a seguinte numeração: 0 = 0 dias (tempo inicial), 1 = 15 dias, 2 = 30 dias, 3 = 60 dias, 4 = 90 dias e 5 = 120 dias. A designação de cada amostra resulta da combinação da sigla da formulação do produto e do tempo de armazenamento. Por exemplo, CA2 corresponde ao chouriço com formulação atual (125 mg/kg) após 30 dias de armazenamento, enquanto FR4 designa o fiambre com formulação reduzida (75 mg/kg) após 90 dias de conservação. No caso específico do chouriço de carne corrente de colorau, as massas iniciais (antes do enchimento) foram identificadas como CA-2 e CR-2 (2 dias antes do enchimento).

4.1. Desenho experimental

Foram analisados três produtos cárneos processados ao longo de um período de 120 dias de armazenamento, sob condições previamente definidas nas fichas técnicas dos produtos. O fiambre da perna foi conservado em ambiente

refrigerado (entre 0 e 7 °C), enquanto o chouriço de carne corrente de colorau e o bacon extra foram conservados em local seco e fresco.

Cada produto foi processado em duas formulações distintas, variando a concentração de nitritos adicionados. As formulações foram identificadas com códigos, da seguinte forma: Chouriço de carne corrente de colorau: CA (125 mg/kg) e CR (75 mg/kg), Fiambre da perna: FA (149 mg/kg) e FR (75 mg/kg), Bacon extra: BA (120 mg/kg) e BR (75 mg/kg).

Ao longo do período experimental, foram analisados parâmetros microbiológicos e físico-químicos, permitindo avaliar a evolução da qualidade e estabilidade de cada produto, em função do tempo de conservação e da formulação aplicada.

Os resultados obtidos e a discussão foram efetuados para cada produto analisado. A análise de componentes principais (ACP) foi realizada utilizando a função Autobiplot.PCA incorporada na linguagem R (Alves, 2011). Os parâmetros avaliados foram identificados pelos seguintes códigos: quantificação de microrganismos a 30 °C = logUFC, pH = pH, atividade da água = aw, parâmetros de cor: L = L; a* = a; b* = b, textura: dureza = Dur, fraturabilidade = Frat, mastigabilidade = Mast, gomosidade = Gom, coesividade = Coes, elasticidade = Elast, humidade = Hum, cinza = Cinz, cloretos = Clor, proteínas = Prot, gorduras = Gord, nitratos = Nitra, nitritos = Nitri e fósforo = Fósfo.

4.2. Análises microbiológicas

A conservação, manipulação, preparação, preparação da suspensão-mãe e respetivas diluições das amostras, bem como a expressão dos resultados, foram efetuadas de acordo com as normas ISO 7218:2024 e ISO 6887-1:2017/Amd 1:2024 (ISO 7218, 2024)(ISO 6887, 2017).

4.2.1. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A deteção de *Salmonella* spp. foi realizada segundo a norma ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020. Realizou-se um pré-enriquecimento de 25 g de amostra em 225 g de APT (água peptonada tamponada, Merck ref. 1.07228) com a temperatura de incubação de 37°C durante 18 ± 2 h, seguida de uma repicagem

para meios de enriquecimento seletivo de *MKTTn* (*Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin both*, Biokar Diagnostics ref. BK169) e RVS (*Rappaport-Vassiliadis médium with soya*, Biokar Diagnostics ref. BK148) que são incubados durante 24 ± 3 h, à temperatura de 37 ± 1 °C e 41.5 ± 1 °C, respetivamente. Após o segundo enriquecimento, procedeu-se ao isolamento em meios seletivos de ChromID Salmonella Agar (SM2, Biomérieux ref.424326) e Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD, Biokar Diagnostics ref.BK168), seguida de incubação à temperatura de 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 h. Em virtude da não deteção de colónias típicas nos meios ChromID Salmonella Agar nem Xylose Lysine Deoxycholate agar, não houve necessidade de realizar testes bioquímicos e serológicos confirmatórios. Os resultados são expressos em “presente” ou “ausente” em 25g (ISO 6579, 2020).

4.2.2. Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores

A pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores, foi realizada de acordo com a ISO15213-1:2023, onde se procedeu a uma inativação térmica das eventuais células vegetativas num volume de 10 mL de amostra, à temperatura de 80 °C durante 10 ± 1 minutos. Seguiu-se um arrefecimento da temperatura até 20 °C. Esse volume foi posteriormente distribuído por 3 placas de 120 mm e incorporado em meio de cultura ISA (*Iron sulfite agar*). A incubação foi realizada em anaerobiose a 37 °C durante 48 ± 2 h. Os resultados são expressos em UFC/g, sendo o limite de deteção de 1 UFC/g (ISO 15213-1, 2023).

4.2.3. Quantificação de *Escherichia coli*

A quantificação de *Escherichia coli*, foi realizada segundo a norma ISO 16649-2:2001, tendo-se incorporado em placa de Petri, 1 mL de cada diluição decimal em meio de cultura *Tryptone-bile-glucuronic medium* (TBX Chromocult Agar, VWR ref.84637). As placas foram incubadas à temperatura de 44 °C durante 18 a 24 h. Os resultados são expressos em UFC/g, sendo o limite de deteção de 10 UFC/g (ISO 16649-2, 2001)

4.2.4. Quantificação de Microrganismos a 30°C

A quantificação dos microrganismos aeróbios mesófilos foi realizada de acordo com a norma ISO 4833-1:2013/Amd 1:2022. Foi incorporado em placa de Petri, 1 mL de cada diluição decimal em meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA, Oxoid ref.CM0325). A incubação foi realizada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 ± 3 h. Os resultados são expressos em UFC/g, sendo o limite de detecção de 10 UFC/g (ISO 4833, 2022).

4.2.5. Quantificação de *Enterobacteriaceae*

A quantificação das *Enterobacteriaceae* foi realizada segundo a norma ISO 21528-2:2017, tendo-se incorporando em placa de Petri, 1 mL de cada diluição decimal em meio *Violet Red Bile Glucose* (VRBG, Biokar Diagnostics ref.BK011) seguido do *overlay* das placas. A incubação foi realizada à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. O procedimento inclui a confirmação das colónias típicas de *Enterobacteriaceae* (colónias roxas). Contudo não houve necessidade de realizar procedimentos confirmatórios pois não foram detetadas colónias típicas. Os resultados são expressos em UFC/g, sendo o limite de detecção de < 10 UFC/g (ISO 21528-2, 2017).

4.2.6. Quantificação de estafilococos coagulase positiva

A quantificação de estafilococos coagulase positiva foi realizada segundo a norma ISO 6888-1:2021/Amd 1:2023, por espalhamento à superfície de 1 mL (placa de Petri com 150mm de Ø) e 0,1 mL (placa de Petri de 90mm de Ø) da suspensão inicial, em placas de Petri, contendo o meio *Baird-Parker agar médium* (BPA, VWR ref.84664). As placas foram incubadas à temperatura de 37°C , durante 48 ± 2 h. A confirmação da presença de coagulase de colónias típicas (colónias pretas com halo de precipitado) e atípicas (colónias pretas) foi realizada em meio BPA base suplementado com Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF, Oxoid ref.SR0122). Os resultados são expressos em UFC/g, sendo o limite de detecção de < 10 UFC/g (ISO 6888-1, 2023).

4.2.7. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada de acordo com norma ISO 11290-1:2017, tendo-se pré-enriquecido 25 g da amostra em 225 g de caldo *Half-Fraser broth* (HFB, VWR ref.84611; Fraser sup. VWR ref.84720) à temperatura de incubação de 30 ± 1 °C durante 24 a 26 h, seguida de uma repicagem para meio completo de *Fraser broth* (FB) incubado durante 24 ± 2 h, à temperatura de 37 ± 1 °C.

Após enriquecimento, procede-se ao isolamento a partir de meios HFB e FB em meios sólidos de ALOA (VWR ref. 84748) e PALCAM (VWR, ref.84625), incubados à temperatura de 37 ± 1 °C durante 48 ± 2 h. Sempre que ocorreu crescimento de colônias típicas, foram confirmadas 5 colônias presuntivas típicas (azul-esverdeado com ou sem halo em ALOA, verde azeitona com halo preto em PALCAM) repicando para meio *Trytone Soya Yeast Agar* (TSEYA, meio composto) e incubação a 37 °C durante 18 a 24 h. Para efeitos de confirmação foi realizado o teste da catalase, o *CAMP test* (Columbia Sangue COS, Biomérieux ref.43041), e a prova de fermentação xilose (Scharlau Chemie, ref.XI0080) e ramnose (TCI, Ref. 15900000R001307). Os resultados são expressos em presente ou ausente em 25 g (ISO 11290-1, 2017).

4.2.8. Pesquisa de *Campylobacter*

A detecção de *Campylobacter spp.* foi realizada após uma etapa de enriquecimento em meio Preston, conforme especificado na norma ISO 10272-1:2017. Foram pesados assepticamente 10 g de amostra em sacos de homogeneização estéreis, aos quais se adicionaram 90 g de meio Preston, totalizando 100 g. A incubação foi efetuada sob condições de microaerofilia, a 41,5 °C, durante 24 horas, utilizando uma estufa Memmert (Alemanha) em conformidade com método normalizado (ISO 10272-1, 2023). Após a etapa de enriquecimento a pesquisa foi realizada por detecção de genes específicos por PCR (Polymerase Chain Reaction) como a seguir se descreve e com base em método publicado por Lanzl et al. (2022).

4.2.8.1 Extração de DNA

A extração de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) seguiu o protocolo descrito na norma ISO 20837:2006. Após o enriquecimento, 1 mL da cultura foi transferido para microtubos de polipropileno e centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos (centrífuga Hettich, Alemanha). O *pellet* resultante foi lavado com tampão fosfato salino 0,01 M (pH 7,4), seguido de nova centrifugação nas mesmas condições. Em seguida, o *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de água estéril ultrapura e submetido a fervura em banho-maria durante 15 minutos. Os tubos foram imediatamente arrefecidos em gelo, agitados em vortex e novamente centrifugados a 10.000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante, contendo o DNA extraído, foi transferido para um novo microtubo e armazenado a 4 °C até à realização das reações de PCR.

4.2.8.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A detecção de DNA de *Campylobacter* spp. baseou-se no protocolo de Lanz et al. (2022). A identificação dos genes *cje* (*C. jejuni* e *C. coli*) e *mapA* (*C. jejuni*) foi realizada por PCR utilizando o sistema Biorad CFX96™ – Real-Time System. Foi efetuado um controlo de amplificação da região variável V3 do gene 16S rRNA usando primers V3 (Muyzer et al., 1993).

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 13 µL, contendo 6,5 µL de iTaq Supermix (BioRad, EUA), 3 µL de DNA e 50 pmol de cada primer. Foram realizadas 3 reações simplex. Uma reação de amplificação do gene *cej*, outra do gene *mapA* e outra (controlo interno) do gene V3, separadamente.

6,5 µL de iTaq Supermix

0,5 primer F (forward)

0,5 primer R (reverse)

1,5 H₂O +3 µL de DNA

As condições de amplificação foram:

- Desnaturação inicial a 95 °C, 10 minutos
- 40 ciclos de: 95 °C durante 60 s, 57 °C durante 30 s, 72 °C durante 15 s
- Extensão final a 72 °C durante 5 minutos

4.3. Análises Físico-químicas

4.3.1. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade foi determinado de acordo com a ISO1442:2023, colocando em caixas de Petri cerca de 20 a 30 g de areia tratada e uma vareta de vidro, e secagem em estufa a 103 ± 2 °C durante pelo menos 1 hora, arrefeceu-se em exsiccador e pesou-se o conjunto. Pesou-se 3 a 4 g de amostra para a caixa de Petri, aos quais se adicionaram 10 mL de etanol e misturou-se com vareta. Deixa-se o etanol evaporar e leva-se a secar na estufa a 103 ± 2 °C durante pelo menos 2 horas. Para finalizar, transferiu-se a caixa de Petri para exsiccador e pesou-se. Repetiu-se a colocação na estufa a 103 ± 2 °C durante pelo menos mais 2 horas. As análises foram realizadas em triplicado (ISO 1442, 2023). A percentagem de humidade foi obtida de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%H = \frac{\text{massa (conjunto * + amostra)} - \text{massa após secagem(conjunto *)}}{\text{massa antes da secagem(conjunto * + amostra)} - \text{massa antes da secagem(conjunto *)}} \times 100$$

(conjunto *= areia + caixa de Petri + vareta)

4.3.2. Determinação da atividade da água (a_w)

A atividade da água foi determinada usando um medidor de a_w da marca Novasina (modelo: AW Lab Set H). As amostras, em triplicado, foram colocadas nas cápsulas e procedeu-se à determinação da a_w , posicionando-as no equipamento e registando os valores obtidos, à temperatura ambiente (20 °C e 25 °C). As análises foram realizadas em triplicado.

4.3.3. Determinação do pH

O pH foi determinado usando um medidor de pH da CRISON pH 25+, previamente calibrado com três soluções padrão: pH 4,01; pH 7,00 e pH 9,21. O eletrodo foi inserido em três pontos distintos na amostra previamente triturada e homogeneizada e procedeu-se à sua medição e registo do valor. As análises foram realizadas em triplicado.

4.3.4. Determinação das cinzas

Foi calculado o teor de cinzas de acordo com a ISO 936:1998, onde se procedeu inicialmente à lavagem dos cadinhos com HCl a 10% (v/v).

Colocou-se o cadinho na mufla a 550 - 600 °C durante 30 minutos, arrefeceu-se e pesou-se. Colocou-se 4 a 5 g de amostra e adicionou-se 1 cm³ de acetato de magnésio a 15 %. Secou-se em estufa, carbonizou-se numa mufla a 550-600 °C, e pesou-se após arrefecimento. As análises foram realizadas em triplicado (ISO 936, 1998). A percentagem de cinza foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%Cinza = \frac{massa \text{ após secagem}(cadinho + amostra) - massa \text{ inicial}(cadinho)}{massa \text{ inicial}(amostra)} \times 100$$

4.3.5. Determinação da cor

Os parâmetros de cor foram medidos, para o chouriço de carne corrente, em círculos de 15 mm de espessura nas duas faces num ponto central (figura 11a). No caso do fiambre da perna (figura 11b) e o bacon extra (figura 11c), em fatias de 15 mm de espessura nas duas faces em 5 pontos distintos, e com recurso a um colorímetro CM-600d (Minolta Chroma Meter CR-400, Japan).

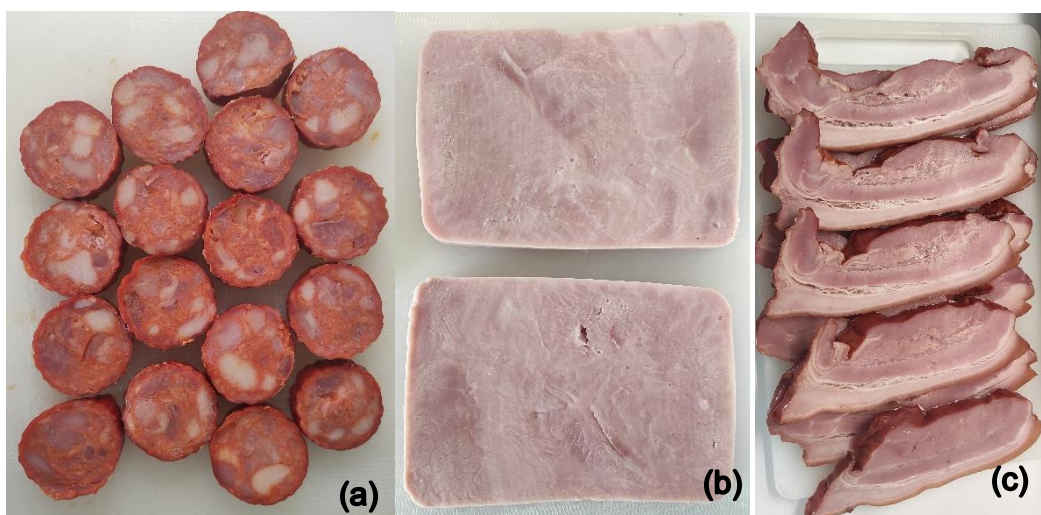


Figura 11- Chouriço de carne corrente colorau (a), fiambre da perna (b) e bacon extra (c).

Para estimar a cor da carne foi utilizado o sistema CIELAB e medidos os parâmetros de cor: luminosidade, L^* , vermelho, a^* , e amarelo, b^* . A partir dos dois últimos parâmetros, foram determinados os valores de C^* (saturação) e h^* (tonalidade), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$c^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

$$h^* = \arctan \frac{b^*}{a^*} \times \frac{180}{\pi}$$

Antes das leituras foi efetuada uma calibração com um cerâmico branco. As análises foram realizadas em cerca de 20 a 50 pontos distintos em cada amostra.

