



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE
PÚBLICA**

**IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS MICROBIOLÓGICOS
ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE MARANHOS**

Trabalho submetido por
Ana Isabel Teixeira Riscado Maia
para a obtenção do grau de Mestre em Nutrição Clínica

Outubro de 2013



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE PÚBLICA

IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS MICROBIOLÓGICOS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE MARANHOS

Trabalho submetido por
Ana Isabel Teixeira Riscado Maia
para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde
Pública

Trabalho orientado por
Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

e coorientado por
Mestre Maria Isabel da Silva Santos

outubro de 2013

Para o Nuno, e para as minhas filhas
Maria João e Maria Rita

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que tornaram possível a realização deste trabalho nomeadamente:

À Doutora Cristina Pintado, por ter aceitado, apoiado, incentivado, motivado, pela amizade demonstrada na orientação desta dissertação, bem como de todo o tempo dispensado na revisão desta dissertação;

À Dra. Isabel Santos, por me ter encaminhado, ter aceitado ser coorientadora nesta dissertação, agradeço todo o tempo dispensado na revisão do trabalho, na cedência de bibliografia, e por todo o apoio prestado ao longo deste trabalho;

À Eng^a Manuela Goulão, por todo o apoio prestado no desenvolvimento do trabalho no Laboratório de Microbiologia;

À Dra. Helena Martins, por todo o apoio prestado, resumos e esquemas das análises microbiológicas;

À D. Fernanda por todo o apoio e amizade demonstrada durante a realização deste trabalho;

Ao Sr. Silveira e Sr. José Manuel por todo o apoio prestado na execução das análises físico-químicas;

À Eng^a Conceição Vitorino pelo apoio prestado na determinação da atividade da água;

À Dra. Cristina Canavarro pela simpatia e apoio prestado no tratamento estatístico dos dados recolhidos.

A todas as empresas que cederam as amostras de maranho para a realização deste trabalho, nomeadamente à Casel - Produção, Industrialização Carnes Lda. (Sertã), Talho Salsicharia Verganista (Sobreira Formosa), Almeida & Filhos, Lda. (Proença – a – Nova), Salsibeira – Soc. Transformação de carnes, Lda. (Alcains), O Fumeiro da Beira – Unidade de Produção (Mação), Carnes Simões, Lda. (Sertã) e Modelo Continente – Hipermercados S.A. (Castelo Branco).

Resumo

A realização deste trabalho teve como principais objetivos identificar os perigos microbiológicos associados aos maranhos e determinar as suas características físico-químicas.

O trabalho consistiu na análise de 50 amostras de maranho (35 cruas e 15 cozidas). Todas as amostras foram analisadas tendo em conta parâmetros microbiológicos (contagem de *Escherichia coli*, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, pesquisa de *Listeria monocytogenes* e pesquisa de *Salmonella* spp.) e parâmetros físico-químicos (pH, a_w , proteína total, gordura total e teor de cloretos). Foi ainda feita a serotipagem dos isolados de *L. monocytogenes* por PCR Multiplex.

Considerando os resultados das análises microbiológicas, verificou-se ausência de *Salmonella* spp. em todas as amostras analisadas. O mesmo não se verificou para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*, tendo-se observado um total de 34% das amostras de maranho cru e 13% das amostras de maranho cozido com pesquisa positiva para esta bactéria. O serogrupo de *L. monocytogenes* mais prevalente foi o 1/2a, 3a (43%), seguido dos serogrupos 4b, 4d, 4e (29%), 1/2c, 3c (21%) e 1/2b, 3b, 7 (7%). Relativamente à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, todas as amostras apresentaram valores inferiores a $1,0 \times 10^2$. Quanto à contagem de *E. coli*, verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o nível de contaminação por esta bactéria nos maranhos crus e cozidos. Relativamente aos parâmetros físico-químicos, obtivemos valores médios de 5,13 de pH para as amostras de maranho cru e 5,89 de pH para as amostras de maranho cozido. Na determinação da atividade da água verificou-se uma grande uniformidade nos resultados obtidos, variando os valores entre 0,920 e 0,930. Quanto à percentagem de gordura total obtivemos valores médios por produtor entre 4,07% e 19,95%. A nível de percentagem de proteína total os valores médios por produtor variaram entre 10,57% e 15,89%. Relativamente ao teor de cloretos obtivemos um valor médio global, para amostras de maranho cozido e amostras de maranho cru, de 1,67%.

Dada a presença de *L. monocytogenes* em 13% das amostras de maranho comercializado cozido, concluímos que, do ponto de vista da segurança alimentar, o maranho é um produto que deve merecer uma maior atenção.

Palavras-chave: Maranhão, segurança alimentar, perigos microbiológicos, *Listeria monocytogenes*

Abstract

This work aimed to identify the microbiological hazards associated with *maranhos* (traditional Portuguese sausages) and also to determine their physicochemical characteristics.

A total of 50 samples of *maranhos* were analyzed (35 raw and 15 cooked). All samples were performed for microbiological parameters (*Escherichia coli* and coagulase-positive *Staphylococcus* enumeration, and *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection) and physicochemical parameters (pH, aw, total protein, total fat content and chlorides). It was also performed the serotyping of *L. monocytogenes* isolates by Multiplex PCR.

Considering the results of microbiological analysis, it was found absence of *Salmonella* spp. in all samples. The same was not true for the detection of *L. monocytogenes*, since a total of 34% of raw samples and 13% of cooked samples were positive for the detection of this bacterium. The most prevalent *L. monocytogenes* serogroup was 1/2a, 3a (43%), followed by 4b, 4d, 4e (29%), 1/2c, 3c (21%) and 1/2b, 3b, 7 (7%). Regarding the coagulase-positive *Staphylococcus* enumeration, all samples had values below 1.0×10^2 . Concerning the *E. coli* enumeration, significant differences ($p < 0.05$) were found between the level of contamination of this microorganism in raw and cooked *maranhos*. With regard to physico-chemical parameters, we obtained pH mean values of 5.13 for raw *marancho* samples and pH 5.89 for cooked *marancho*. In a_w determination, there was a great uniformity of results, the values ranging between 0.920 and 0.930. Regarding the percentage of total fat and the total protein, the mean values by producer ranged, respectively, between 4.07% and 19.95%, and between 10.57% and 15.89%. In relation to the content of chlorides, was obtained a total mean value for cooked and raw *marancho* samples of 1.67%.