4.3.6. Determinação da textura

A avaliação da textura foi realizada utilizando um analisador de textura TAXT2i (*Stable Micro System*, Reino Unido), equipado com uma célula de carga de 50 kg. As amostras de chouriço de carne corrente foram cortadas em círculos (espessura de 15 mm) e submetidas a um teste de corte utilizando uma sonda Blade Set HDP/BS (figura 12).

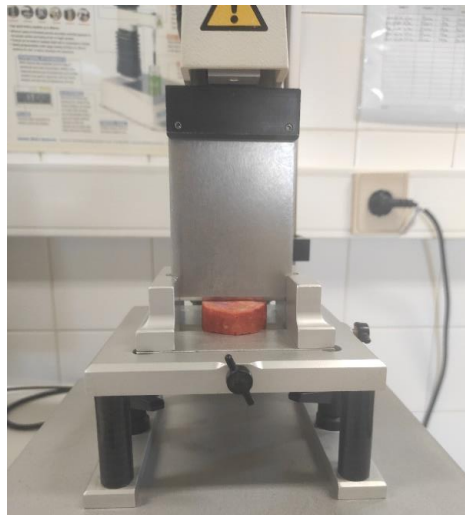


Figura 12. Teste de corte utilizando uma sonda Blade Set HDP/BS para o caso do chouriço corrente.

As amostras de fiambre da perna (figura 13a) e bacon extra (figura 13b) foram cortadas em cubos (aresta de 15 mm) e submetidas a um ensaio de compressão, utilizando uma sonda de placa de compressão P/75. As análises foram realizadas em cerca de 20 a 50 amostras.

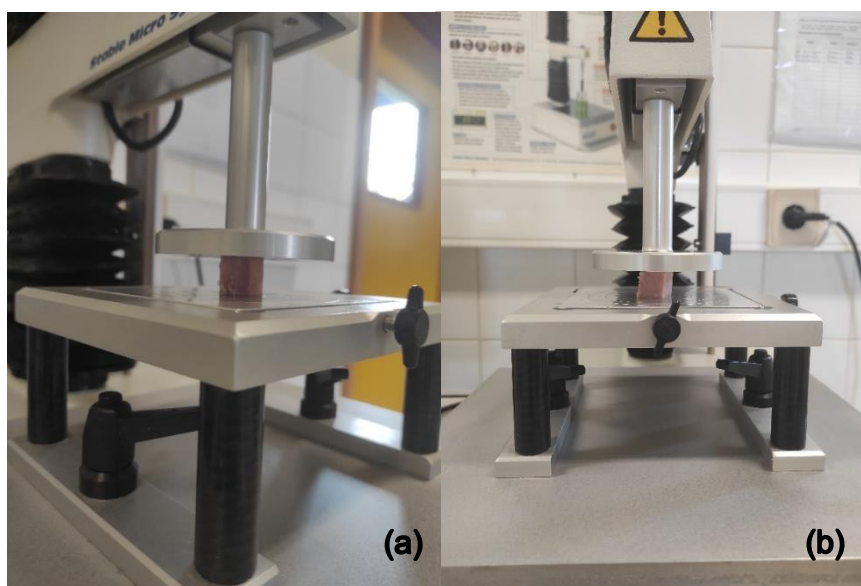


Figura 13. Ensaio de compressão, utilizando uma sonda de placa de compressão P/75 Fiambre da perna (a) e bacon extra (b).

A tabela 2 descreve as condições dos ensaios de textura para cada um dos produtos analisados.

Tabela 2. Condições dos ensaios de textura em cada um dos produtos analisados no texturômetro.

	Chouriço carne corrente colorau	Fiambre da perna	Bacon Extra
Test Mode	Compression	-	-
Pré Test Speed	10 mm/sec	2 mm/sec	2 mm/sec
Test Speed	10 mm/sec	1 mm/sec	1 mm/sec
Post Test Speed	10 mm/sec	2 mm/sec	2 mm/sec
Target Mode	Distance	Distance	Distance
Distance	20 mm	10 mm	10 mm
Time	-	3 sec	3 sec

A partir dos gráficos do perfil de textura foram determinados os seguintes parâmetros para cada produto:

Fraturabilidade (Newton) = força no primeiro pico (Peak Force at F1)

Dureza (Newton) = maior força exercida no 1º ciclo

$$\text{Elasticidade} = \frac{\text{distância 2 (mm)}}{\text{distância 1(mm)}}$$

$$\text{Coesividade} = \frac{\text{Área 2 (g. seg)}}{\text{Área 1 (g. seg)}}$$

Gomosidade (Newton) = dureza × coesividade

Mastigabilidade (N/mm) = dureza × coesividade × elasticidade

$$\text{Resiliência} = \frac{\text{Área 4 (N/mm)}}{\text{Área 3 (N/mm)}}$$

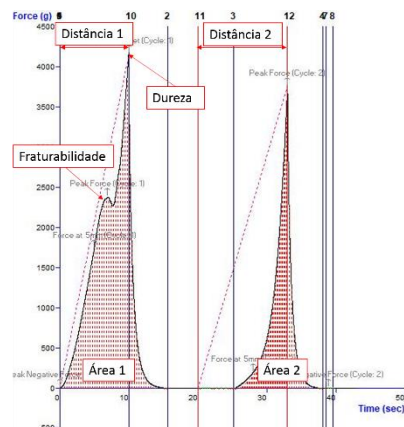


Figura 15. Resultado gráfico do teste de corte ao chouriço carne corrente colorau utilizando uma sonda Blade Set HDP/BS.

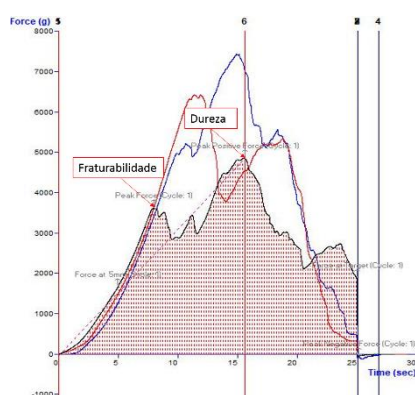


Figura 14. Resultado gráfico do ensaio de compressão no fiambre da perna e bacon extra, utilizando uma sonda de placa de compressão P/75.

4.3.7. Determinação dos nitritos e nitratos

Segundo a ISO 3091:1975 pesou-se, aproximadamente, 10 g de amostra para um frasco *erlenmeyer* de 250 mL mais 5 mL de solução boráx e 100 mL de água (70°C), aqueceu-se durante 15 minutos em banho-maria com agitação. Deixou-se arrefecer e adicionou-se 2 mL do Reagente 1 (106 g de hexacianofenato de fosfato tri-hidratado para 1 L) mais 2 mL do Reagente 2 (220 g de acetato de zinco di-hidratado mais 30 mL de ácido acético em 1 L), homogeneizando a amostra. Colocou-se 200 mL num balão de 200 mL, deixou-se repousar durante 30 minutos e filtrou-se posteriormente por filtro de pregas.

Para os nitritos, da amostra filtrada, recolheu-se 25 mL ao qual adicionou-se 1 mL de reagente cor (800 mL de água mais 100 mL de ácido fosfórico a 85 %, 10 g de sulfamilamida mais 1 g de di-hidrocloreto de N- (1-naftil)- etilenodiamina) para 1 L) e após 20 minutos (10 minutos a 2 h) juntar o reagente cor e ler a

absorvância a 543 mm (ISO 3091, 1975). A expressão de resultados de nitritos é expressa em mg NaNO₂/kg.

$$\frac{mg\ N.\ NO_2^-}{L} = \frac{Absorv\tilde{a}ncia - b}{m} \times fator\ dilui\tilde{c}\tilde{a}o$$

$$mg\ (NaNO_2)/kg = \frac{\frac{mg\ (N.\ NO_2^-/L) \times MM(NaNO_2)}{MA(N)}}{massa\ mostra\ (g) \times dilui\tilde{c}\tilde{a}o} \times 1000$$

$$I\tilde{a}o\ Nitrito\ (NO_2^-) = Nitritos\ \left(mg\ \frac{NaNO_2}{kg}\right) \times fator\ de\ convers\tilde{a}o\ (0.67)$$

$$I\tilde{a}o\ Nitrito\ (NO_2^-) = Nitritos\ \left(mg\ \frac{NaNO_2}{kg}\right) \times \frac{Massa\ Molar\ (NO_2^-)}{Massa\ Molar\ (NaNO_2)}$$

Para os nitratos, da amostra filtrada, recolheu-se 25 mL ao qual adicionou-se 75 mL da solu\tilde{c}\tilde{a}o de cloreto de am\~{o}nio-EDTA e homogeneizou-se. Passou-se pela coluna e recolheu-se a uma velocidade de 7 - 10 mL/minuto. Recolheu-se 25 mL para um bal\~{a}o onde adicionou-se 1 mL de reagente cor (800 mL de \u00e1gua mais 100 mL de \u00e1cido fosf\~{o}rico a 85 % mais 10 g de sulfamilamida mais 1 g de di-hidrocloreto de N-(1-naftil)- etilenodiamina) para 1 L). Ap\~{o}s 20 minutos (10 minutos a 2 h) juntar o reagente cor e ler a absorv\~{a}ncia a 543 mm. A express\~{a}o de resultados de nitratos \u00e9 expressa em mg KNO₃/kg.

$$\frac{mg\ N.\ inorgTot}{L} = \frac{Absorv\tilde{a}ncia - b}{m} \times fator\ dilui\tilde{c}\tilde{a}o$$

$$(N.\ inorgTot) = (N.\ NO_2^-) + (N.\ NO_3^-)$$

$$\frac{mg\ N.\ NO_3^-}{L} = \frac{mg\ N.\ inorgTot}{L} - \frac{mg\ N.\ NO_2^-}{L}$$

$$mg\ (KNO_3)/kg = \frac{\frac{mg\ (N.\ NO_3^-/L) \times MM(KNO_3)}{MA(N)}}{massa\ mostra\ (g) \times dilui\tilde{c}\tilde{a}o} \times 1000$$

$$\frac{mg\ NaNO_3}{kg} = \frac{mg\ KNO_3}{kg} \times \frac{MM\ (NaNO_3)}{MM\ (KNO_3)}$$

$$\text{Ião Nitrato (NO}_3^-) = \text{Nitritos} \left(\text{mg} \frac{\text{NaNO}_3}{\text{kg}} \right) \times \text{fator de conversão}(0.73)$$

$$\text{Ião Nitrato (NO}_3^-) = \text{Nitritos} \left(\text{mg} \frac{\text{NaNO}_3}{\text{kg}} \right) \times \frac{\text{Massa Molar (NO}_3^-)}{\text{Massa Molar (NaNO}_3)}$$

4.3.8. Determinação das proteínas/Nitrogénio total

Foi utilizado o método de Kjeldahl na determinação de proteína segundo a ISO 937:2023. Pesou-se 0,6 g - 0,7 g de amostra num tudo de digestão com 10 mL de água destilada e em seguida efetuou-se uma digestão com 12,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), na presença de 3 mL de peróxido de hidrogénio e um catalisador (2 pastilhas). Esta digestão demorou aproximadamente 4 h até atingir os 420 °C. Foi utilizado o equipamento VELP Scientifica DK 20 Heating Digester. Seguiu-se a destilação e neutralização, no equipamento, VELP Scientifica UDK 139 Semi-Automatic Distillation Unit, onde, primeiramente colocou-se 25 mL de ácido bórico num frasco Erlenmeyer, posteriormente os tubos provenientes da digestão foram destilados. Após este processo, efetuou-se uma titulação, onde através da medição de ácido clorídrico (HCl) gasto, determina-se a quantidade de Nitrogénio presente na substância original.

A conversão do teor de Nitrogénio total em teor de proteína foi calculada com um fator de conversão para carnes em geral e alimentos com mistura de proteína animal e vegetal, de 6,25 (o nitrogénio representa 16% do peso da proteína, assim em 100 g de proteína tem 16 g de nitrogénio) Os resultados são apresentados em percentagem de proteína bruta em peso seco (ISO 937, 2023). As análises foram realizadas em triplicado.

$$\begin{aligned} & \% \text{ Nitrogénio Total} \\ & = \frac{V(\text{HCl}, \text{amostra}) - V(\text{HCl}, \text{branco}) \times 10^{-3} \times N(\text{HCl})}{m(\text{amostra})} \times 14.0067 \times 100 \end{aligned}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrogénio Total} \times f(6.25)$$

4.3.9. Determinação dos cloretos

Na determinação do teor de cloretos recorreu-se ao método descrito na ISO 1841:1996. Pesou-se, aproximadamente, 10 g de amostra para um frasco *erlenmeyer* de 100 mL, agitou-se, deixando arrefecer à temperatura ambiente. De seguida colocou-se 2 mL de solução de ferrocianeto de potássio, mais 2 mL de solução de acetato de zinco agitou-se, e deixa-se repousar durante 10 minutos. Afere-se a 100 mL e filtra-se com filtro de pregas. Num *erlenmeyer* coloca-se 10 mL da amostra filtrada anteriormente e adicionou-se 1 mL de ácido nítrico, 50 mL de água, 10 mL de nitrato de prata e 1 mL do indicador sulfato de amónio e ferro (III), deixa-se repousar por 10 minutos. Para finalizar titulou-se com tiocianato de potássio (KSCN 0,1N) até atingir a coloração rosa (ISO 1841, 1996). As análises foram realizadas em triplicado. A expressão de resultados é expressa em %.

% Cloretos

$$= \frac{(V(AgNO_3) \times N(AgNO_3) \times 10^{-3}) - (V(KSCN) \times N(KSCN) \times 10^{-3})}{\frac{m(amostra) \times V(Filtrado\ titulado)}{V(Filtrado\ Total)}} \times MA(Cl) \times 100$$

4.3.10. Determinação do fósforo

Na determinação do teor de fósforo recorreu-se ao método descrito na ISO 23776:2021. A partir do teor de cinzas (após colocação na mufla a 550-600 °C) procede-se à dissolução da cinza. Coloca-se as cinzas num gobelé de 100 mL adiciona-se cerca de 3 mL de ácido nítrico, e água até perfazer 80 mL. Leva-se a uma placa de aquecimento até evaporar. Filtra-se e afere-se a 25 mL em balão volumétrico. Procede-se a uma diluição de 1/50 (ou seja, 2 mL em 100 mL). De seguida dilui-se novamente para balões volumétricos de 50 mL, nomeadamente 1 mL e 2 mL. Adiciona-se 1 gota de fenolftaleína e neutraliza-se com NaOH até ficar com uma coloração rosa e afere-se aos 50 mL com água. Para a reta de calibração adiciona-se solução intermédia (2 mL de solução padrão de fósforo em 200 mL), adiciona-se 1 gota de fenolftaleína e neutraliza-se com NaOH até ficar com uma coloração rosa e afere-se aos 50 mL com água. Adiciona-se 2 mL da solução combinada (H₂SO₄ 5N; tartarato; molibdato e ácido ascórbico) em

cada balão volumétrico previamente aferido a 50 mL. Lê-se a absorvância a 880 mm (ISO 23776, 2021). As análises foram realizadas em triplicado. A expressão de resultados é expressa em mg P/100g.

$$\text{Concentração} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Absorvância} - b}{m} \times \text{Fator de diluição}$$

$$\frac{\text{mg P}}{\text{kg}} = \frac{\text{Concentração} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times 10^{-3}}{\text{massa amostra (g)}} \times \text{diluição}$$

$$\frac{\text{mg P}}{100\text{g}} = \frac{\text{mg P}}{\text{kg}} \times 1$$

4.3.11. Determinação das gorduras

Na determinação do teor de gorduras recorreu-se ao método descrito na ISO 1443:1973. Pesou-se, aproximadamente, 2,5 g de amostra para um frasco *erlenmeyer* de 500 mL, juntou-se 100 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) 3N. Cobriu-se o *erlenmeyer* com um vidro relógio e submeteu-se a mistura a uma ebulição suave em placa de aquecimento durante 1 hora. Filtrou-se por filtro de 90 mm e lavou-se o resíduo com água quente até desaparecer a reação ácida. Colocou-se os papéis de filtro num vidro relógio e deixa-se na estufa durante 1 h 30 a 95 - 98 °C. Após secagem, introduzir num cartucho de extração, extraíndo no *soxhlet* com éter de petróleo (40 - 60 °C e índice de bromo inferior a 1) durante 6 horas, recolhendo o resíduo para uma balão previamente acondicionado. Secou-se o solvente num evaporador rotativo e levou-se à estufa a secar a 75°C durante 1h30. Após arrefecimento pesou-se o conjunto (balão mais gordura) (ISO 1443, 1973). As análises foram realizadas em triplicado. A expressão de resultados é expressa em %.

$$\% \text{gordura} = \frac{\text{peso do balão com gordura (g)} - \text{peso do balão (g)}}{\text{peso da amostra (g)}} \times 100$$

5. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos apresentam-se em anexo, incluindo a comparação das contagens de microrganismos a 30 °C dos seis produtos em análise, apresentada na Tabela 4, os resultados de nitrato, expressos em N-NO_3^- (mg/kg), e de nitrito, expressos em N-NO_2^- (mg/kg), nos tempos t_0 e t_{120} dos seis produtos, apresentados na tabela 5, bem como a comparação dos resultados microbiológicos obtidos nos restantes parâmetros em análise dos seis produtos, apresentada na tabela 6. Adicionalmente, são apresentados os parâmetros físico-químicos e de textura, com os valores médios obtidos nas análises realizadas ao chouriço de carne corrente colorau (CA e CR), ao fiambre da perna (FA e FR) e ao bacon extra (BA e BR), correspondente, respetivamente, às tabelas 7, 8 e 9.

5.1. Chouriço carne corrente colorau

Apresentam-se seguidamente os resultados referentes aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos das duas formulações de chouriço de carne corrente, assim como na massa antes do enchimento.

5.1.1. Parâmetros microbiológicos no chouriço de carne corrente

A figura 14 mostra os resultados obtidos da quantificação de microrganismos a 30 °C (log UCF/g) para cada uma das formulações estudadas e ao longo do tempo.

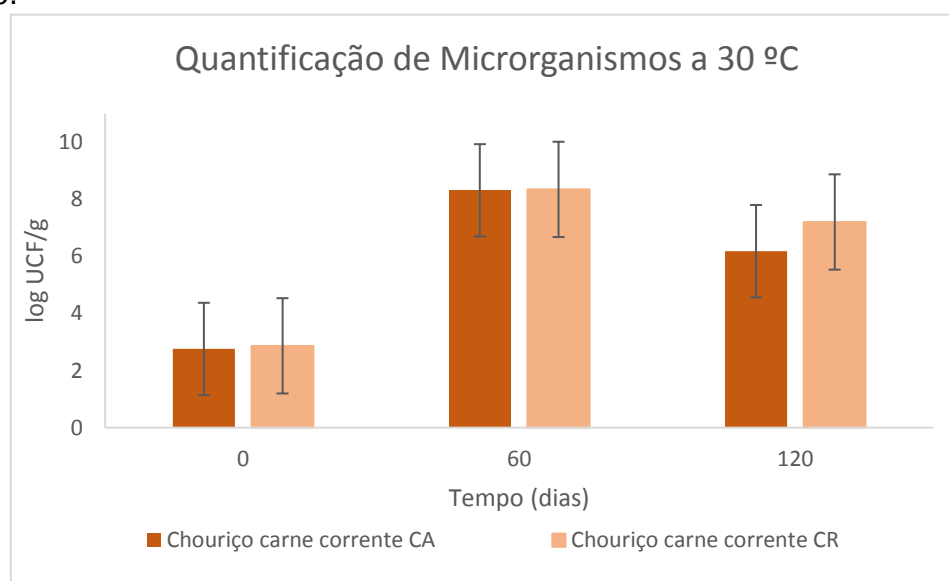


Figura 16. Quantificação de microrganismos a 30 °C ao longo do tempo para cada uma das duas formulações de chouriço de carne corrente (CA e CR).

De acordo com a figura 14 e com a tabela 4, em anexo, a quantificação de microrganismos totais aeróbios é sensivelmente semelhante nas duas formulações (CA e CR) ao longo do tempo, sendo que, o maior crescimento ao fim de 60 dias de armazenamento pode resultar do desenvolvimento de bactérias lácticas, como indicado após coloração de Gram e reação de catalase de colônias isoladas. Estas bactérias fermentam os hidratos presentes na carne, produzindo ácidos orgânicos, nomeadamente ácido láctico e baixando o pH do produto. Esta acidificação é fundamental, para inibir o crescimento de microrganismos patogénicos e deteriorativos. Ao fim de 120 dias verifica-se efetivamente uma diminuição dos níveis de microrganismos presentes, pois à medida que o produto desidrata, a_w diminui, o sal e os ácidos produzidos ficam mais concentrados. Conforme consta na tabela 6, em anexo, no CA para t_0 , t_{60} e t_{120} dias o pH foi de 6.11, 4.93 e 5.19, respetivamente, e no CR para o t_0 , t_{60} e t_{120} o pH foi de 6.15, 5.34 e 5.63, o que poderá explicar a diferença relativamente aos níveis de microrganismos na CA, uma vez que a menor acidificação do produto CR em comparação com o produto CA poderá facilitar um maior desenvolvimento microbiano.

Os restantes parâmetros microbiológicos analisados: contagem de *Enterobacteriaceae*, contagem de *estafilococos coagulase positiva*, contagem de *Escherichia coli*, deteção de *Campylobacter* spp., deteção de *Listeria monocytogenes*, deteção de *Salmonella* spp. e contagem de Esporos de Clostrídios sulfito-redutores deram ausentes ou com valores inferiores ao limite de deteção do método conforme consta da tabela 6, em anexo.

5.1.2. Parâmetros físico-químicos analisados na massa

Os resultados das análises realizadas: pH, humidade, cinza, proteína, fósforo, cloretos, gordura, cor, nitratos e nitritos foram tratados numa ACP, para avaliar

as diferenças entre as duas formulações, correlacionar as principais variáveis e possíveis alterações ao longo do tempo de conservação.

A figura 15 mostra as três componentes principais com valores próprios superiores a 1 (Critério de Kaiser) e que agrupam 86.9 % das variáveis estudadas na massa (antes do enchimento)

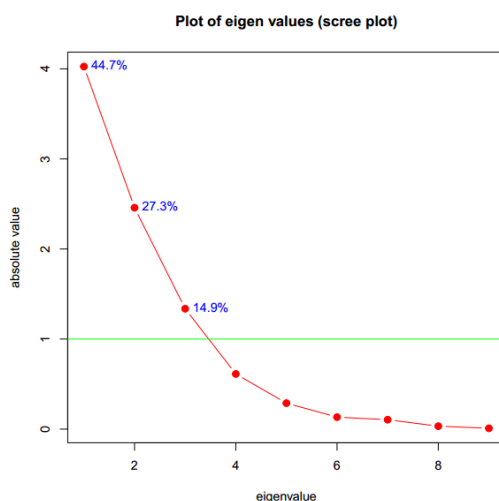


Figura 17. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos analisados na massa das duas formulações de chouriço e no produto final ao longo do tempo.

A figura 16 mostra a representação de CP1 e CP2 com 66.7 % das variáveis.

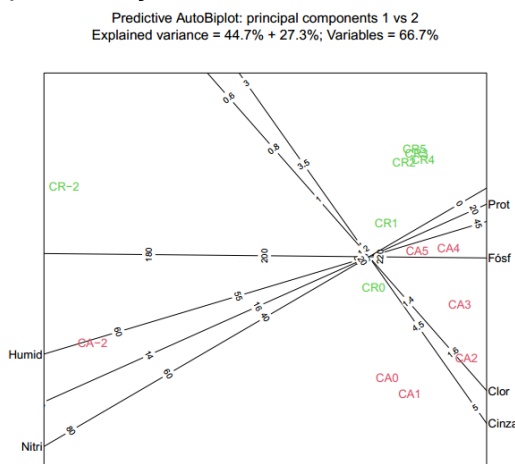


Figura 18. Representação gráfica da CP1 e CP2. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados. Parâmetros físico-químicos analisados: proteína, fósforo, cloretos e cinza.

A figura 16 revela que existe uma distinção na percentagem de humidade entre as duas formulações na massa do chouriço (CA-2 e CR-2) e as restantes

formulações CA e CR, tal como expectável, atribuído ao processo de enchimento e secagem subsequente, onde ocorre uma elevada perda de água. A quantidade de nitritos também é diferente na massa e nas duas formulações, dada a sua rápida combinação em nitrosohemoglobina, diminuindo a sua concentração ao longo do tempo. A figura 16 separa ainda as duas formulações na percentagem de cloretos e cinza, que apresentam maior teor de sais minerais (cloretos) e resíduos minerais totais (cinzas), comparativamente à formulação CR. A percentagem superior de cloretos está associada à própria formulação que contem maior quantidade de sal nitrificado (CA). Não parecem existir diferenças na proteína e fósforo entre as duas formulações e ao longo do tempo. As amostras de CA e CR concentram-se no lado direito do gráfico, indicando valores superiores de proteína, fósforo, cinza e cloretos e menor de humidade e nitritos comparativamente às massas iniciais, pelo processo de enchimento seguinte.

A figura 17 mostra a representação de CP2 e CP3 com 55.6 % das variáveis.

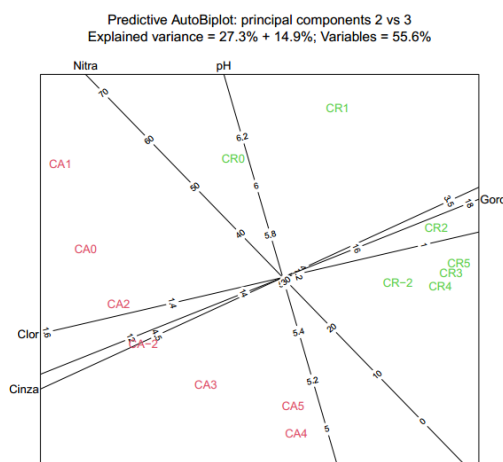


Figura 19. Representação gráfica da CP2 e CP3. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados. Parâmetros físico-químicos analisados: gordura, cloretos, cinza, pH e nitratos.

A figura 17 mostra que no chouriço existe uma correlação inversa entre a gordura e os parâmetros de cinza e cloretos. CR apresenta valores superiores de gordura e menor teor de cloretos e cinza do que CA pela formulação usada. A diferente percentagem de gordura pode ser atribuída à heterogeneidade da massa nos diferentes produtos. Os nitratos diminuem ao longo do tempo de conservação

devido à sua combinação em nitritos por ação bacteriana em ambas as formulações. O pH e nitratos diminuem ao longo do tempo, mas não parecem existir diferenças entre as duas formulações.

A figura 18 mostra a representação de CP1 e CP3 com 55.6 % das variáveis.

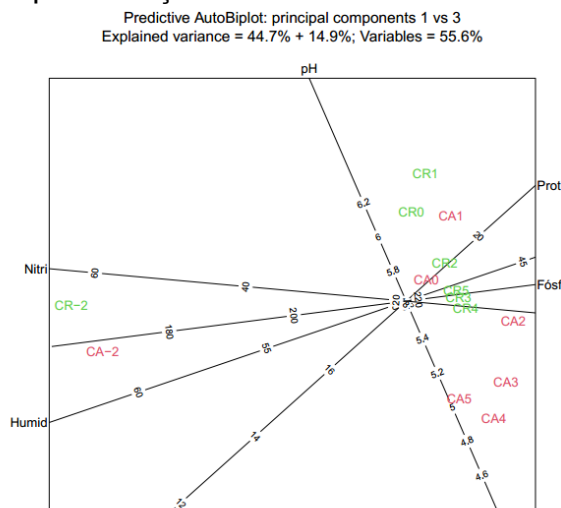


Figura 20. Representação gráfica da CP1 e CP3. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados. Parâmetros físico-químicos analisados: proteína, fósforo, humidade pH e nitritos.

A figura 18 mostra que no chouriço existe uma correlação inversa entre o fósforo e a humidade e nitritos, pela diferente posição no gráfico. A diminuição da percentagem de nitritos e humidade da massa em relação ao chouriço vai concentrar o teor em fósforo. Registam-se diferenças entre a massa inicial nas duas formulações e o produto final na percentagem de nitritos e humidade, tal como referido na figura 16 das componentes principais anteriores. Não parecem existir diferenças no fósforo e proteína para as duas formulações, tal como esperado, pois não se esperam alterações nestes parâmetros e ao longo do tempo de conservação. O decréscimo do pH, em ambas as formulações, está associado à atividade de microrganismos aeróbios mesófilos, com pH inferior na formulação CA.

5.1.3. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos no chouriço de carne corrente

A ACP para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos no chouriço de carne corrente para 0, 60 e 120 dias de armazenamento, revela quatro

componentes principais com valores próprios superiores a 1 (Critério de Kaiser), de acordo com a figura 19 e que agrupam 97.3 % das variáveis estudadas.

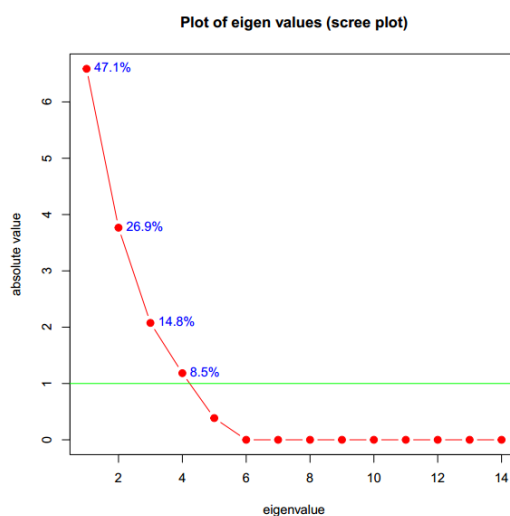


Figura 21. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nas duas formulações de chouriço e no produto final ao longo do tempo (0, 60 e 120 dias).

A figura 20 mostra a representação de CP1 e CP2 com 85.7 % das variáveis.

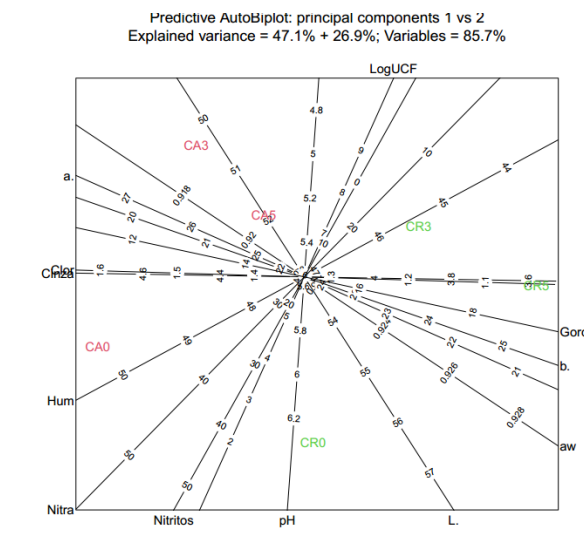


Figura 22. Representação gráfica da CP1 e CP2. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: cloretos, cinza, humidade, nitratos, nitritos, pH, L, a_w , b^* , gordura e microrganismos a 30 °C.

A figura 20 mostra que os níveis de microrganismos aeróbios mesófilos (log UFC/g) aumentam ao longo do tempo, mas não são visíveis diferenças entre as duas formulações. A figura 14 mostra esta evolução do crescimento entre as

duas formulações e ao longo do tempo. O teor em nitratos e nitritos variam de forma inversa com os níveis de microrganismos, o que será expectável pois são parâmetros que têm um efeito antimicrobiano no crescimento microbiano. Humidade, cloretos e parâmetro a^* e L^* de cor estão representadas à esquerda, e com maior predominância na formulação A (CA), naturalmente pela maior quantidade de nitritos nesta formulação e que interferem diretamente na cor e nos iões presentes. A gordura, parâmetro b^* de cor e a_w localizam-se à direita, indicando amostras mais ricas em gordura, mais amarelas e com maior a_w , correspondentes à formulação R (CR). A cor amarela na formulação CR pode estar associada à maior percentagem de gordura desta formulação. Não são visíveis diferenças nas duas formulações (CA e CR) no teor de nitratos, nitritos e pH, mas diminuem ao longo da conservação.

A variação do parâmetro L^* de cor nas duas formulações, pode estar correlacionado com os níveis de carga microbiana ($\log$ UFC/g) das amostras, uma vez que as amostras intermédias de 60 dias (CR3 e CA3) apresentam maiores contagens de microrganismos de bactérias lácticas, e menores valores de L .

A figura 21 mostra a representação de CP1 e CP3 com 64.3 % das variáveis.

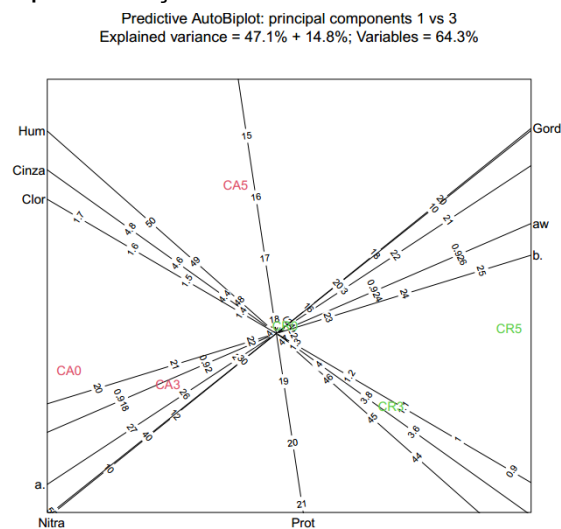


Figura 23. Representação gráfica da CP1 e CP3. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: humidade, cinza, cloretos, nitratos, proteína, gordura, a_w , parâmetros a^* e b^* de cor.