Given the presence of *L. monocytogenes* in 13% of *marancho* samples marketed cooked, we conclude that, from the point of view of food safety, *marancho* is a product that deserves greater attention.

Keywords: *Marancho*, food safety, microbiological hazards, *Listeria monocytogenes*

Índice

| | |
|--|----|
| Agradecimentos | 4 |
| Resumo | 5 |
| Abstract..... | 7 |
| Índice | 8 |
| Índice de Figuras | 11 |
| Índice de Tabelas | 12 |
| Lista de Abreviaturas..... | 13 |
| 1. Introdução..... | 15 |
| 1.1 Enquadramento | 15 |
| 1.2 Caracterização da zona de produção dos maranhos | 16 |
| 1.3 Considerações gerais sobre os maranhos | 17 |
| 1.4 Legislação aplicada à carne e produtos cárneos | 19 |
| 1.5 Microrganismos associados aos produtos cárneos | 21 |
| 1.5.1 <i>Salmonella</i> spp..... | 21 |
| 1.5.2 <i>Listeria monocytogenes</i> | 23 |
| 1.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i> | 27 |
| 1.5.4 <i>Escherichia coli</i> | 29 |
| 1.6 Critérios microbiológicos aplicáveis a produtos cárneos | 30 |
| 1.7 Caracterização físico-química de produtos cárneos | 33 |
| 1.7.1 Atividade da água | 34 |
| 1.7.2 Potencial hidrogeniónico | 35 |
| 1.7.3 Proteína..... | 36 |
| 1.7.4 Gordura..... | 37 |
| 1.7.5 Cloretos..... | 37 |
| 1.8 Fatores extrínsecos que influenciam os produtos cárneos | 38 |
| 2. Materiais e Métodos | 40 |

| | | |
|------------|---|----|
| 2.1 | Processo de fabrico dos maranhos e colheita de amostras | 40 |
| 2.1 | Transporte e receção de amostras | 43 |
| 2.2 | Preparação das amostras e da suspensão mãe | 43 |
| 2.3 | Análises microbiológicas | 46 |
| 2.3.1 | Procedimento para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. | 46 |
| 2.3.2 | Procedimento para a pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> e serotipagem por <i>Polymerase Chain Reaction</i> multiplex..... | 47 |
| 2.3.3 | Procedimento para a contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva - Técnica com confirmação de colónias..... | 50 |
| 2.3.4 | Procedimento para a contagem de <i>Escherichia coli</i> | 51 |
| 2.3.5 | Cálculo e expressão dos resultados | 52 |
| 2.4 | Análises físico-químicas | 54 |
| 2.4.1 | Preparação da amostra | 54 |
| 2.4.2 | Determinação da atividade da água..... | 55 |
| 2.4.3 | Determinação do potencial hidrogeniónico..... | 55 |
| 2.4.4 | Determinação do teor de cloretos | 56 |
| 2.4.5 | Determinação da proteína total..... | 57 |
| 2.4.6 | Determinação da gordura total | 58 |
| 2.5 | Tratamento estatístico dos resultados | 58 |
| 3. | Resultados e Discussão | 59 |
| 3.1 | Análises Microbiológicas | 59 |
| 3.1.1 | Contagem de <i>Escherichia coli</i> | 59 |
| 3.1.2 | Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva..... | 62 |
| 3.1.3 | Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp..... | 63 |
| 3.1.4 | Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> | 64 |
| 3.1.5 | Serotipagem dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> por <i>Polymerase Chain Reaction</i> Multiplex | 66 |
| 3.2 | Análises físico-químicas | 68 |

| | | |
|-------|--------------------------------|----|
| 3.2.1 | Potencial hidrogeniónico | 68 |
| 3.2.2 | Atividade da água | 71 |
| 3.2.3 | Gordura total..... | 73 |
| 3.2.4 | Proteína total..... | 75 |
| 3.2.5 | Teor de cloretos | 77 |
| 4. | Conclusões..... | 79 |
| 5. | Bibliografia..... | 80 |
| 6. | ANEXOS | 95 |

Índice de Figuras

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Região do Pinhal Interior Sul..... | 16 |
| Figura 2 | Maranhos crus embalados a vácuo..... | 41 |
| Figura 3 | Fluxograma do processo produtivo do maranho..... | 41 |
| Figura 4 | Miga ou corte dos ingredientes..... | 42 |
| Figura 5 | Atadura dos sacos após enchimento dos mesmos..... | 42 |
| Figura 6 | Maranho pronto para ir para a câmara de refrigeração..... | 42 |
| Figura 7 | Preparação da amostra de maranho em tabuleiro de inox estéril..... | 43 |
| Figura 8 | <i>Stomacher</i> 400 circulator – Homogeneizador de amostras..... | 45 |
| Figura 9 | Meio <i>Tryptone Sugar Iron</i> | 46 |
| Figura 10 | Galeria API 20E após inoculação e incubação a 37°C..... | 47 |
| Figura 11 | Colónias típicas de <i>Listeria monocytogenes</i> no meio de cultura <i>Ottaviani Agosti Agar</i> (OAA)..... | 48 |
| Figura 12 | Reação de coagulase positiva..... | 50 |
| Figura 13 | Colónias características de <i>Escherichia coli</i> no meio <i>Tryptone Bile X – Glucuronide</i> (TBX) Agar..... | 51 |
| Figura 14 | Rotronic Hygroskop DT..... | 55 |
| Figura 15 | Potenciómetro HI 9024 – Hanna <i>Instruments</i> | 56 |
| Figura 16 | Titulação de cloretos..... | 56 |
| Figura 17 | Aparelho KJELTEC <i>Analyzer Unit 2300</i> | 57 |
| Figura 18 | Aparelho Soxtec <i>System HT 1043 Extraction Unit</i> | 58 |
| Figura 19 | Diagramas de extremos e quartis de log para <i>Escherichia coli</i> , por produtor e por amostra cozidos (co) e crus (cr)..... | 61 |
| Figura 20 | Percentagens dos serogrupos dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> por PCR Multiplex..... | 67 |
| Figura 21 | Diagramas de extremos e quartis para os valores de pH por produtor e por amostra cozidos (co) e crus (cr)..... | 70 |
| Figura 22 | Comparação dos valores de a_w com os valores de pH..... | 72 |
| Figura 23 | Diagramas de extremos e quartis para os valores de a_w por produtor e por amostra cozidos (co) e crus (cr)..... | 73 |
| Figura 24 | Diagramas de extremos e quartis para os valores de % de gordura total por produtor e por amostra cozidos (co) e crus (cr)..... | 75 |
| Figura 25 | Diagramas de extremos e quartis para os de % de proteína total por produtor e por amostra cozidos (co) e crus (cr)..... | 76 |
| Figura 26 | Diagramas de extremos e quartis para os valores de % de teor de NaCl por produtor e por amostra cozidos (co) e crus (cr)..... | 78 |

Índice de Tabelas

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1 | Alguns géneros alimentícios de origem animal, aos quais esteve associada em Portugal a presença de <i>Listeria monocytogenes</i> | 26 |
| Tabela 2 | Critérios microbiológicos para preparados de carne de acordo com o regulamento 1441/2007..... | 32 |
| Tabela 3 | Condições de armazenamento de produtos cárneos em função dos valores de a_w e pH | 35 |
| Tabela 4 | Valores médios ou intervalos de valores de pH e a_w da carne e de produtos cárneos Portugueses..... | 35 |
| Tabela 5 | Empresas fornecedoras das amostras de maranho analisadas neste trabalho, localização, estado da amostra e número de amostras fornecidas..... | 40 |
| Tabela 6 | Informações dos rótulos presentes nas amostras analisadas..... | 44 |
| Tabela 7 | Fragmentos amplificados em cada um dos serovares de <i>Listeria monocytogenes</i> | 49 |
| Tabela 8 | Métodos de análise e referência usados nas análises físico-químicas.... | 54 |
| Tabela 9 | Resultados da contagem de <i>Escherichia coli</i> nas amostras de maranho.. | 60 |
| Tabela 10 | Valores médios da contagem de <i>Escherichia coli</i> nas amostras de maranho cru e a amplitude dos resultados por amostra (log UFC/g)..... | 61 |
| Tabela 11 | Resultados da contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> nas amostras de maranho..... | 62 |
| Tabela 12 | Resultados da pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de maranho.. | 63 |
| Tabela 13 | Resultados da pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> nas amostras de maranho..... | 65 |
| Tabela 14 | Amostras de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas de maranho e serotipadas por multiplex PCR..... | 67 |
| Tabela 15 | Resultados da determinação do pH das amostras de maranho..... | 69 |
| Tabela 16 | Resultados das determinações médias do pH nas amostras de maranho | 70 |
| Tabela 17 | Resultados da determinação da a_w das amostras de maranho..... | 71 |
| Tabela 18 | Resultados das determinações médias de a_w das amostras de maranho... | 72 |
| Tabela 19 | Resultados da determinação da gordura total das amostras de maranho.. | 73 |
| Tabela 20 | Resultados das determinações médias da gordura total das amostras de maranho..... | 74 |
| Tabela 21 | Resultados da determinação da proteína total das amostras de maranho..... | 75 |
| Tabela 22 | Resultados das determinações médias da proteína total das amostras de maranho..... | 76 |
| Tabela 23 | Resultados da determinação do teor de cloretos das amostras de maranho..... | 77 |
| Tabela 24 | Resultados das determinações médias do teor de cloretos nas amostras de maranho..... | 78 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|---------|--|
| APT: | Água Peptonada Tamponada |
| a_w : | Atividade da água |
| BHI: | Caldo <i>Brain Heart Infusion</i> |
| BP: | Meio de Baird Parker |
| BPF: | Boas Práticas de Fabrico |
| BPL: | Boas Práticas de Laboratório |
| BPLS: | <i>Brilliant-Green Phenol-Red Lactose Sucrose</i> |
| DAEC: | Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Difusamente Aderente |
| DOA: | Doença com Origem nos Alimentos |
| DNA: | Ácido desoxirribonucleico |
| DRAPC: | Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro |
| EAEC: | Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enteroagregativo |
| EDTA: | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EFSA: | <i>European Food Safety Authority</i> |
| EHEC: | Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enterohemorrágico |
| EIEC: | Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enteroinvasivo |
| EPEC: | Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enteropatogénico |
| ETEC: | Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enterotoxigénico |
| HR: | Humidade relativa |
| HACCP: | <i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> |
| HPA: | <i>Health Protection Agency</i> |
| INSA: | Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge |
| ISO: | <i>International Organization for Standardization</i> |
| Log: | Logarítmo de base 10 |
| MKTTn: | <i>Müller - Kauffmann Tetrathionate Novobiocin</i> |
| OAA: | <i>Ottaviani Agosti Agar</i> |
| PCR: | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| RASFF: | <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> |
| rpm: | Rotações por Minuto |
| RVS: | <i>Rappaport Vassiliadis Soya</i> |
| TBX: | <i>Tryptone Bile x-glucuronide</i> |
| TSA: | <i>Tryptone Soya Agar</i> |

| | |
|-------|--|
| TSI: | <i>Triple Sugar Iron agar</i> |
| UE: | União Europeia |
| ufc: | Unidades formadoras de colónias |
| UK: | Reino Unido |
| VTEC: | Grupo patogénico de <i>Escherichia coli</i> – produtor de toxinas vero |
| XLD: | <i>Xylose-Lysine-Desoxycholate</i> |

1. Introdução

1.1 Enquadramento

Portugal produz um número elevado e diversificado de produtos agrícolas e agroalimentares com tipicidade, genuinidade e origem qualificados (Soeiro, 2009). Em 2009 existiam 116 produtos com nomes reconhecidos, qualificados e protegidos na União Europeia (UE). Apesar deste facto, há muitos outros produtos que não estão ainda qualificados (Soeiro, 2009).