A figura 21 revela que, a formulação CA tem maior percentagem de humidade, cinza e cloretos comparativamente à formulação CR. No lado direito da figura

situam-se os parâmetros de gordura, a_w e parâmetro b , com maior predominância na formulação CR. Estas evidências foram já mencionadas nas figuras anteriores nas componentes principais 1 e 2. A amostra CA5 apresenta menor % proteína, podendo ocorrer devido à transformação em aminas biogénicas, mais voláteis, mas não quantificadas neste estudo. A formulação R (CR) tem maior parâmetro b^* de cor (cor amarela), a_w e gordura, com uma correlação oposta ao parâmetro a^* de cor (vermelho) e de nitratos da formulação A, tal como confirmado na correlação de CP1 e CP2.

A figura 22 mostra a representação de CP1 e CP4 com 64.3 % das variáveis.

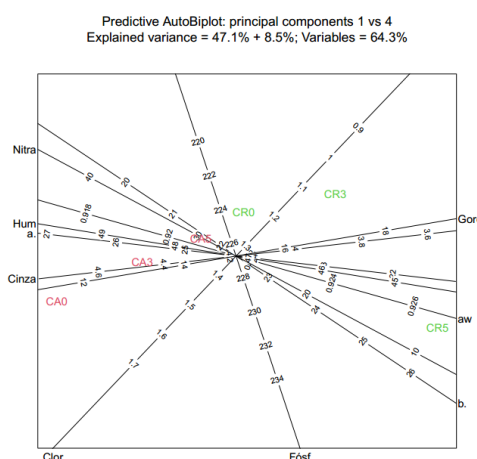


Figura 24. Representação gráfica da CP1 e CP4. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: nitratos, humidade, parâmetro a^* , cinza, cloretos, fósforo, parâmetro b^* , a_w e gordura.

A figura 22 mostra uma representação semelhante com as variáveis de CP1 e CP3, maior % de gordura, parâmetro b^* de cor e a_w na formulação R (CR). No lado esquerdo da figura situam-se as variáveis de humidade, nitratos e cinza com maior percentagem na formulação CA. Este comportamento já tinha sido evidenciado na correlação das restantes componentes principais. O eixo do fósforo situa-se a meio do gráfico, igualmente distante das formulações A e R, sem diferenciação.

O estudo dos valores próprios da ACP dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nas duas formulações de chouriço e no produto final ao longo do tempo (0, 60 e 120 dias) mostra 4 componentes principais (figura

19), pelo que, existem mais representações da correlação entre as componentes como CP2 e CP3, CP2 e CP4, CP3 e CP4, mas a percentagem de variáveis correlacionáveis é inferior a 20 %, pelo que, com pouca informação importante. Estes resultados demonstram mais uma vez a estabilidade do produto e das formulações, associado ao processo de fabrico deste tipo de produtos.

5.1.4. Parâmetros físico-químicos no chouriço de carne corrente

A ACP para os parâmetros físico-químicos no chouriço de carne corrente para 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento, revela quatro componentes principais com valores próprios superiores a 1 (Critério de Kaiser) de acordo com a figura 23 e que agrupam 85 % das variáveis estudadas.

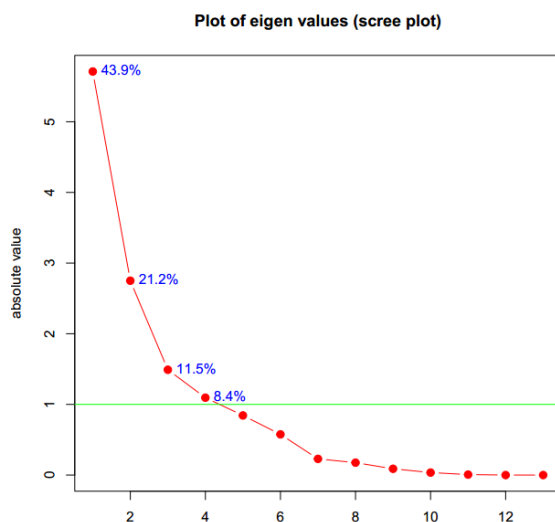


Figura 25. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos analisados nas duas formulações de chouriço e no produto final ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias).

A figura 24 mostra a representação de CP1 e CP2 com 76.9 % das variáveis.

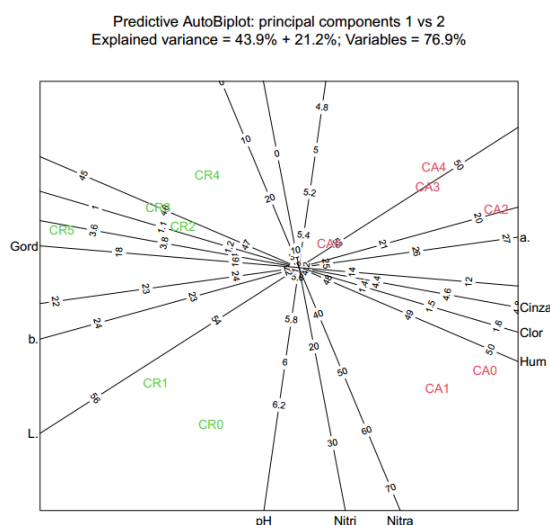


Figura 26. Representação gráfica da CP1 e CP2. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: pH, nitratos, nitritos, humidade, parâmetro a*, b* e L, cinza, cloretos e gordura.

A figura 24 revela uma separação evidente entre CA e CR. CA apresenta maior componente de cor a* (vermelho), cinza, cloretos e humidade, conferida pela adição do nitrato. CR tem maior componente b* (amarelo) e L de cor com maior gordura, o que explica estes parâmetros de cor. Não existem diferenças nas amostras dos parâmetros de pH, nitritos e nitratos, isto é, apesar dos valores iniciais serem distintos, a sua evolução no tempo é semelhante, demonstrando que, a redução da adição do nitrato mantém o produto satisfatório ao longo da conservação e que os parâmetros que tem maior influência na conservação são a cor, tal como expectável.

A figura 25 mostra a representação de CP1 e CP3 com 61.5 % das variáveis.

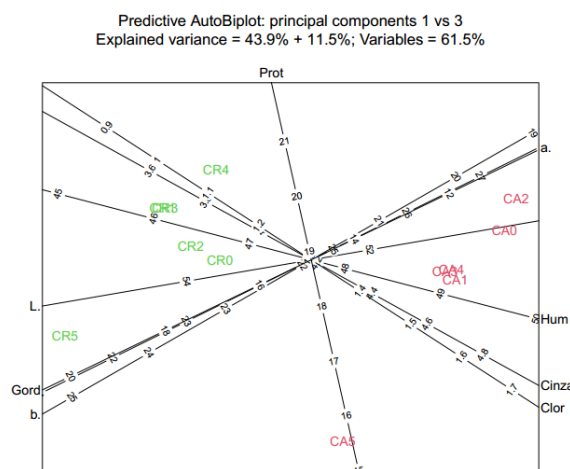


Figura 27. Representação gráfica da CP1 e CP3. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: humidade, parâmetro a*, b* e L, cinza, cloretos e proteína.

A figura 25 revela separação das formulações CA e CR, à semelhança de CP1 e CP2, exceto na proteína, onde não são visíveis diferenças nos grupos, com o eixo a meio do gráfico. A diferença na amostra CA5, pode ser resultante da transformação da proteína em aminas biogénicas (voláteis), mas não confirmado, pois esta análise não foi realizada. À semelhança de CP1 e CP2 os parâmetros variam de forma semelhante, a componente a* de cor varia de forma oposta à componente b* de cor, CR com maior componente b* de cor (amarelo), pelo seu teor reduzido em nitritos e também pela percentagem de gordura nestas amostras.

A figura 26 mostra a representação de CP1 e CP4 com 61.5 % das variáveis.

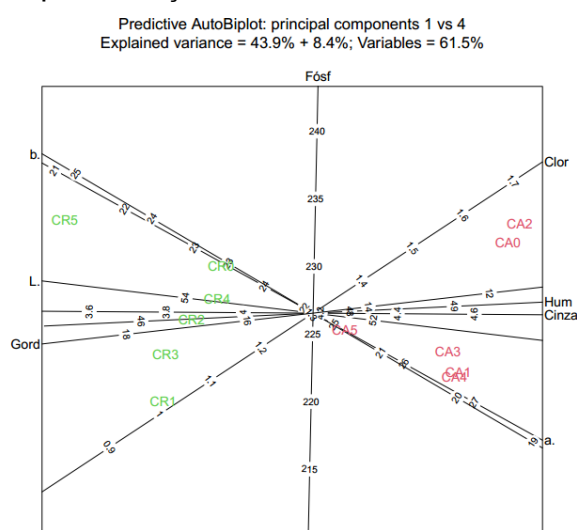


Figura 28. Representação gráfica da CP1 e CP4. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: humidade, parâmetro a*, b* e L, cinza, cloretos, gordura e fósforo.

A figura 26 confirma a separação entre CA e CR e mantém os mesmos parâmetros discriminantes entre os grupos. CA com maior parâmetro a* de cor, cinza, humidade e cloretos, características do teor superior em nitratos. CR maior parâmetro b* e L* de cor e gordura, sendo esta última responsável pela diferença nos parâmetros de cor. Esse resultado reforça as evidências das componentes anteriores e a distinção dos grupos CA e CR.

No estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%) dos parâmetros físico-químicos analisados nas duas formulações de chouriço e no produto final ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias) representado na figura 23 com 4 componentes principais, as correlações entre

CP2 e CP3, CP2 e CP4, CP3 e CP4 apresentam uma percentagem de variáveis inferior a 20 % pelo que com informação reduzida.

5.1.5. Textura

A ACP para os parâmetros de textura no chouriço de carne corrente ao longo do armazenamento, revela duas componentes principais com valores próprios superiores a 1 (Critério de Kaiser), de acordo com a figura 27 e que agrupam 100 % das variáveis estudadas, pelo que, altamente correlacionáveis.

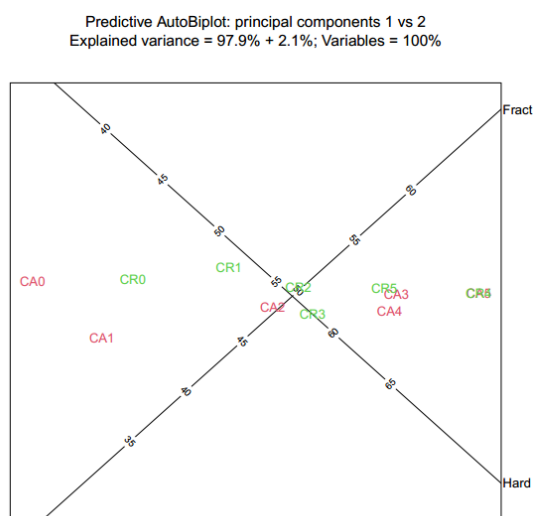


Figura 29. Representação gráfica da CP1 e CP2. CA e CR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros de textura analisados: dureza e fraturabilidade.

A figura 27 revela que a dureza se correlaciona diretamente com a fraturabilidade. Não existem diferenças entre as duas formulações CA e CR, apresentando valores muito próximos, mas com tendência para aumentar ao longo do tempo, como seria expetável, pois ocorre perda de humidade, o que aumenta a dureza e a fraturabilidade do produto.

5.2. **Fiambre da Perna**

Apresentam-se seguidamente os resultados referentes aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos das duas formulações de fiambre da perna. (FA e FR). Foram utilizadas as mesmas amostragens ao longo do tempo: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias.

5.2.1. Parâmetros microbiológicos do fiambre da perna

A figura 28 mostra os resultados obtidos da quantificação de microrganismos a 30 °C para cada uma das formulações estudadas e ao longo do tempo (FA e FR).

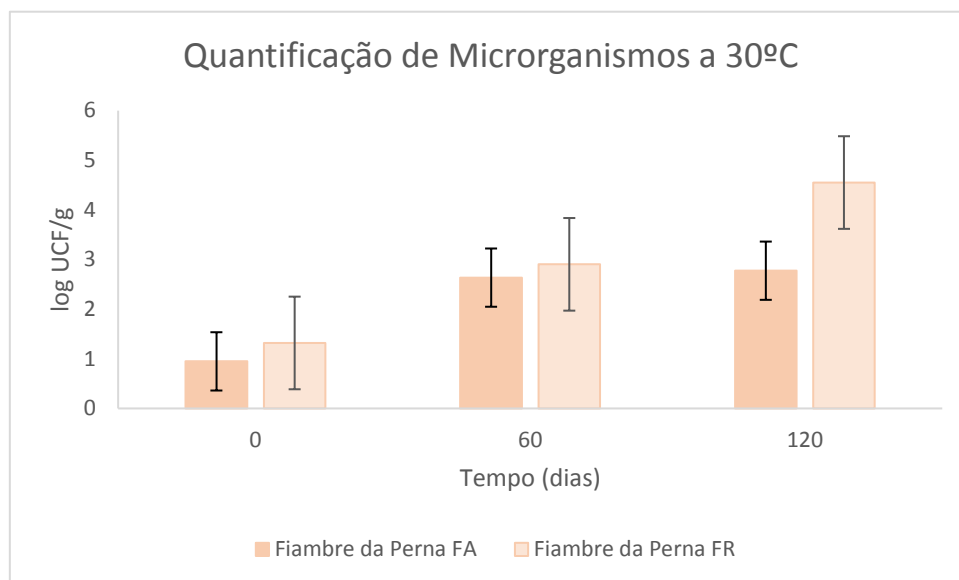


Figura 30. Quantificação de microrganismos a 30 °C ao longo do tempo para cada uma das duas formulações de fiambre da perna (FA e FR).

De acordo com a figura 28 e com a tabela 4, em anexo, verifica-se que o fiambre da perna apresenta níveis de microrganismos totais aeróbicos superior no FR do que no FA. No final do ensaio a formulação FR apresenta um valor de aproximadamente 4,5 log UFC/g, comparativamente à FA de aproximadamente 3 log UCF/g. Apesar de diferentes, estes valores encontram-se dentro dos limites (satisfatório $<10^5$; aceitável: 10^5 a $<10^7$; não satisfatório: $\geq 10^7$ determinar flora predominante: se o micro-organismo predominante for $>10^6$ leveduras, $>10^7$ bacilos Gram-negativos ou espécies de *Bacillus*, ou $>10^8$ bactérias ácido-láticas) indicados por linhas de orientação internacionalmente reconhecidas como da UK Health Security Agency (2025). O crescimento de microrganismos ao longo do tempo pode resultar do crescimento de bactérias lácticas que promovem uma acidificação do meio, conforme consta na tabela 7, em anexo, com os valores de pH obtidos, que atua como fator condicionante do desenvolvimento microbiano.

Os restantes parâmetros microbiológicos analisados: contagem de *Enterobacteriaceae*, contagem de *estafilococos coagulase positiva*, contagem *Escherichia coli*, detecção de *Campylobacter* spp., detecção de *Listeria monocytogenes*, detecção de *Salmonella* spp. e detecção e contagem Esporos de clostrídios sulfito-redutores deram ausentes ou com valores inferiores ao limite de detecção do método, conforme consta da tabela 6, em anexo.

5.2.2. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do fiambre da perna

A figura 29 mostra as cinco componentes principais com valores próprios superiores a 1 (Critério de Kaiser) da ACP para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos do fiambre da perna para 0, 60 e 120 dias de armazenamento, e que agrupam 100 % das variáveis estudadas.

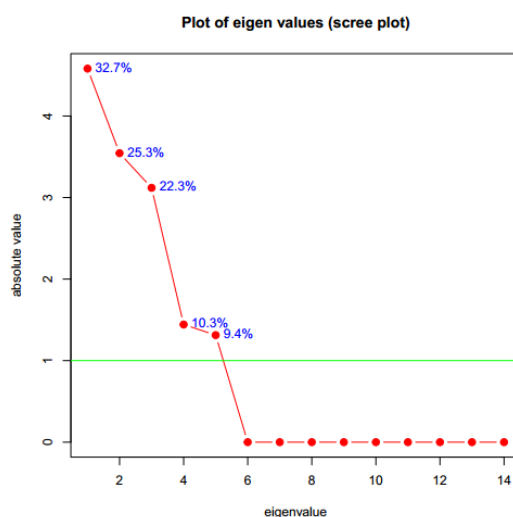


Figura 31. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nas duas formulações do fiambre da perna ao longo do tempo (0, 60 e 120 dias).

A figura 30 mostra a representação de CP1 e CP2 com 57.1 % das variáveis.

A figura 30 mostra que existe uma correlação oposta entre nitritos e o pH pela sua ação antimicrobiana. O crescimento microbiano depende diretamente do teor de nitratos, tal como mostra a figura, uma vez que os eixos variam de forma oposta. Também existe uma correlação oposta entre a gordura e o crescimento microbiano, pois as formulações do estudo (FA e FR) apresentam diferentes percentagens de gordura. As amostras FR3 e FR5 apresentam maior teor de humidade e níveis de microrganismos aeróbios superiores (log UCF/g), indicando que a redução de sais de cura alterou o perfil microbiológico, apesar de se manter satisfatório de acordo com linhas de orientação internacionalmente reconhecidas (satisfatório $<10^5$; aceitável: 10^5 a $<10^7$; não satisfatório: $\geq 10^7$

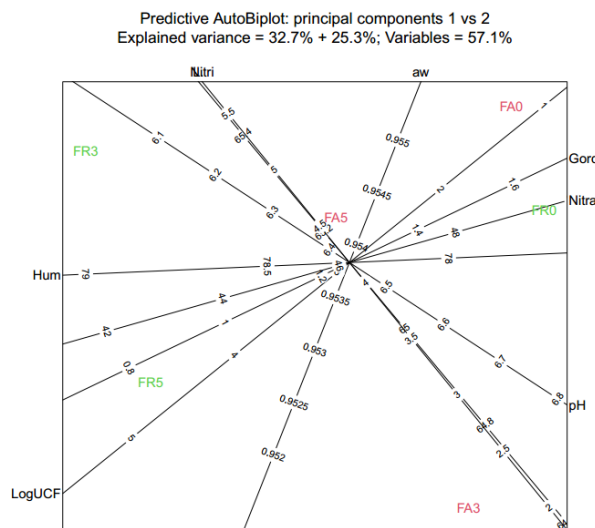


Figura 32.Representação gráfica da CP1 e CP2. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados: nitritos, parâmetro L da cor, a_w , gordura, nitratos, pH, microrganismos a 30°C e humidade.

determinar flora predominante: se o micro-organismo predominante for $>10^6$ leveduras, $>10^7$ bacilos Gram-negativos ou espécies de *Bacillus*, ou $>10^8$ bactérias ácido-lácticas) (UK Health Security Agency, 2025). Além disso, o tempo de armazenamento contribuiu para a separação das amostras, refletindo alterações progressivas nas características avaliadas. Apesar da variação ao longo do tempo da a_w e pH, não existem diferenças entre ambas as formulações (FA e FR).

A figura 31 mostra a representação de CP1 e CP3 com 42.9 % das variáveis.

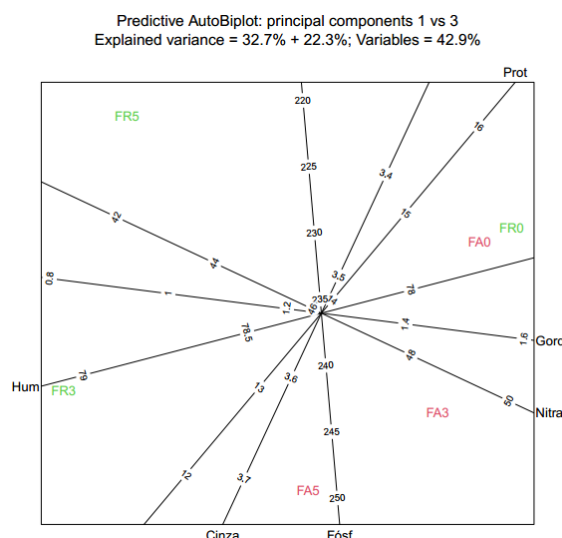


Figura 33. Representação gráfica da CP1 e CP3. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados: gordura, nitratos, fósforo, cinza, humidade e proteína.

A figura 31 mostra que a proteína correlaciona-se de forma negativa com as cinzas, tal como esperado. As amostras FR3 e FR5 tem maior teor de humidade e menor quantidade de nitratos associados à formulação, de acordo também com a correlação de CP1 e CP2, uma vez que a formulação R tem menor teor em nitratos, o que interfere na percentagem humidade final. Por outro lado, a humidade tem correlação negativa com a percentagem de gordura e nitratos. A amostra FA5 situa-se no quadrante inferior, sugerindo alterações dos sais minerais com o tempo. Assim, a ACP reforça alguma variação ao longo do tempo de armazenamento, mas pouca distinção entre as formulações. Apesar disso, a FA tem teores superiores de gordura e nitratos, associados à formulação.

No estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%) dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nas duas formulações do fiambre da perna ao longo do tempo (0, 60 e 120 dias) representado na figura 29, com 5 componentes principais, as correlações entre CP1 e CP4, CP1 e CP5, CP2 e CP3, CP2 e CP4, CP2 e CP5, CP3 e CP4, CP3 e CP5, CP4 e CP5, correspondem a uma percentagem de variáveis inferior a 20 % pelo que, com informação menor. Estes resultados demonstram mais uma vez a estabilidade do produto e das formulações, associado ao processo de fabrico deste tipo de produtos.

A ACP mostra que, no fiambre, as variáveis são menos correlacionáveis já que existem mais componentes principais e com menos variáveis correlacionáveis entre si. Trata-se assim de um produto mais estável, homogêneo, onde as variações são menores.

5.2.3. Parâmetros físico-químicos do fiambre da perna

A ACP para os parâmetros físico-químicos no fiambre da perna para 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento, revela cinco componentes principais com valores próprios superiores a 1 (Critério de Kaiser) de acordo com a figura 32 e que agrupam 84.2 % das variáveis estudadas.

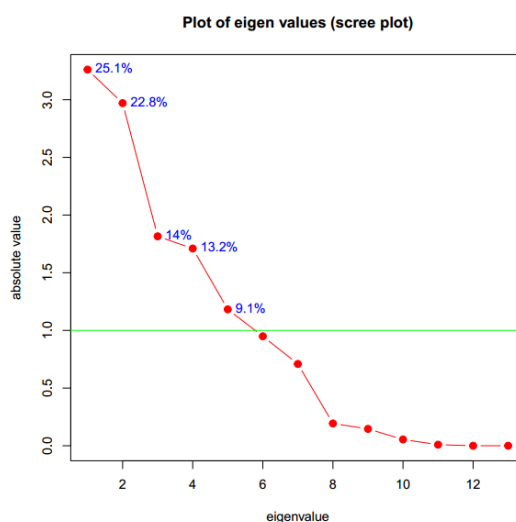


Figura 34. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos analisados nas duas formulações de fiambre e no produto final ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias).

A figura 33 mostra a representação de CP1 e CP2 com 38.5% das variáveis.

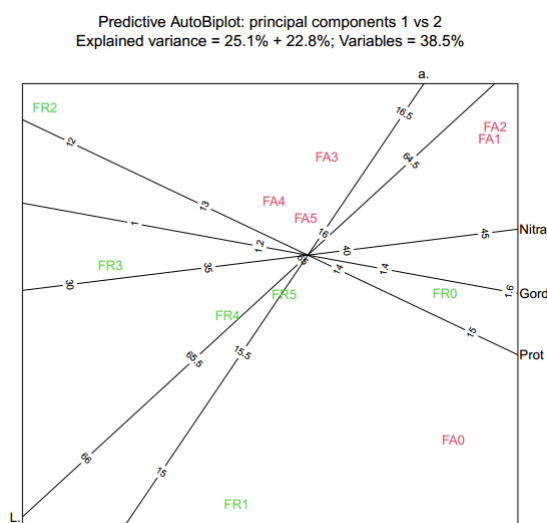


Figura 35. Representação gráfica da CP1 e CP2. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: nitratos e gordura, parâmetro de cor a^* e L e proteína.

A figura 33 revela que FA e FR apresentam perfis diferentes em algumas variáveis. FA apresentam maiores valores do parâmetro a^* (vermelho) e menor L de cor que FR.

A figura 34 mostra a representação de CP1 e CP3 com 23.1 % das variáveis.

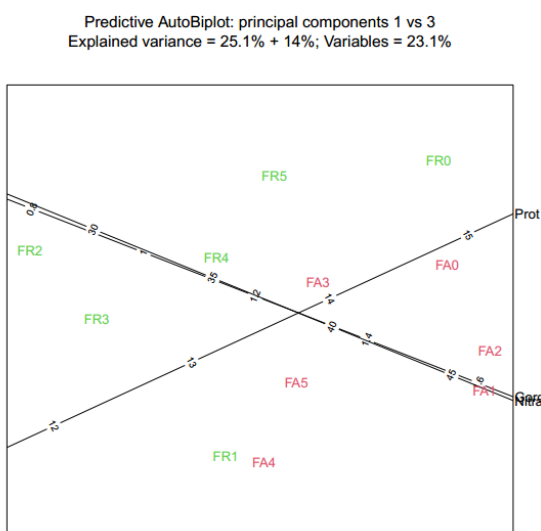


Figura 36. Representação gráfica da CP1 e CP3. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: nitratos, proteína e gordura.

A figura 34 revela FA apresentam valores superior de gordura, proteína e nitratos do que FR, à semelhança da correlação das componentes CP1 e CP2.

A figura 35 mostra a representação de CP1 e CP4 com 30.8 % das variáveis.

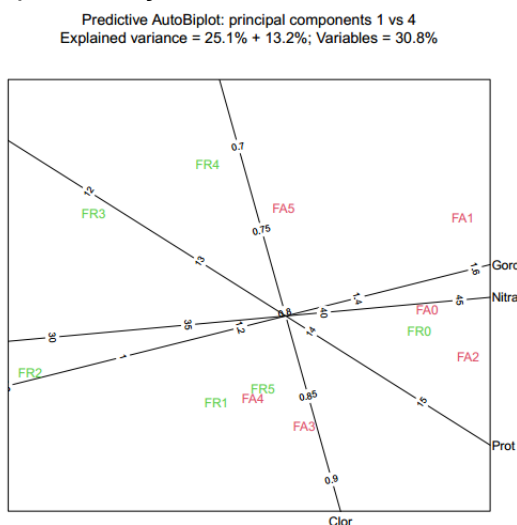


Figura 37. Representação gráfica da CP1 e CP4. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: nitratos, proteína, cloretos e gordura.

A figura 35 revela o comportamento semelhante às correlações das componentes principais anteriores, FA tem maior percentagem de gordura e nitratos, contrariamente à formulação FR. Não há diferenças da percentagem de cloretos em ambas as formulações, pois o eixo está igualmente distante das formulações.

No estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos analisados nas duas formulações de fiambre e no produto final ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias) representado na figura 32 com 5 componentes principais, as correlações entre CP1 e CP5, CP2 e CP3, CP2 e CP4, CP2 e CP5, CP3 e CP4, CP3 e CP5, CP4 e CP5, a percentagem das variáveis é inferior a 15 %, pelo que a informação é muito reduzida. Estes resultados demonstram mais uma vez a estabilidade do produto e das formulações, associado ao processo de fabrico deste tipo de produtos.

5.2.4. Textura

A ACP para os parâmetros de textura no fiambre da perna para 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento, mostra as duas componentes principais com valores próprios superiores a 1 (Critério de Kaiser) e que agrupam 83.7 % das variáveis estudadas, de acordo com a figura 36.

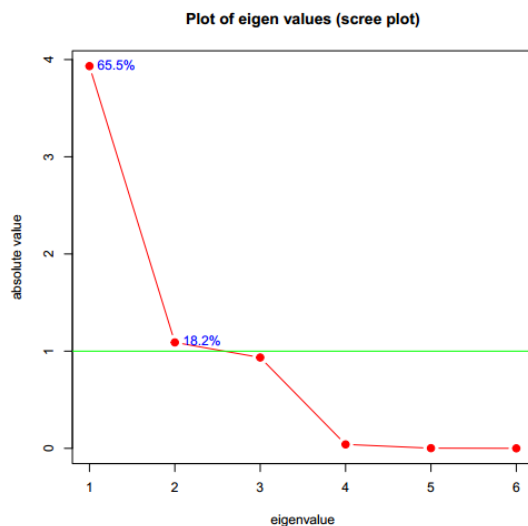


Figura 38. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros de textura analisados nas duas formulações do fiambre da perna ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias).

A figura 37 mostra a representação de CP1 e CP2 com 83.3 % das variáveis.

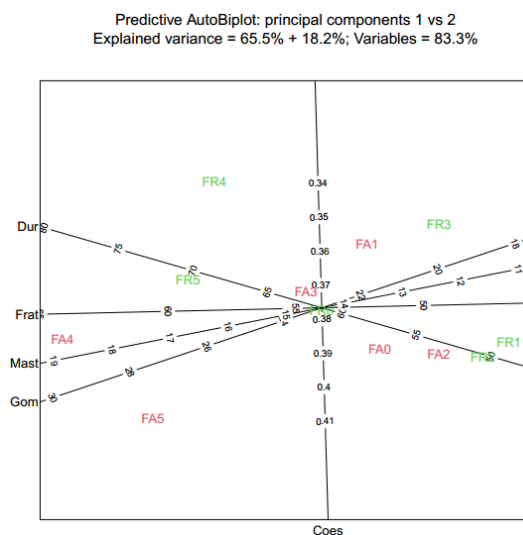


Figura 39. Representação gráfica da CP1 e CP2. FA e FR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros de textura analisados: dureza, fraturabilidade, mastigabilidade, gomosidade e coesividade.

A figura 37 mostra que não existe uma distinção entre FA e FR e ao longo do tempo, uma vez que os grupos estão misturados nas diferentes componentes de textura: dureza, mastigabilidade e gomosidade. O efeito da adição dos nitritos não teve qualquer interferência na textura das formulações finais.

5.3. Bacon Extra

Apresentam-se seguidamente os resultados referentes aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos das duas formulações de bacon extra.

5.3.1. Parâmetros microbiológicos do bacon extra

A figura 38 mostra os resultados obtidos da quantificação de microrganismos a 30 °C para cada uma das formulações estudadas e ao longo do tempo (BA e BR).

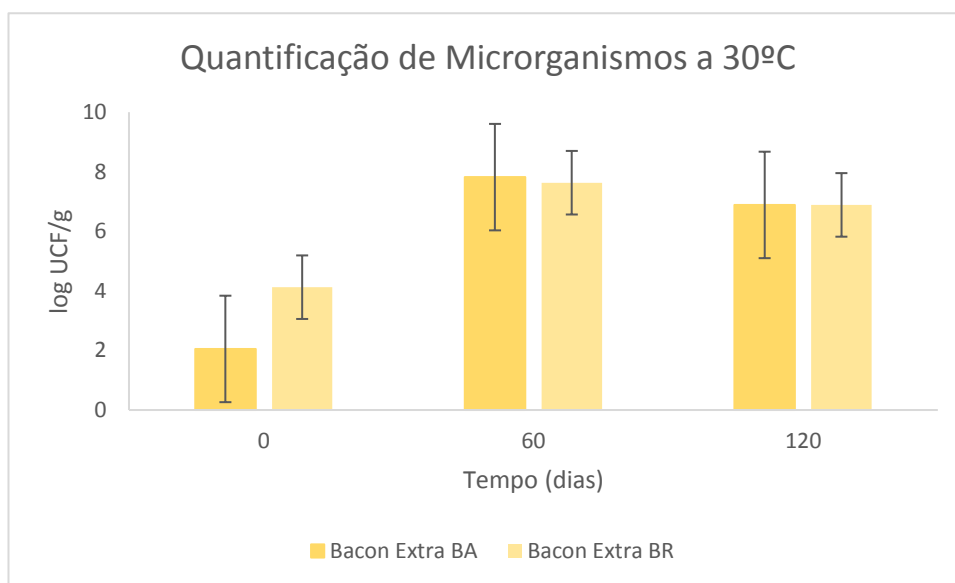


Figura 40. Quantificação de microrganismos a 30 °C ao longo do tempo para cada uma das duas formulações de bacon extra (BA e BR).

De acordo com a figura 38 e com a tabela 4, em anexo, verifica-se que o bacon extra apresenta níveis de microrganismos totais aeróbicos iniciais substancialmente superiores nas amostras BR. O crescimento apresentado ao fim de 60 dias resulta principalmente do desenvolvimento de, presumivelmente, bactérias lácticas (após coloração de Gram e reação de catalase de colónias isoladas). O pico de aproximadamente 8 log UFC/g deve-se assim, em princípio ao desenvolvimento de bactérias lácticas, tal como no chouriço. Estas bactérias fermentam os açúcares presentes na carne, produzindo ácido láctico, sendo esta

acidificação fundamental, pois baixa o pH do produto, o que é fundamental para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e detereorativos. A diminuição apresentada ao fim de 120 dias pode ser explicada pelos efeitos indiretos da desidratação do produto, nomeadamente uma diminuição da a_w , e um aumento da concentração de sal e dos ácidos orgânicos entretanto produzidos. Conforme consta na tabela 8, em anexo, no BA para t_0 , t_{60} e t_{120} dias o pH foi de 6.54, 5.44 e 5.10, respetivamente e no BR para o t_0 , t_{60} e t_{120} o pH foi de 5.85, 5.33 e 5.10. A combinação da baixa atividade de água e pH conduz à inibição do crescimento de microrganismos, incluindo a flora ativa na fase inicial.

Os restantes parâmetros microbiológicos analisados: contagem de *Enterobacteriaceae*, contagem de *estafilococos coagulase positiva*, contagem *Escherichia coli*, deteção de *Campylobacter* spp., deteção de *Listeria monocytogenes*, deteção de *Salmonella* spp. e deteção e contagem Esporos de clostrídios sulfito-redutores deram ausentes ou com valores inferiores ao limite de deteção do método, conforme consta da tabela 6, em anexo.