Os produtos tradicionais fazem parte da nossa cultura e de um saber fazer que muitas vezes passa de geração em geração. São estes produtos que muitas vezes são o ex-líbris de uma região, fazendo parte do seu património gastronómico, como é o caso dos maranhos.

Os produtos tradicionais são um fator de atração turística através da criação de rotas, festivais gastronómicos e feiras, tendo um impacto significativo nas economias locais.

Possuidores de características sensoriais específicas, os produtos regionais perdem muitas vezes tipicidade e o seu carácter distintivo, devido a não haver um modo de produção devidamente estudado e descrito.

Na produção de maranhos a nível industrial nota-se que o processo de fabrico é semelhante ao método tradicional, fazendo-se quase todo o trabalho manualmente como é o caso da miga, mistura, enchimento e atadura dos maranhos, tirando alguns casos em que a miga é feita recorrendo a máquinas picadoras de carne.

As matérias-primas utilizadas são variadas e dependem de produtor para produtor, recorrendo muitas vezes às carnes que sobraram de outros enchidos. Também as especiarias e ervas aromáticas variam muito na quantidade e na variedade utilizada, sendo a hortelã (*Mentha spicata*) e o serpão (*Thymus serpyllum*), as ervas aromáticas que conferem as características organoléticas tão características deste produto.

Apesar da produção de maranhos ter uma longa tradição na zona centro (Pinhal Interior Sul), a informação disponível sobre estes produtos é escassa e limitada.

Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os maranhos do ponto de vista físico-químico e microbiológico e avaliar a presença de microrganismos patogénicos que possam colocar em risco a saúde dos consumidores.

1.2 Caracterização da zona de produção dos maranhos

Os maranhos são uma especialidade da cozinha tradicional portuguesa, em especial da região da Beira Baixa, mais concretamente da sua zona ocidental, conhecida por região do Pinhal Interior Sul. Esta é constituída pelos concelhos de Mação, Oleiros, Proença-a-Nova, Sertã e Vila de Rei (Figura 1).

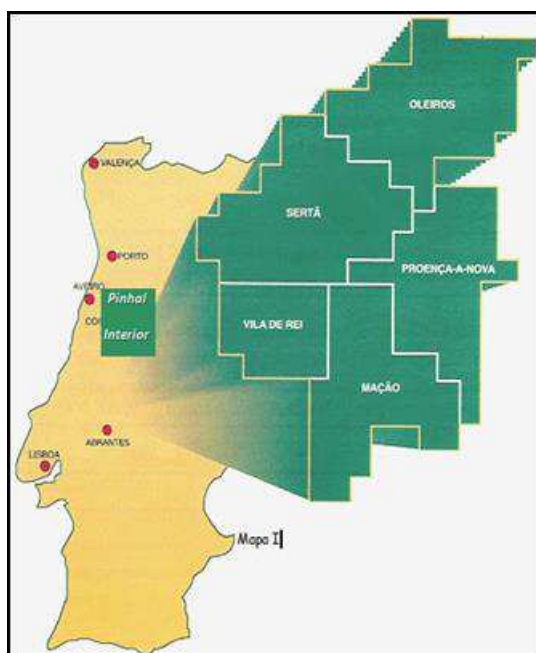


Figura 1- Região do Pinhal Interior Sul (Fonte: Pinhal Maior in <http://www.pinhalmajor.pt/conteudos.php?id>)

De acordo com informação recolhida, e apesar de mais conhecidos e produzidos na região do Pinhal Interior Sul, encontramos igualmente produção de maranhos nos concelhos de Nisa, Castelo Branco e Pampilhosa da Serra, verificando-se uma enorme variedade de designações para o mesmo tipo de produto. Assim, temos os maranhos da Sertã, os maranhos de Mação, os maranhos de Oleiros, entre outros. Este conjunto de designações geográficas não nos permite concluir sobre a verdadeira origem do maranho, apenas nos permite verificar que a produção e oferta de maranho se estende por uma vasta área geográfica do centro do país.

1.3 Considerações gerais sobre os maranhos

Neste trabalho, consideramos os maranhos como sendo preparados de carne, tendo em conta a definição constante no Regulamento (CE) 853/2004 o qual define “preparado de carne” como sendo carne fresca, incluindo carne que tenha sido reduzida a fragmentos, a que foram adicionados outros géneros alimentícios, condimentos ou aditivos ou que foi submetida a um processo insuficiente para alterar a estrutura das suas fibras musculares e eliminar assim as características da carne fresca. Este regulamento diz também que as matérias-primas utilizadas na preparação de preparados de carne podem ser carne fresca e músculos esqueléticos, incluindo os tecidos adiposos aderentes.

Tendo em conta a informação consultada em livros sobre a região e a gastronomia local, foi possível verificar a falta de consenso na descrição dos ingredientes que constituem o maranho. Assim, e de acordo com Dias (1970), “os maranhos são um petisco feito com arroz, toucinho, presunto, lombo de porco, chouriço, carne de borrego, hortelã, sal, pimenta, alho, cebola picada, tudo ensacado em bucho de carneiro ou porco”. Já de acordo com Marcelo (1993), em “Beira Baixa A memória e o Olhar”, os maranhos são definidos como sendo “miúdos de cabrito ou carneiro e de outras carnes com presunto, paio, pimenta e hortelã, sendo estes uma especialidade da zona sul da região”. Como podemos verificar nesta última definição não há qualquer referência ao arroz, considerado um ingrediente característico deste produto.

Valente (1997), no livro “Cozinha de Portugal” refere-se aos maranhos como sendo um manjar único e comer indispensável nas festas de casamento, baptizado, festas de aldeia e das celebrações do calendário litúrgico. Nos dias de hoje perderam muito do seu carácter ritual e comem-se em qualquer altura do ano.

Sendo estes produtos altamente apreciados e uma fonte de atração turística, e conseqüentemente uma fonte de rendimento, as câmaras municipais têm promovido o produto através da criação de eventos, como é o caso do “Festival do maranho e bucho da Sertã” na Sertã, o “ Festival gastronómico do cabrito estonado e do maranho” em Oleiros, o “Festival do maranho e da truta” na Pampilhosa da Serra e “ O maior maranho – candidato a maior do mundo” em Proença - a - Nova.