5.3.2. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do bacon extra

Foi realizada uma ACP para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos no bacon extra para 0, 60 e 120 dias de armazenamento, à semelhança dos restantes produtos. A figura 39 mostra as quatro componentes principais com valores próprios superiores a 1 (Critério de Kaiser) e que agrupam 90.7 % das variáveis estudadas.

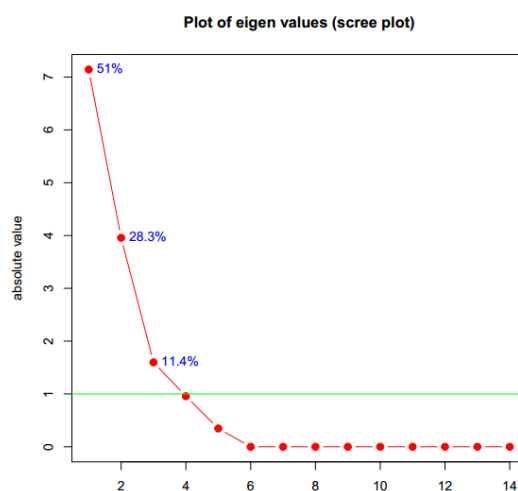


Figura 41. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nas duas formulações do bacon extra ao longo do tempo (0, 60 e 120 dias).

A figura 40 mostra a representação de CP1 e CP2 com 92.9 % das variáveis.

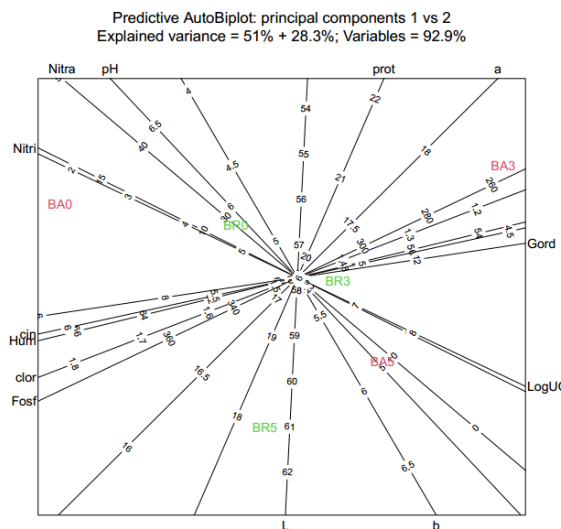


Figura 42. Representação gráfica da CP1 e CP2. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados: pH, proteína, microrganismos a 30 °C, parâmetros de cor a*, b* e L*, fosforo, cloretos, humidade, nitratos, nitritos, gordura e cinza.

A figura 40 não evidenciou uma separação clara entre os grupos BA e BR nos parâmetros correlacionados. Nos parâmetros físico-químicos analisados as formulações apresentam valores próximos pelo que, não existe diferenciação nas variáveis analisadas. BA0 tem uma percentagem de nitritos e pH superior às restantes amostras, mas ao longo do tempo ambas as formulações apresentam um comportamento similar, diminuindo até um valor mínimo a quantidade de nitritos e nitratos, e que mantem a conservação do produto até 120 dias de conservação.

A figura 41 mostra a representação de CP1 e CP3 com apenas 57.1 % das variáveis.

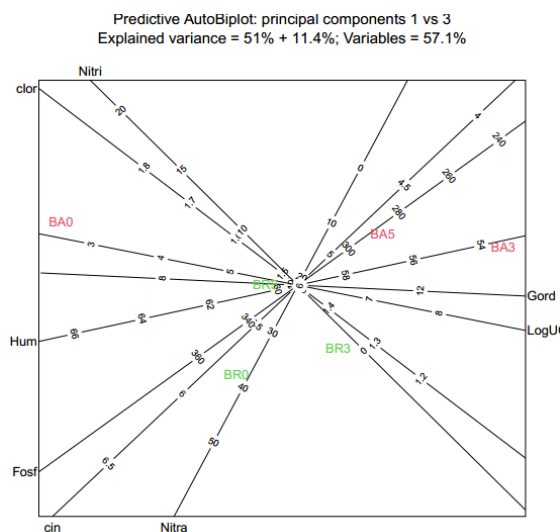


Figura 43. Representação gráfica da CP1 e CP3. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados: microrganismos a 30 °C, gordura, nitratos, nitritos, fosforo, cloretos, humidade e cinza.

A Figura 41 mostra uma ligeira distinção entre os grupos BA e BR, nas variáveis fósforo, cinza e nitratos, com maiores valores em BR. A formulação BR parece ter maior concentração de nitrato, no entanto, o somatório dos nitritos e nitratos ($\text{mg N-NO}_3^-/\text{kg} + \text{mg N-NO}_2^-/\text{kg}$) nesta formulação mantem-se ao longo da conservação e próxima da formulação atual, pela conversão do nitrito em nitrato, o que mantem a proteção do produto até ao final do ensaio. BA0 distingue-se mais uma vez pelo valor superior em cloretos e nitritos, à semelhança da correlação de CP1 e CP2.

A figura 42 mostra a representação de CP2 e CP3 com 35.7 % das variáveis.

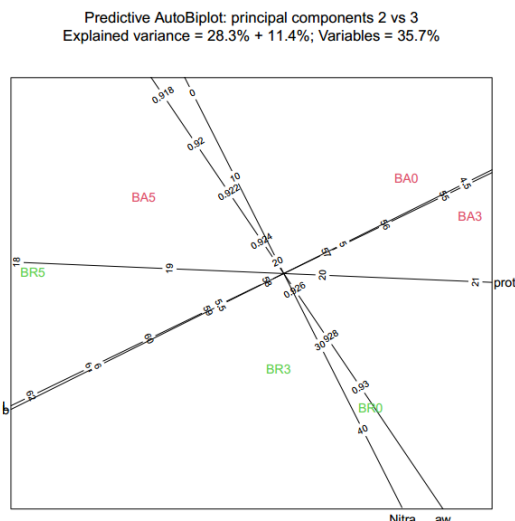


Figura 44. Representação gráfica da CP2 e CP3. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 60 e 120 dias). Parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados: nitratos, parâmetros de cor b^* e L^* , proteína, atividade da água.

A Figura 42 revela uma diferença entre os grupos BA e BR, no parâmetro b e L de cor, com maior predominância em BR, atribuído fundamentalmente ao nitrito adicionado que tem interferência direta na cor dos produtos. A menor concentração de nitrito adicionado leva a uma menor conversão da mioglobina em nitrosomioglobina e a uma maior formação de metamioglobina, pigmento de tonalidade amarelada ou acastanhada que reflete mais luz, aumentando a luminosidade observada. Embora represente menor proporção da variabilidade total, esta figura complementa as correlações das componentes principais anteriores, ao evidenciar a importância das variáveis associadas à estabilidade físico-química nos tratamentos do grupo BA.

maiores valores de pH, atividade de água e nitratos, o que indica menor estabilidade físico-química e maior suscetibilidade à deterioração microbiológica. Por outro lado, teores mais elevados de nitrato inicial podem refletir um estágio inicial do processo de cura ou um maior potencial de conservação futura, uma vez que o nitrato pode ser gradualmente convertido em nitrito, contribuindo para a formação da cor característica e para a estabilidade do produto. A ACP evidenciou perfis semelhantes entre os grupos BA e BR, com ambas as formulações a variar no tempo.

A figura 45 mostra a representação de CP1 e CP3 com 46.2 % das variáveis.

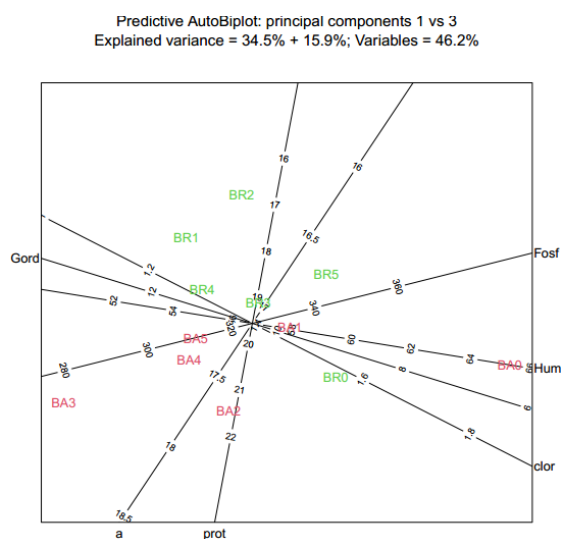


Figura 47. Representação gráfica da CP1 e CP3. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: parâmetros de cor a^* , humidade, cloretos, fosforo, gordura e proteína.

A Figura 45 evidencia que o grupo BA manteve-se associado aos parâmetros de cor a^* e proteína, em contraste com a formulação BR, o que indica maior estabilidade de cor ao longo do tempo. Nas restantes variáveis analisadas não são detetadas diferenças em ambas as formulações.

A figura 46 mostra a representação de CP2 e CP3 com 46.2 % das variáveis.

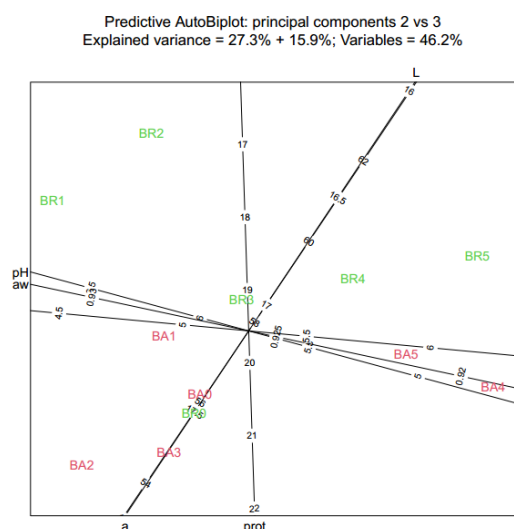


Figura 48. Representação gráfica da CP2 e CP3. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros físico-químicos analisados: parâmetros de cor a^* e L^* , pH, a_w e proteína.

A figura 46 demonstra que ao longo do tempo, produtos cárneos tendem a reduzir o pH e a_w , como resultado de reações bioquímicas e microbiológicas, reforçando a estabilidade físico-química e a conservação do produto. Assim, a associação do grupo BA à proteína e cor a^* reflete estabilidade, enquanto o grupo BR, associado à luminosidade, evidencia diferenças estruturais e físicas ao longo do tempo.

O estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros físico-químicos analisados nas duas formulações do bacon extra ao longo do tempo (0,15, 30, 60, 90 e 120 dias) mostra quatro componentes principais, de acordo com a figura 43. As correlações de CP1 e CP4, CP2 e CP4, CP3 e CP4, são inferiores a 20 % pelo que, apresentam informação muito reduzida. Estes resultados demonstram mais uma vez a estabilidade do produto e das formulações, associado ao processo de fabrico deste tipo de produtos.

5.3.4. Textura

A ACP para os parâmetros de textura no bacon extra para 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento, mostra as duas componentes principais com

valores próprios superiores a 1 (Critério de Kaiser) e que agrupam 100 % das variáveis estudadas, de acordo com a figura 47.

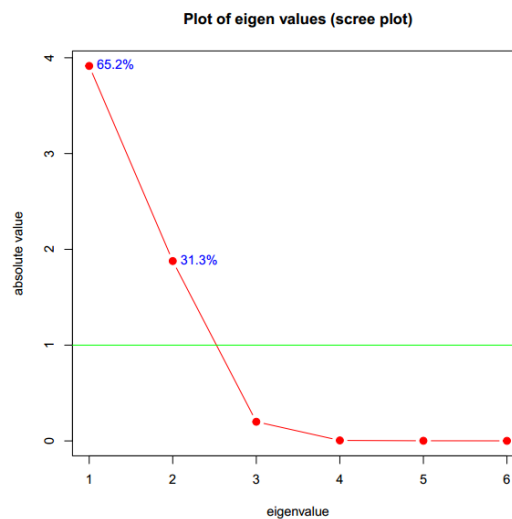


Figura 49. Estudo dos valores próprios da ACP, em valor absoluto e em percentagem (%), dos parâmetros textura analisados nas duas formulações do bacon extra ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias).

A figura 48 mostra a representação de CP1 e CP2 com 100 % das variáveis.

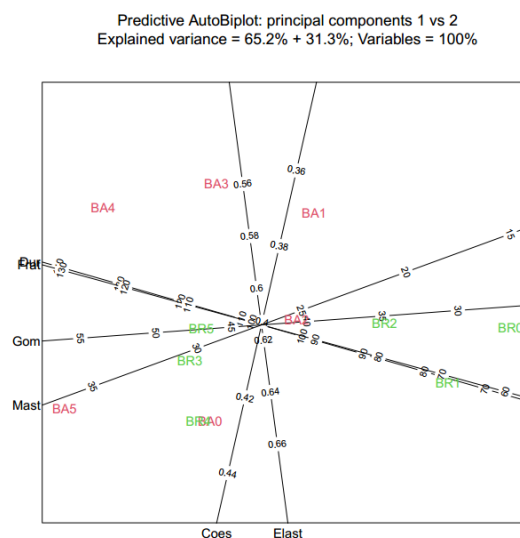


Figura 50. Representação gráfica da CP1 e CP2. BA e BR, (vermelho e verde), para cada um dos tempos analisados (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Parâmetros de textura analisados: dureza, fraturabilidade, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade.

A Figura 48 evidencia uma separação entre os grupos BA e BR, na coesividade e elasticidade, com valores superiores em BR. O tempo de armazenamento intensificou essas características. Dessa forma, a ACP destacou alguns perfis texturais diferenciados no tempo.

5.4. Resultados da pesquisa de *Campylobacter*

O DNA microbiano associado a cada amostra foi extraído e utilizado para a detecção de *Campylobacter spp.* A detecção foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando *primers* específicos direcionados aos genes *cje* (para *C. jejuni* e *C. coli*) e *mapA* (para *C. jejuni*), utilizando o sistema Biorad CFX96™ Real-Time PCR System. Foram realizadas 3 reações simplex: uma reação de amplificação do gene *cej* (figura 49), outra do gene *mapA* (figura 50) e outra (controle interno) da região V3 do 16S rDNA V3 (figura 51), separadamente. 6,5 µL de iTaq Supermix, 0,5 primer F (forward), 0,5 primer R (reverse), 1,5 H₂O + 3 µL de DNA.

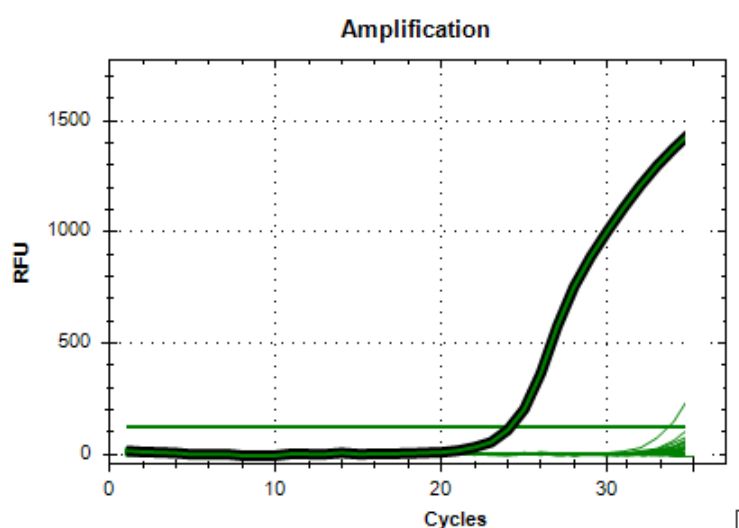


Figura 51. Reação de amplificação do gene *mapA* (para *C. jejuni*) – Controle positivo.

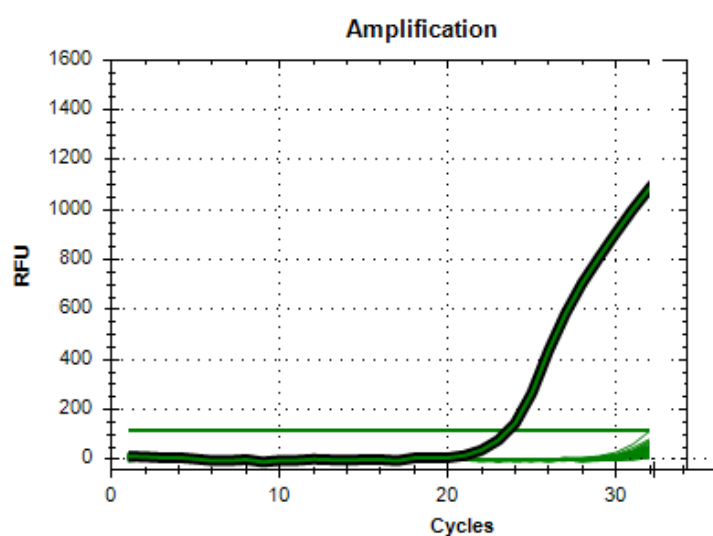


Figura 52. Reação de amplificação do gene *cej* (para *C. jejuni* e *C. coli*) – Controle positivo.

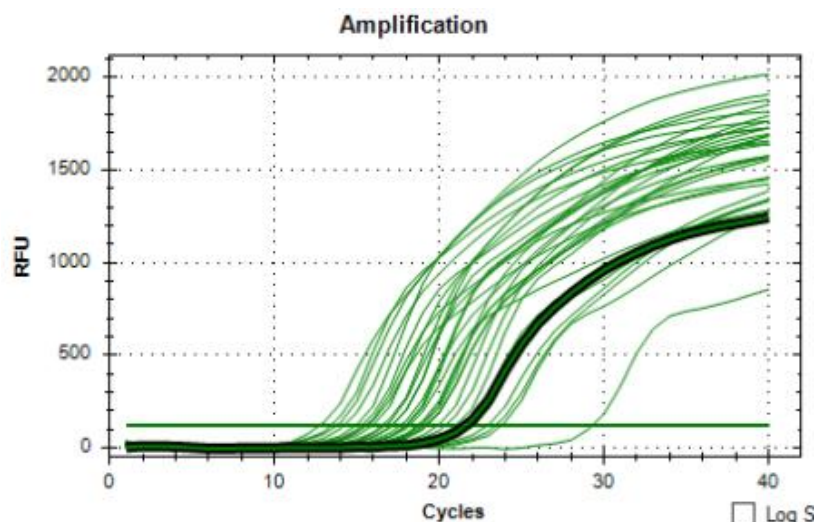


Figura 53. Reação de amplificação do (controle interno) do gene V3, onde as diferentes curvas representam as reações de amplificação de cada uma das amostras testadas, sendo que todas elas revelaram a existência de amplificação.

Atendendo a que todas as amostras demonstraram possuir DNA bacteriano amplificável (controle de amplificação, figura 51), e nenhuma das amostras ter apresentado amplificação relativa à presença do gene *mapA* ou *cje*, conclui-se pela ausência de *Campylobacter* spp. nas diferentes amostras testadas.

5.5. Discussão geral dos resultados

Todos os produtos analisados, independentemente da formulação, encontram-se dentro dos critérios definidos legalmente, sendo que, outros parâmetros analisados como, *Campylobacter* spp, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* e Clostrídios sulfito-redutores apresentam resultados satisfatórios para todas as amostras ao longo do tempo definido pela empresa, como tempo de vida útil final dos produtos (120 dias), cumprindo a legislação aplicável, o Regulamento (CE) nº 2073/2005 e respeitando as linhas de orientação internacionalmente aceites para o tipo de produtos analisados (Health Security Agency ,2025).

A empresa estipula como critérios, a nível químico: fosfatos (P_2O_5) $\leq 5g/kg$ (quantidade adicionada), nitritos em $NaNO_2$ $\leq 150\text{ mg/kg}$ (quantidade adicionada) até 9 de outubro de 2025, $a_w \leq 0.95$, $pH \leq 6.4$, e a nível microbiológico: ausência em 25 g na pesquisa de *Salmonella*, ausência em 25 g na pesquisa de *Listeria monocytogenes*, contagem de *Escherichia coli* $\leq 1 \times 10^1$ UFC/g e contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva $\leq 1 \times 10^2$ UFC/g. No

presente trabalho a quantificação de microrganismos aeróbios foi realizada no início (t_0), a meio (t_{60}) e no fim do tempo de vida útil (t_{120}) previamente definido pela empresa. Verificaram-se níveis relativamente elevados (10^7 - 10^8 UFC/g) de microrganismos aeróbios totais ao fim de 60 dias, mas com uma diminuição significativa no fim do tempo de vida útil, o que poderá dever-se à desidratação do produto (tal como constatada nas análises físico-químicas) e também na produção de ácidos orgânicos que levam a uma acidificação que, por si só, contribui de forma significativa para uma inibição do desenvolvimento microbiano. Como referido pela UK Health Security Agency (2025) contagens superiores a 10^6 UFC/g encontram-se geralmente associadas a um microrganismo predominante, sendo que nos produtos cárneos, como os analisados, a microbiota consiste, frequentemente, quase inteiramente em bactérias lácticas. De facto, a análise de várias colónias da flora microbiana que cresceu em condições aeróbias a 30 °C mostrou ser essencialmente composta por microrganismos Gram positivo, catalase negativa, o que é compatível com uma identificação presuntiva como bactérias lácticas, microrganismos que, como referido, estão normalmente presentes neste tipo de produtos e que não provocam a sua deterioração, exceto se os níveis ultrapassarem cerca de 10^9 UFC/g. Os microrganismos totais, *E. coli* e *Enterobacteriaceae* enquadram-se como indicadores microbiológicos, cuja presença em níveis superiores aos aceitáveis poderá revelar potencial contaminação fecal, contaminação ambiental (através de equipamentos, ar, superfícies, água, utensílios), deficiências higio-sanitárias nas etapas de processamento, manipulação, e potencial risco indireto à saúde, pois a sua presença pode estar associada a falhas que igualmente permitem a sobrevivência ou entrada de microrganismos patogénicos.

Os resultados obtidos nos três produtos cárneos analisados (chouriço de carne corrente colorau, fiambre da perna e bacon extra), para ambas as formulações (A com teor atual de nitrito e R com teor reduzido), demonstraram que todas as amostras se mantiveram dentro dos limites legais estabelecidos pelo Regulamento (CE) nº 2073/2005 ao longo dos 120 dias de armazenamento. A conformidade com os critérios microbiológicos foi assim verificada para os seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *estafilococos coagulase positiva*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

spp., *Bacillus cereus* e clostrídios sulfito-redutores, os quais se apresentaram em conformidade com os limites definidos pelas linhas de orientação da UK Health Security Agency (2025). Assim, a redução do teor de nitrito não comprometeu a segurança microbiológica dos produtos em estudo, evidenciando que a formulação reduzida (R) é viável do ponto de vista da segurança alimentar.

Relativamente à evolução da microbiota, verificou-se um aumento das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos até aproximadamente os 60 dias de conservação, seguido de uma redução até ao final do prazo estipulado (t_{120}). Este comportamento pode estar associado ao desenvolvimento predominante de bactérias ácido-láticas, capazes de fermentar os hidratos de carbono presentes na matriz cárnea, conduzindo à produção de ácidos orgânicos, nomeadamente ácido láctico, com consequente diminuição do pH. Paralelamente, a desidratação do produto ao longo do tempo reduz a atividade da água (a_w), promovendo um ambiente menos favorável ao desenvolvimento microbiano. Este efeito foi particularmente notório no chouriço de carne corrente colorau e no bacon extra, onde a perda de humidade contribuiu para a estabilização microbiológica final.

Relativamente aos parâmetros físico-químicos, a evolução das formulações A e R revelou tendências semelhantes ao longo do armazenamento, com pequenas variações associadas ao teor inicial de nitrito. A análise de componentes principais (ACP) permitiu identificar os parâmetros mais influentes na diferenciação entre tempos e formulações em cada produto. No chouriço de carne corrente colorau, a ACP evidenciou a associação entre a redução da humidade (em CA de 17.7%, e em CR de 28.6%) e da atividade da água (a_w) com o aumento relativo da concentração de nitratos, cloretos e cinzas ao longo do tempo, bem como a influência do pH na diferenciação entre formulações. No fiambre da perna, destacaram-se os parâmetros cor (a^* e L^*), gordura e proteína como principais determinantes da variabilidade, refletindo a estabilidade da matriz sob refrigeração. Já no bacon extra, as componentes principais agruparam as variáveis de textura (dureza, mastigabilidade e coesividade) e gordura, demonstrando que a formulação com menor teor de nitrito apresentou maior variação estrutural ao longo da conservação. Globalmente, constatou-se que, apesar das diferenças iniciais entre as formulações A e R, os parâmetros

físico-químicos convergiram no final do período experimental, sugerindo que a redução de nitritos não comprometeu a estabilidade global dos produtos.

Atualmente os teores máximos são expressos em nitrito de sódio ou nitrato de sódio, os teores máximos revistos devem ser expressos em iões nitrito e nitrato, respetivamente, em conformidade com as DDA estabelecidas pela Autoridade. Relativamente ao bacon, quando é considerada a soma de quantidade de nitratos e nitritos ($\text{mg N-NO}_3^-/\text{kg} + \text{mg N-NO}_2^-/\text{kg}$), verifica-se que no tempo zero (BA0) a formulação atual apresenta um valor 13% superior à formulação reduzida (9.11 e 7.94 mg N/kg) e que ao longo do tempo de conservação, o decréscimo foi mais acentuado na formulação atual.

Assim sendo, ao fim dos 120 dias, em média, o nitrito residual, em iões nitrito, foi de 3.20 mg NO_2^-/kg para CA, de 3.05 mg NO_2^-/kg para CR, de 3.53 mg NO_2^-/kg para FA, de 3.19 mg NO_2^-/kg para FR, de 0.99 mg NO_2^-/kg para BA e de 2.28 mg NO_2^-/kg para BR, ou seja, a quantidade residual máxima proveniente de todas as fontes para o produto pronto para comercialização durante todo o prazo de conservação do produto não excede os 45 mg/kg, expressa em iões NO_2^- estipulada no Regulamento (UE) 2023/2108, conforme consta da tabela 3, abaixo. No bacon extra observou-se um valor residual de nitrito em BR maior que em BA, apesar do somatório de nitritos e nitratos (mg N/kg) ser semelhante nas duas formulações, o que mantém o produto em condições de conservação.

Tabela 3. Tabela comparativa dos resultados obtidos, de ião nitrato e ião nitrito, no final do tempo de vida útil dos 6 produtos em análise.

Formulação	Tempo (dias)	Nitratos		Nitritos	
		NO_3^- (mg/kg)		NO_2^- (mg/kg)	
		A	R	A	R
Chouriço de carne corrente colorau	0	23,096	28,261	27,431	22,792
	120	8,646	6,619	3,204	3,045
Fiambre da Perna	0	31,375	28,314	3,477	1,865
	120	29,561	25,184	3,526	3,194
Bacon Extra	0	22,944	32,636	12,962	1,876
	120	3,999	8,772	0,989	2,285

Nos parâmetros físico-químicos, entre as formulações FA e FR, os parâmetros a_w , humidade, cinza, cloretos, proteína, gordura e fósforo não apresentaram correlação direta com os nitritos adicionados, podendo variar conforme a matéria-prima. Observou-se uma redução esperada dos nitritos adicionados, atingindo níveis residuais de 3 a 4 iões de nitrito. Verificou-se ainda que nitratos e nitritos variam inversamente com o crescimento microbiano, dado que atuam como agentes antimicrobianos.

Existe ainda uma correlação entre outros estudos nomeadamente Karwowska et al. (2019) que avaliou os diferentes níveis de nitrito de sódio (0, 50, 100 e 150 mg/kg) em salsichas cozidas durante 15 dias de refrigeração e concluiu que 50 mg/kg de nitrito manteve qualidade físico-química e antioxidante semelhante ao controlo (150 mg/kg), sugerindo ser possível reduzir o teor de nitrito sem comprometer a estabilidade (Karwowska et al., 2019). Ainda, Marco et al. (2006) estudou a redução gradual de nitrito em linguiça e verificaram que essa redução resultou em menor intensidade de cor vermelha (valor a^*) (Marco et al., 2006).

Dessa forma, a análise integrada dos resultados microbiológicos e físico-químicos confirma a viabilidade tecnológica e da segurança alimentar da formulação com teor reduzido de nitrito, sustentando as conclusões apresentadas neste estudo.

6. Conclusões

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com uma empresa de produção e comercialização de produtos cárneos e consistiu na comparação de duas concentrações de nitritos utilizadas na produção de três produtos em estudo: chouriço de carne corrente, fiambre da perna e bacon extra ao longo de 120 dias de conservação. A quantidade de nitritos escolhida teve como objetivo o cumprimento do Regulamento (UE) 2023/2108. Os produtos foram caracterizados em parâmetros físico-químicos e microbiológicos ao longo do tempo, com o objetivo de avaliar o impacto da redução de sal nitrificado relativamente à formulação atualmente comercializada que cumpre o Regulamento (CE) nº 1333/2008.

As análises microbiológicas realizadas para quantificação de *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *estafilococos coagulase positiva* e deteção e quantificação de esporos clostridio sulfito-redutores foi inferior a 10 UFC/g. A deteção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* foi ausente em 25 g. A deteção de *Campylobacter spp.* foi ausente em 10 g. Os microrganismos a 30 °C ao fim dos 120 dias cumprem com os valores indicativos constantes nas linhas de orientação da UK Health Security Agency (2025), embora com níveis superiores na formulação R.

A formulação A apresenta maior concentração de nitrito que a formulação R. Ao fim de 120 dias de armazenamento, os níveis residuais de iões nitrito e iões nitrato tendem a se igualar-se entre as formulações diferentes, independentemente da quantidade inicial adicionada pois deve existir sempre uma quantidade residual para o que o produto se mantenha estável e sem perigo de crescimento microbiológico.

Ao longo do tempo de vida útil dos produtos cárneos, observa-se uma redução gradual do nitrito e a conversão progressiva do nitrato em nitrito, até que se atinja um estado de equilíbrio, independentemente da quantidade inicial adicionada. O nitrito reage principalmente com a mioglobina da carne, originando a nitrosomioglobina, pigmento responsável pela cor característica e pela capacidade de inibir microrganismos patogénicos. Paralelamente, o nitrito pode ser consumido em reações com aminoácidos, proteínas e lipídios, ou ainda

convertido em óxido nítrico, contribuindo para diferentes transformações químicas durante o armazenamento.

Como conclusão final deste estudo, a adição de 75 mg/Kg de nitrito de sódio ao chouriço de carnes corrente de colorau, fiambre da perna e bacon extra, de acordo com Regulamento (UE) 2023/2108 relativo às quantidades de nitrato e nitritos e com o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo aos critérios microbiológicos, demonstra que, todos os produtos se mantêm satisfatórios até ao final do tempo de conservação de 120 dias nos parâmetros analisados neste estudo. Nos restantes parâmetros analisados, atividade da água, textura, humidade, cinza, cloretos, proteínas, gorduras e fósforo, verificaram-se algumas variações ao longo do tempo. Contudo, apenas uma análise sensorial poderá determinar a real relevância dessas alterações para a qualidade do produto.

O pH baixo potencializa a ação antimicrobiana do nitrito, pois favorece a formação de ácido nitroso, espécie química ativa contra microrganismos. Já o nitrato (naturalmente presente, ou de origem de conversão nitrito a nitrato) funciona como uma fonte de nitrito ao longo do tempo, garantindo efeito prolongado durante o tempo de vida útil do produto. Verificou-se que para os 3 produtos, chouriço de carne corrente colorau, fiambre da perna e bacon extra, não existem diferenças significativas, em termos microbiológicos, considerando que a redução a nitritos não tem influência nos parâmetros microbiológicos, mantendo-se ajustado o tempo de vida útil estipulado ajustado.

Como sugestão final, e para trabalhos futuros, será importante acompanhar estes estudos com testes sensoriais, para avaliação da sua aceitabilidade nas alterações de cor, sabor, aroma e textura dos produtos com diferentes teores de nitrito. Podendo ainda testar o uso de alternativas naturais (extratos vegetais ricos em nitrato, antioxidantes naturais) como substitutos do nitrito. Avaliar ainda o impacto da redução de nitrito em condições de armazenamento e distribuição menos controladas, simulando a realidade do mercado.