Com início no século XII, as confrarias chegaram aos nossos dias e continuam cada vez mais na ordem do dia, com programas que visam a defesa de um património, dando a

conhecer os respetivos produtos empunhando a bandeira da tradição, da qualidade e da diferença (DRAPC, 2008).

As confrarias têm tido a importante missão de garantir os princípios de prevenção, equivalência, participação, transmissão e acessibilidade das artes culinárias previstas no regime jurídico de salvaguarda do património cultural imortal de uma região (Carrito, 2007).

Atualmente existem duas confrarias que têm como principal produto o maranho, a Real Confraria do Maranho com sede em Pampilhosa da Serra e criada em Março de 2002, e a Confraria do Maranho com sede na Sertã e criada em Agosto de 2003 (Nunes, 2011).

Tendo em conta o hino da Confraria do Maranho (Anexo I), do qual se coloca abaixo um extracto, o papel das confrarias é crucial na divulgação e promoção de produtos tradicionais como o maranho. Para além destas actividades, as confrarias podem igualmente desempenhar um papel relevante no processo de certificação e proteção deste tipo de produtos.

“O Maranho é tradição
Que juramos defender
Excelência infinita
É um prato sem igual.
Seu sabor é promoção
É todo um saber fazer
É um cartão-de-visita
É orgulho regional.”

No decorrer deste trabalho verificamos não existir legislação específica relativa à composição do maranho, estando os consumidores, em boa parte, sujeitos aos critérios dos produtores.

Os produtos tradicionais podem ser protegidos através da designação DOP (Denominação de Origem Protegida), IGP (Identificação Geográfica Protegida) e ETG (Especialidade Tradicional Garantida). Existem também as classificações de DO (Denominação de Origem) e IG (Indicação Geográfica), estas para agrupamentos de produtores que queiram ver reconhecidos os seus produtos. A proteção jurídica dada às Denominações de Origem e às Indicações Geográficas é muito interessante para os produtores, permitindo-lhes afirmação no mercado e valorização das suas produções locais, contribuindo decisivamente para o desenvolvimento económico sustentado das

empresas e das regiões. Também os consumidores beneficiam, dando-lhes a garantia sobre a origem e a qualidade diferenciada do produto (Soeiro, 2009).

Os maranhos são um produto regional muito apreciado pelos beirões e com destaque na gastronomia local, o que justifica a sua procura por todos os que visitam a Beira Baixa.

1.4 Legislação aplicada à carne e produtos cárneos

De acordo com o Regulamento (CE) 2073/2005, e o Regulamento (CE) 1441/2007, que altera o primeiro, todos os produtos alimentares devem ter um elevado nível de segurança, não oferecendo risco para o consumidor. Estes produtos devem estar livres de qualquer microrganismo patogénico, toxinas e/ou metabolitos em valores que sejam prejudiciais à saúde do consumidor. Estes regulamentos definem a segurança e a aceitabilidade dos processos, através do estabelecimento de limites microbiológicos acima dos quais os géneros alimentícios são considerados de qualidade não satisfatória para processamento ou consumo.

O Regulamento (CE) 1441/2007, diz que as matérias-primas utilizadas na preparação de preparados de carne podem ser carne fresca e músculos esqueléticos, incluindo os tecidos adiposos aderentes. Se o operador de uma empresa do sector alimentar tiver efetuado análises que demonstrem que a carne cumpre os critérios microbiológicos adotados pelo referido Regulamento, esta carne pode ser utilizada em preparados de carne que necessitem de posterior tratamento térmico antes do seu consumo (caso dos maranhos).

Todas as indústrias alimentares devem cumprir os critérios microbiológicos estipulados no regulamento através da realização de análises periódicas, como é evidenciado na Portaria 699/2008 de 28 de Julho. Esta Portaria está diretamente relacionada com o Regulamento (CE) 2073/2005 e, por sua vez, com a sua alteração ou seja o Regulamento (CE) 1441/2007.

A frequência de amostragem pode ser adaptada à natureza e à dimensão das empresas do setor alimentar, desde que a segurança dos géneros alimentícios não seja posta em causa. No caso dos maranhos, considerados como preparados de carne, a periodicidade é a indicada na Portaria 699/2008 e no Regulamento (CE) 1441/2007.

Para *Salmonella* spp., são necessárias 30 semanas consecutivas de pesquisa em 10g ou 25 g do produto consoante o caso. Quando as amostras apresentarem sempre resultados satisfatórios ao longo dessas 30 semanas a pesquisa de *Salmonella* spp., passa a periodicidade mensal.

No caso da *Escherichia coli*, são necessárias 6 semanas consecutivas de análises com resultados abaixo do limite para passarmos para uma periodicidade mensal.

Os aditivos alimentares são substâncias adicionadas intencionalmente aos alimentos para, desta forma, desempenharem determinada função tecnológica. Na UE todos os aditivos adicionados aos alimentos devem vir devidamente identificados no rótulo do alimento, através da letra E. Estes são sempre incluídos nos ingredientes do produto em que são usados. Além da letra E, deve vir indicado o seu número, nome e a sua função específica (EFSA, 2012a).

De acordo com o Decreto-lei nº 560/99, 18 de Dezembro de 1999, “aditivo alimentar é toda a substância, tenha ou não valor nutritivo, que por si só não é normalmente género alimentício nem ingrediente característico de um género alimentício, mas cuja adição intencional, com finalidade tecnológica ou organolética, em qualquer fase de obtenção, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenagem de um género alimentício, tem como consequência quer a sua incorporação nele ou a presença de um seu derivado, quer a modificação de características desse género, não abrangendo as substâncias adicionadas aos géneros alimentícios com a finalidade de lhes melhorar as propriedades nutritivas”.

O Regulamento (CE) 1333/2008, refere os aditivos alimentares como “qualquer substância não consumida habitualmente como género alimentício em si mesma e habitualmente não utilizada como ingrediente característico dos géneros alimentícios, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos géneros alimentícios, com um objetivo tecnológico na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios”.