7. Referências Bibliográficas

- Authrity, E. F. S. (2017). *EFSA confirms safe levels for nitrites and nitrates added to food*. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/170615>
- Comissão Europeia. (2024). DECISÃO (UE) 2024/1225 DA COMISSÃO de 30 de abril de 2024 relativa às disposições nacionais notificadas pela Dinamarca respeitantes à adição de nitritos a determinados produtos à base de carne. *Jornal Oficial da União Europeia*, 6, 13–22.
- EFSA Journal. (2024). The European Union One Health 2023 Zoonoses report. *EFSA Journal*, 22(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.9106>
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78(1–2), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.030>
- Hord, N. G., Tang, Y., & Bryan, N. S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: The physiologic context for potential health benefits. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1), 1–10. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27131>
- ISO 10272-1. (2023). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. — Part 1: Detection method — Amendment 1: Inclusion of methods for molecular confirmation and identification of thermotolera* (ISO 10272-1:2017/Amd 1:2023).
- ISO 11290-1. (2017). *Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. -- Part 1: Detection method* (ISO 11290-1:2017).
- ISO 1442. (2023). *Meat and meat products — Determination of moisture content — Reference method*.
- ISO 1443. (1973). *Meat and meat products — Determination of total fat content*.
- ISO 15213-1. (2023). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. — Part 1: Enumeration of sulfite-reducing Clostridium spp. by colony-count technique* (ISO 15213-1:2023).
- ISO 16649-2. (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal*

- method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli -- Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide (ISO 16649-2:2001).*
- ISO 1841. (1996). *Meat and meat products — Determination of chloride content.*
- ISO 21528-2. (2017). *Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -- Part 2: Colony-count technique (ISO 21528-2:2017).*
- ISO 23776. (2021). *Meat and meat products — Determination of total phosphorous content.*
- ISO 3091. (1975). *Meat and meat products — Determination of nitrate content (Reference method).*
- ISO 4833. (2022). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique — Amendment 1: Clarification of scope (ISO 4833-1:2013/AMD1:2022).*
- ISO 6579. (2020). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp. — Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the stat (ISO 6579-1:2017/AMD 1:2020).*
- ISO 6887. (2017). *Microbiology of the food chain -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions (ISO 6887-1:2017).*
- ISO 6888-1. (2023). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) — Part 1: Method using Baird-Parker agar medium — Amendment 1 (ISO 6888-1:2021/Amd 1:2023).*
- ISO 7218. (2024). *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations (ISO 7218:2024).*
- ISO 936. (1998). *Meat and meat products — Determination of total ash.*

ISO 937. (2023). *Meat and meat products — Determination of nitrogen content — Reference method.*

Karwowska, M., Kononiuk, A., & Wójciak, K. M. (2019). Impact of sodium nitrite reduction on lipid oxidation and antioxidant properties of cooked meat products. *Antioxidants*, 9(1).
<https://doi.org/10.3390/antiox9010009>

Lee, S., Lee, H., Kim, S., Lee, J., Ha, J., Choi, Y., Oh, H., Choi, K. H., & Yoon, Y. (2018). Microbiological safety of processed meat products formulated with low nitrite concentration - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(8), 1073–1077. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0675>

Manuela, M., & Almeida, F. De. (1996). *O risco da listeriose e a identificação do perigo - Revisão The risk of listeriosis and hazard identification - A review.*

Marco, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*, 73(4), 660–673.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.011>

Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Domenico, A. Di, Dusemund, B., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-remy, U., Leblanc, J., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Oskarsson, A., Parent-massin, D., Stankovic, I., Waalkens-berendsen, I., Woutersen, R. A., Wright, M., ... Pizzo, F. (2017). *Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives.* 15(7632). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4786>

Muyzer, G., Waal, E. C. D. E., & Uitierlinden, A. G. (1993). *Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA.* 59(3), 695–700.

Nikolova, A. S., & Belichovska, D. (2024). the Effect of Nitrite Use in Meat Products on Human Health. *KNOWLEDGE-International Journal*, 63(3), 2008–2013.

Omar, S. A., Artime, E., & Webb, A. J. (2012a). A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 26(4), 229–

240. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.008>

Omar, S. A., Artime, E., & Webb, A. J. (2012b). Nitric Oxide A comparison of organic and inorganic nitrates / nitrites. *Nitric Oxide*, 26(4), 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.008>

Parlamento Europeu e do Conselho. (2021). *Regulamento (CE) N. 852/2004*. 3, 1–25.

Serôdio, G. (2022). *Nitritos e nitratos nos alimentos e possíveis riscos para a saúde*. 1–46.

Shakil, M. H., Trisha, A. T., Rahman, M., Talukdar, S., Kobun, R., Huda, N., & Zzaman, W. (2022). Nitrites in Cured Meats, Health Risk Issues, Alternatives to Nitrites: A Review. *Foods*, 11(21). <https://doi.org/10.3390/foods11213355>

UK Health Security Agency. (2025). *Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market Interpretation of test results generated by UKHSA Food Water and Environmental Microbiology Services Laboratories*. 26.

ANEXOS

Tabela 4. Tabela comparativa dos resultados obtidos nas contagens de microrganismos a 30 °C dos 6 produtos em análise.

Tempo (dias)	Produtos (UFC/g)					
	Chouriço carne corrente		Fiambre da Perna		Bacon Extra	
	CA	CR	FA	FR	BA	BR
0	6,58E+02	7,42E+02	2,67E+01	2,52E+01	1,32E+02	1,43E+04
60	2,09E+08	2,22E+08	1,40E+03	1,19E+03	7,33E+07	5,11E+07
120	1,54E+06	1,61E+07	1,15E+03	1,75E+05	9,36E+06	9,87E+06

Tabela 5. Tabela comparativa dos resultados obtidos, de nitrato, em $N-NO_3^-$ (mg/kg) e nitrito, em $N-NO_2^-$ (mg/kg) no t0 e t120 dos 6 produtos em análise.

Formulação	Tempo (dias)	Nitratos		Nitritos		Nitratos + Nitritos	
		$N-NO_3^-$ (mg/kg)		$N-NO_2^-$ (mg/kg)		$N-NO_3^- + N-NO_2^-$ (mg/kg)	
		A	R	A	R	A	R
Chouriço de carne corrente colorau	0	5,21	6,38	8,31	6,91	13,52	13,29
	120	1,95	1,49	0,97	0,92	2,92	2,41
Fiambre da Perna	0	7,08	6,39	1,05	0,57	8,13	6,96
	120	6,67	5,69	1,07	0,97	7,74	6,66
Bacon Extra	0	5,18	7,37	3,93	0,57	9,11	7,94
	120	0,90	1,98	0,30	0,69	1,20	2,67

Tabela 6. Tabela comparativa dos resultados obtidos nos restantes parâmetros em análise dos 6 produtos em análise.

Parâmetro analisado	Norma de referência	Tempo (dias)	Chouriço carne corrente colorau		Fiambre de perna		Bacon extra	
			CA	CR	FA	FR	BA	BR
Contagem de Enterobacteriaceae (UFC/g)	ISO 21528-2:2017	0	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
		60	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
		120	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
Contagem de estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	ISO 6888-1:2021 ISO 6888-1:2021/Amd 1:2023	0	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
		60	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
		120	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
Contagem Escherichia coli (UFC/g)	ISO 16649-2:2001	0	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
		60	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
		120	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
Deteção de Campylobacter spp.	ISO 10272-1:2017 ISO 10272-1:2017/Amd 1:2023	0	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g
		60	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g
		120	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g	Ausente em 10g
Deteção de Listeria monocytogenes	ISO 11290-1:2017	0	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g
		60	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g
		120	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g
Deteção de Salmonella spp.	ISO 6579-1:2017	0	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g
		60	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g
		120	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g
Deteção e contagem Esporos Clostridio Sulfitorreductores (UFC/g)	ISO 15213-1:2023	0	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00
		60	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00
		120	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00	<1,0E+00

Tabela 7. Quadro síntese dos valores médios obtidos nas análises físico químicas realizadas ao chouriço de carne corrente colorau (CA e CR).

Amostra	pH	a _w	Parâmetros de cor L*	Parâmetros de cor a*	Parâmetros de cor b*	Dureza (Newton)	Fraturabilidade (Newton)	Humidade (%)	Cinza (%)	Cloretos (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Nitratos (mg KNO ₃ /kg)	Nitratos (mg NaNO ₃ / kg)	lão Nitrato	Nitritos (mg NaNO ₂ /kg)	lão Nitrito	Nitratos+Nitritos (mg N/ kg)	Fósforo (mg P/100 g)
CA-2	5,99							59,83	3,93	1,03	11,34	13,33	30,52	25,65	18,73	85,07	56,99	21,50	177,29
CA0	6,11	0,918	50,91	26,65	20,36	44,26	38,65	49,93	4,64	1,62	18,50	11,57	37,64	31,64	23,10	40,94	27,43	13,53	228,25
CA1	6,10	0,919	51,40	25,97	21,83	50,11	38,89	49,67	4,68	1,52	18,34	12,67	75,64	63,59	46,42	11,40	7,64	12,79	218,07
CA2	5,44	0,912	49,97	26,42	19,98	56,07	48,03	49,17	4,56	1,61	18,83	10,69	47,13	39,62	28,93	6,53	4,38	7,86	239,02
CA3	4,93	0,918	50,03	26,96	20,55	60,86	54,17	46,15	4,37	1,49	17,89	11,16	33,86	28,47	20,78	4,57	3,06	5,62	225,81
CA4	4,79	0,918	50,23	26,67	19,63	61,38	53,05	49,67	4,65	1,31	18,87	13,68	12,73	10,70	7,81	4,85	3,25	2,75	225,21
CA5	5,19	0,921	53,57	23,74	21,91	64,42	57,89	49,23	4,62	1,48	15,69	16,79	14,09	11,84	8,65	4,78	3,20	2,92	220,99
CR-2	6,09							62,12	2,87	0,47	15,33	13,43	15,56	13,08	9,55	34,65	23,22	9,19	156,70
CR0	6,15	0,925	57,02	23,00	23,06	48,56	43,20	48,13	4,16	1,27	19,21	15,77	46,05	38,71	28,26	34,02	22,79	13,29	225,43
CR1	6,15	0,934	53,93	23,87	22,48	52,20	48,06	46,19	3,72	1,07	20,84	16,48	47,57	39,99	29,19	13,84	9,27	9,40	219,85
CR2	5,44	0,912	53,90	24,11	22,87	56,24	50,14	46,98	3,63	1,10	19,01	19,17	32,21	27,07	19,76	6,67	4,47	5,82	225,97
CR3	5,34	0,921	53,82	24,10	22,12	58,17	49,43	45,18	3,68	0,96	20,13	16,23	16,50	13,87	10,12	4,51	3,02	3,20	226,47
CR4	5,39	0,909	53,57	23,74	21,91	64,42	57,89	47,10	3,86	1,02	20,87	16,09	9,64	8,10	5,91	5,19	3,47	2,39	229,98
CR5	5,63	0,927	53,35	21,14	25,95	60,05	53,91	44,38	3,62	1,18	17,92	18,66	10,79	9,07	6,62	4,55	3,05	2,42	233,44

Tabela 8. Quadro síntese dos valores médios obtidos nas análises físico químicas realizadas ao fiambre da perna (FA e FR).

Amostra	pH	a _w	Parâmetros de cor L*	Parâmetros de cor a*	Parâmetros de cor b*	Dureza (Newton)	Fraturabilidade (Newton)	Elasticidade	Coesividade	Gomosidade (Newton)	Mastigabilidade (N/mm)	Humidade (%)	Cinza (%)	Cloretos (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Nitratos (mg KNO ₃ /kg)	Nitratos (mg NaNO ₃ / kg)	Ião Nitrato	Nitritos (mg NaNO ₂ /kg)	Ião Nitrito	Nitratos+Nitritos (mg N/ kg)	Fósforo (mg P/100 g)
FA-2	8,23																						
FA0	6,36	0,955	65,29	15,57	3,07	57,19	51,10	0,61	0,39	22,05	13,56	77,42	3,41	0,76	15,29	1,63	51,13	42,98	31,38	5,19	3,48	8,14	225,77
FA1	6,03	0,952	64,32	16,59	3,82	59,17	51,11	0,63	0,36	21,04	13,49	78,05	3,73	0,77	14,40	1,79	52,43	44,08	32,18	3,88	2,60	8,05	245,11
FA2	6,84	0,954	63,94	16,62	3,17	54,02	49,09	0,59	0,39	21,07	12,74	78,44	3,65	0,89	14,43	1,30	59,65	50,14	36,60	6,95	4,66	9,68	245,20
FA3	6,83	0,952	64,74	16,11	2,70	63,49	57,06	0,60	0,37	23,47	14,24	78,15	3,72	0,83	14,67	1,26	47,95	40,31	29,43	2,06	1,38	7,06	245,20
FA4	6,11	0,952	65,10	15,98	2,96	78,66	70,26	0,60	0,38	29,65	17,93	77,93	3,80	0,89	12,84	1,25	46,47	39,07	28,52	7,11	4,76	7,88	248,41
FA5	6,23	0,955	64,85	16,45	3,28	67,51	58,33	0,65	0,41	27,58	18,05	78,14		0,76	12,10	1,27	48,17	40,49	29,56	5,26	3,53	7,74	245,10
FR-2	8,37																						
FR0	6,78	0,955	65,11	15,83	3,53	58,73	53,61	0,64	0,38	22,47	14,51	78,09	3,32	0,85	14,65	1,64	46,14	38,79	28,31	2,78	1,86	6,96	237,71
FR1	6,17	0,955	65,98	15,02	2,38	48,32	44,28	0,61	0,39	18,84	11,78	77,03	3,65	0,76	14,49	1,38	42,66	35,87	26,18	8,80	5,90	7,70	244,32
FR2	6,82	0,953	65,46	15,82	2,88	52,01	50,10	0,57	0,39	20,17	11,55	79,37	3,80	0,83	12,33	0,96	31,65	26,61	19,42	1,40	0,94	4,67	256,29
FR3	6,16	0,954	65,63	15,54	3,18	56,88	53,18	0,58	0,35	19,80	11,75	79,38	3,63	0,72	11,74	1,01	42,64	35,84	26,17	5,00	3,35	6,92	244,77
FR4	6,14	0,956	64,11	15,64	2,86	70,16	56,31	0,65	0,34	24,18	15,86	78,96	3,67	0,70	13,70	1,11	41,04	34,50	25,18	3,84	2,57	6,46	227,78
FR5	6,25	0,952	65,20	15,70	3,26	70,03	53,33	0,66	0,37	25,87	17,16	78,46	3,49	0,88	14,65	0,74	41,04	34,50	25,18	4,77	3,19	6,65	217,79

Tabela 9. Quadro síntese dos valores médios obtidos nas análises físico químicas realizadas ao Bacon extra (BA e BR).

Amostra	pH	a _w	Parâmetros de cor L*	Parâmetros de cor a*	Parâmetros de cor b*	Dureza (Newton)	Fraturabilidade (Newton)	Elasticidade	Coesividade	Gomosidade (Newton)	Mastigabilidade (N/mm)	Humidade (%)	Cinza (%)	Cloretos (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Nitratos (mg KNO ₃ /kg)	Nitratos (mg NaNO ₃ / kg)	lão Nitrato	Nitritos (mg NaNO ₂ /kg)	lão Nitrito	Nitratos+Nitritos (mg N/ kg)	Fósforo (mg P/100 g)
BA-2 8,07																							
BA0	6,54	0,925	55,81	16,55	4,03	108,14	98,01	0,63	0,44	47,60	30,24	65,17	5,55	1,78	19,67	6,49	37,39	31,43	22,94	19,35	12,96	9,11	356,40
BA1	6,11	0,926	56,18	16,89	4,29	103,94	95,27	0,56	0,38	38,94	22,09	55,69	4,60	1,51	19,88	9,68	36,59	30,76	22,45	2,47	1,65	5,57	339,79
BA2	6,54	0,929	53,20	18,08	5,15	99,86	94,25	0,61	0,40	40,59	25,53	52,40	4,98	1,34	21,34	10,19	29,32	24,65	18,00	2,43	1,63	4,56	356,97
BA3	5,44	0,927	54,85	18,00	4,98	121,95	113,82	0,57	0,36	44,63	26,39	52,08	4,44	1,23	21,87	14,25	11,33	9,52	6,95	2,13	1,43	2,00	244,68
BA4	4,72	0,917	58,77	16,80	6,67	136,34	125,21	0,56	0,38	53,43	31,12	54,93	5,00	1,39	21,22	9,87	6,43	5,40	3,94	1,17	0,78	1,13	319,52
BA5	5,10	0,919	57,95	17,40	6,02	130,42	124,86	0,64	0,43	56,37	36,50	57,55	4,87	1,42	18,73	10,02	6,52	5,48	4,00	1,48	0,99	1,20	297,35
BR-2 7,87																							
BR0	5,85	0,929	56,68	17,58	5,36	69,85	64,55	0,64	0,38	26,63	17,10	60,54	6,15	1,45	19,84	9,47	53,18	44,71	32,64	2,80	1,88	7,94	336,09
BR1	6,75	0,932	58,71	17,38	4,92	76,13	68,26	0,64	0,41	31,05	20,07	52,90	4,01	1,00	17,79	10,49	30,14	25,34	18,50	5,77	3,86	5,35	304,52
BR2	6,63	0,927	59,31	16,50	4,68	87,89	78,76	0,61	0,40	35,23	21,75	53,41	4,62	1,24	16,48	12,62	35,23	29,62	21,62	2,61	1,75	5,41	337,17
BR3	5,33	0,930	59,58	17,06	5,26	115,21	109,21	0,63	0,41	47,37	30,73	60,12	4,69	1,25	20,13	10,09	30,23	25,42	18,55	3,40	2,28	4,88	339,86
BR4	5,21	0,926	60,89	16,96	6,03	113,34	102,93	0,66	0,42	47,67	31,56	54,16	4,71	1,44	19,55	11,31	15,40	12,95	9,45	4,10	2,75	2,97	320,94
BR5	5,10	0,922	61,44	16,26	5,80	117,37	106,69	0,62	0,40	46,52	29,82	61,01	5,62	1,67	18,24	10,28	14,29	12,02	8,77	3,41	2,28	2,67	347,46