Os aditivos alimentares e condimentos utilizados na carne e produtos cárneos são em grande número, visto desempenharem funções a nível da sua conservação e

estabilidade, melhorando as suas propriedades organolépticas, podendo também facilitar a sua transformação, preparação, embalagem e armazenagem de determinado género alimentício (Colaço, 1989; Hultin, 1993; Fraqueza, 2008).

Alguns aditivos alimentares possuem propriedades tóxicas para os seres humanos, sendo por isso de uso restrito. A sua utilização deverá respeitar as concentrações permitidas.

1.5 Microrganismos associados aos produtos cárneos

1.5.1 *Salmonella* spp.

Salmonella pertence à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram negativa e não formadora de esporos, sendo conhecida há mais de 100 anos. Inclui cerca de 2500 serotipos (D'Aoust, 2000; Jay, Loessner & Golden, 2005). Estas bactérias são capazes de produzir ácido e em alguns casos gás a partir da glucose e a maioria tem como principal reservatório o trato gastrointestinal de animais homeotérmicos.

A salmonelose é a doença mais frequentemente associada ao consumo de alimentos de origem animal, em particular de carne de aves e ovos. É reconhecida como uma importante zoonose (EFSA, 2012b).

As bactérias pertencentes a este género apresentam oxidase negativa, catalase positiva e utilizam o citrato como fonte de carbono, geralmente produzindo sulfureto de hidrogénio. Descarboxilam a lisina e a ornitina e não hidrolisam a ureia. Um isolado típico de *Salmonella* produz ácido e gás a partir da glucose no meio sólido *Triple Sugar Iron* (TSI) e não utilizam a lactose ou a sacarose no mesmo meio de cultura (Jay *et al.*, 2005; D' Aoust & Maurer, 2007).

Salmonella é uma bactéria ubíqua que se encontra largamente distribuída no ambiente, facto que contribui significativamente para a elevada prevalência desta bactéria nos animais destinados ao consumo humano. A ocorrência nos animais advém da utilização de forragens e águas contaminadas daí que as preocupações com a saúde pública devem incluir as boas práticas de produção pecuária, intensiva ou extensiva, sendo o estatuto sanitário dos rebanhos um dos fatores a ter em conta na cadeia alimentar (D' Aoust & Maurer, 2007).

A carne dos animais para consumo, os ovos e o leite são frequentemente contaminados durante a sua produção devido a práticas de higiene incorretas. Os ovos, além de poderem apresentar contaminação exterior, poderão também ter o seu interior contaminado, se existir uma infecção do oviduto das aves.

Durante o processamento de alimentos, quando a higienização não é a adequada, é possível a contaminação de superfícies, equipamentos e utensílios que irão funcionar como veículo de contaminação.

Os alimentos mais frequentemente associados a infecções por *Salmonella* são a carne de animais de consumo, o leite e os ovos. Os frutos, as especiarias e as ervas aromáticas também podem ser uma possível fonte de contaminação, devido à possibilidade de, durante o cultivo dos mesmos, terem estado em contacto com matéria fecal animal, fertilizantes orgânicos ou águas contaminadas. Outros alimentos que têm sido implicados em surtos e casos de salmonelose incluem enchidos fermentados, sumos de fruta, tomate, peixe, chocolate, molhos, bolos com recheio, manteiga de amendoim e rebentos de alfafa (Diakos & Borges, 2011).

Os principais sintomas de infecção por *Salmonella* são a manifestação na forma clínica de febre entérica por (*Salmonella* Typhi ou *Salmonella* Paratyphi A B C; estritamente humanas) ou de enterocolite (outros serotipos). A febre tifóide tem um período de incubação de 7 a 28 dias e os sintomas incluem diarreia aquosa, perda de forças, dores de cabeça, febre alta e persistente, dores abdominais, dores musculares e suores. Em países subdesenvolvidos a febre tifóide apresenta uma alta taxa de mortalidade. Os sintomas de enterocolite incluem náuseas, dores abdominais, diarreia aquosa, vômitos e febre, surgindo entre 8h e 72h após a ingestão do alimento contaminado. Os sintomas desaparecem normalmente em 2 a 5 dias, no entanto alguns indivíduos continuam portadores assintomáticos da bactéria ao fim de 3 meses (Viegas, 2009a).

Os dados existentes apontam para a necessidade da ingestão de um elevado número de células ($10^6 - 10^9$) para que ocorra infecção. No entanto, dados mais recentes indicam que, em determinadas condições, um número de células entre 10 e 100 pode causar doença. É o que acontece quando o alimento contaminado apresenta elevados teores de gordura e baixa atividade de água, fatores estes que protegem a bactéria da acidez do estômago (Jay *et al.*, 2005; D' Aoust & Maurer, 2007).

Em algumas situações, as infeções causadas por *Salmonella* podem degenerar em infeções sistémicas e precipitar várias condições crónicas como a artrite reativa e o síndrome de Reiter (inflamação das articulações e das uniões dos tendões às mesmas, frequentemente acompanhada por uma inflamação da conjuntiva do olho e das membranas mucosas). Os sintomas são mais severos em idosos, crianças e em indivíduos imunodeprimidos (D' Aoust & Maurer, 2007).

A prevenção da contaminação apresenta um desafio importante e implica o controlo na produção primária, processamento e distribuição dos produtos alimentares. Ao nível da produção primária devem ser tomadas medidas que assegurem o estado sanitário dos rebanhos, nomeadamente o controlo da alimentação animal (*Salmonella* nas rações pode colonizar os animais) e o cumprimento das boas práticas de higiene na produção e no processamento animal, de forma a evitar a contaminação cruzada. Outros cuidados passam pela seleção da matéria-prima, higienização dos utensílios e equipamentos, controlo da temperatura de armazenamento dos produtos alimentares, separação dos produtos crus de produtos processados, formação ao nível dos hábitos de higiene pessoal, principalmente a correta lavagem das mãos dos manipuladores de alimentos e implementação do sistema HACCP (Shinohara *et al.*, 2008; Santos, 2010).

1.5.2 *Listeria monocytogenes*

Foi Murray e os seus colaboradores quem, em 1926, isolaram pela primeira vez *Bacterium monocytogenes*, a qual passou mais tarde a designar-se por *L. monocytogenes* (Farber, & Peterkin, 2000).

L. monocytogenes é um bacilo Gram positivo, anaeróbio facultativo, catalase positivo, oxidase negativo, móvel devido a flagelos peritricos, com mobilidade do tipo *tumbling* a temperaturas de 20 °C a 25 °C (Seeliger & Jones, 1986; Farber, & Peterkin, 2000).

A temperatura ideal de crescimento para *L. monocytogenes* é de 30 °C a 37 °C, mas pode crescer com valores de 1 °C a 45 °C (Seeliger & Jones, 1986; Lovett, 1990).

Este microrganismo consegue desenvolver-se com valores de pH entre 5,5 e 9,6 com um crescimento ótimo a pH neutro ou ligeiramente alcalino (Seeliger & Jones, 1986), podendo multiplicar-se a valores de pH 4,4 a 20 °C e 4,6 a 10 °C e 5,2 a 4 °C, em

condições ambientais ótimas e ajustando o pH com ácido clorídrico (Hicks & Lund, 1991).

A bactéria *Listeria* é considerada um microrganismo que tolera elevadas concentrações salinas (halotolerante), devido à possibilidade deste microrganismo ter capacidade de acumular solutos intracelulares (Lou & Yousef, 1999), tendo sido referida a multiplicação desta bactéria em meios com uma concentração de 20% de NaCl e podendo permanecer viável após um ano em 16% de NaCl com pH igual a 6,0 (Seeliger & Jones, 1986).

Os valores de atividade da água (a_w) ótimos para a multiplicação de *L. monocytogenes* são próximos de 0,97 (Lou & Yousef, 1999), no entanto foi observada sobrevivência em alimentos desidratados com valores de a_w inferiores a 0,93 (Seeliger & Jones, 1986).

Atualmente o género *Listeria* possui 8 espécies, sendo elas *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* (Swaminathan, Cabanes, Zang & Cossart, 2007; Zunabovic, Domig & Kneifel, 2011), *L. marthii* (Leclercq *et al.*, 2010) e *L. rocourtiae* (Graves *et al.*, 2010). Destas, apenas 2 espécies são consideradas patogénicas, *L. monocytogenes* (patogénica tanto para o Homem como para os animais domésticos e selvagens) e *L. ivanovii* (patogénica apenas para os animais) (Zunabovic *et al.*, 2011).

Esta bactéria é um microrganismo patogénico intracelular, que se multiplica dentro dos fagócitos induzindo a formação de granulomas, estando este processo relacionado com a imunidade celular específica de cada indivíduo. Assim, nos doentes com imunidade celular deficiente a doença progride rapidamente. Todas as estirpes virulentas produzem uma toxina hemolítica e citolítica, chamada listeriolisina O, que parece originar rutura das membranas dos fagossomas, tendo como consequência a multiplicação de *L. monocytogenes* sem limitações no citoplasma celular. Após a dissolução da membrana do fagolisossoma, a bactéria é cercada por filamentos de actina que a orientam para a periferia do macrófago, formando-se pseudópodes, que facilitam a sua transferência para outros macrófagos (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

L. monocytogenes ocorre principalmente em pessoas consideradas de risco, tais como grávidas, crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos como os diabéticos, os portadores de HIV, os alcoólicos, os submetidos a hemodiálise e os doentes submetidos

a terapia prolongada com corticosteróides. Na maioria das vezes manifesta-se por sintomas gripais, como febre e arrepios, podendo também existir lombalgias. A infecção neonatal pode ser adquirida transplacentariamente, durante ou logo após o trabalho de parto. Quando é adquirida após o parto manifesta-se como meningite (Marth, 1988; Lecuit, 2007).

A sua identificação faz-se pela mobilidade característica que demonstra, em meio líquido, quando cultivada a 22°C e por testes bioquímicos e serológicos, sendo a tipagem serológica extremamente importante na epidemiologia desta doença e no reconhecimento dos surtos epidemiológicos de origem infecciosa. Na indústria alimentar, para a deteção de estirpes contaminantes, é também uma ferramenta imprescindível para se estabelecerem ligações de causalidade entre isolados que se detetam nos alimentos ou no ambiente e os que são imputados em situação de doença (Guerra & Bernardo, 2004). As estirpes de *Listeria* são divididas em serovares, baseados na caracterização dos antigénios somáticos (O) e dos antigénios flagelares (H). São conhecidos treze serovares de *Listeria monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (Farber, & Peterkin, 2000). Em Portugal, a maioria dos surtos e casos esporádicos têm sido associados ao serovar 4b (Almeida, Gibbs, Hogg & Teixeira, 2006).

Este bacilo é ubíquo e tem sido isolado de vários locais do meio ambiente (solo, silagem, efluentes de esgoto, cursos de água), (Gomes, 2011), e de vários animais, sintomáticos ou assintomáticos (Pintado, 2009), incluindo o Homem. A infecção é mais frequente no Verão, embora apareça esporadicamente durante todo o ano (Swaminathan *et al.*, 2007).

Estudos de vigilância e investigação de surtos têm demonstrado que o consumo de alimentos é a via mais frequente de infecção por *L. monocytogenes* em humanos (McLauchlin, Mitchellb, Smerdon & Jewell, 2004). Os alimentos mais frequentemente associados a listeriose são leite cru e seus derivados, carne e produtos cárneos e vegetais consumidos crus, especialmente quando requerem refrigeração durante a sua conservação (Esteves, Patarata, Saraiva, Silva & Martins, 2000; Esteves, Patarata & Martins, 2003; Pintado, Oliveira, Pampulha & Ferreira, 2005; Thévenot *et al.*, 2006).

Os produtos que têm um prazo de validade longo, os alimentos contaminados com elevados teores de *L. monocytogenes* e que podem ser consumidos sem aquecimento prévio, como por exemplo queijo feito com leite cru e enchidos, têm maior probabilidade de favorecer a multiplicação de *Listeria* (Pintado, 2009).

Como podemos verificar na tabela 1, vários produtos de origem animal, estiveram associados à presença de *L. monocytogenes* em Portugal.

Tabela 1 – Alguns géneros alimentícios de origem animal, aos quais esteve associada em Portugal a presença de *Listeria monocytogenes*

| Género Alimentício | Observações |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| Cacholeira | Portugal notificou ao RASFF |
| Enchido alheira fumada | |
| Enchido alheira | |
| Enchido farinha de porco branco | |
| Enchido farinha de porco preto | |
| Fígado (creme) | Portugal notificou ao RASFF |
| Fígado de ganso | Distribuído para Portugal (RASFF) |
| Produtos de charcutaria | Distribuído para Portugal (RASFF) |
| Queijo de Azeitão | |
| Queijo de ovelha curado | |

Fonte: (Adaptado de Veiga *et al.*, 2009).

L. monocytogenes é o agente de listeriose humana e animal tornando-se num dos microrganismos patogénicos mais estudados nas últimas décadas, tanto por parte da indústria alimentar como da comunidade científica. A frequência com que esta bactéria se encontra nos alimentos, associada à elevada taxa de letalidade da doença, torna a listeriose um problema grave de saúde pública e uma preocupação para a indústria alimentar (Mead *et al.*, 1999).

Em 2007 foram reportados na UE 1558 casos de listeriose tendo havido um ligeiro decréscimo em relação ao período de 2004 a 2006. A notificação mais alta ocorreu na faixa etária acima dos 65 anos juntamente com a maior taxa de letalidade, seguido pelas crianças com menos de 5 anos. A taxa de letalidade total foi de 20% (Viegas, 2009a).

Em 2010 o número de casos de listeriose diminuiu 3,2% em comparação com 2009. Aproximadamente 60% dos casos ocorreram entre idosos com mais de 65 anos. Em crianças os casos de listeriose representaram 4% em 2009 e 6% em 2010 (EFSA, 2012c).

A tendência decrescente manteve-se em 2011, ano em que se registaram apenas 3 surtos de listeriose na UE (EFSA, 2013).

Existem dados que sugerem a existência de uma elevada prevalência de contaminação por *L. monocytogenes* em alguns alimentos mas a doença que provoca, a listeriose, por não ser de declaração obrigatória, deverá estar subestimada (Veiga *et al.*, 2009).

1.5.3 *Staphylococcus aureus*

O nome *Staphylococcus* foi pela primeira vez usado por Ogston em 1881 para a designação de cocos dispostos em cachos, que eram agentes responsáveis por abscessos no Homem e em animais de laboratório infetados experimentalmente. O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*. São cocos Gram positivos, com diâmetro de 0,5 µm a 1,5 µm, imóveis, capsulados e não esporulados. São anaeróbios facultativos. Elaboram catalase e produzem ácidos por degradação da glucose, em aerobiose e em anaerobiose. São capazes de crescer em meios com elevado teor de cloreto de sódio (10%) e a temperaturas compreendidas entre 18 °C e 40 °C (Yousef & Carlstrom, 2003; Bergdoll & Wong, 2006; Montville & Mathews, 2008).

As bactérias do género *Staphylococcus* são microrganismos mesófilos com temperatura de multiplicação entre 7 °C e 48 °C (Baird-Parker, 2000), podendo produzir enterotoxinas termorresistentes a temperatura entre os 10 °C e os 46 °C, com temperatura ótima entre 35 °C e 40 °C. O pH ideal para o seu desenvolvimento varia entre 6 e 7 (Baird-Parker, 2000), mas é possível a multiplicação em alimentos com pH variando entre 4 e 10. Este grupo de microrganismos tem também a capacidade de sobreviver e de se multiplicar a uma concentração de cloreto de sódio até 15% e a produção de enterotoxina acontece em concentrações de sal até 10%, o que faz com que os alimentos curados também sejam veículos potenciais deste agente de intoxicações alimentares. Quanto à a_w , *Staphylococcus* consegue multiplicar-se em alimentos com valores inferiores ao normalmente considerado mínimo para bactérias halófilas. O valor mínimo de a_w é 0,86, apesar de já ter sido relatada a multiplicação destes microrganismos em alimentos com a_w de 0,83 (Anderson e Pascual, 2000; Wong & Bergdoll, 2002; Bergdoll & Wong, 2006; Santana, Beloti, Arangon-Alegro & Mendonça, 2010).

Em alimentos, as espécies de maior importância são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. intermedius* (Su & Wong, 1997; Santana *et al.*, 2010), sendo *S. aureus* a principal espécie associada aos casos de intoxicação alimentar (Santana *et al.*, 2010).

As estirpes de *S. aureus* são dos agentes mais frequentemente associados a intoxicações adquiridas, tanto na comunidade como no meio hospitalar. A origem da infecção é muitas vezes endógena. É um habitante da pele, membranas mucosas, narinas, olhos e trato gastrointestinal de indivíduos assintomáticos com estimativas de 20% a 30% para colonização persistente e de 60% para colonização intermitente (Bustan, Udo & Chugh, 1996; Argudín, Mendoza & Rodicio, 2010). A versatilidade e gravidade das infecções potencialmente causadas por *S. aureus* devem-se a uma notável gama de toxinas e enzimas produzidas pelo microrganismo (Duquenne *et al.*, 2010), que lhe garantem uma elevada capacidade de invasão e de resistência a antibióticos (Young-Duck, Moon, Park, Chang & Kim, 2007). As principais toxinas incluem quatro hemolisinas (α , β , γ e δ) com ação hemolítica, leucocida, letal e dermonecrótica, diferentes para várias espécies animais, incluindo o Homem, uma leucocidina com ação lítica para leucócitos, as exfoliatinas A e B, responsáveis pelo síndrome da pele escaldada e enterotoxinas (Dinges, Orwin & Schlievert, 2000). As enterotoxinas são produzidas nos alimentos quando estes são expostos a temperaturas que permitam a multiplicação microbiana. Quando *S. aureus* atinge níveis da ordem de 10^5 ufc/g é produzida enterotoxina, durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária (Argudín *et al.*, 2010), em quantidade suficiente para originar doença (Seo & Bohach, 2007). Dentro das enterotoxinas existem as clássicas (A, B, C, D e E), as enterotoxinas termo-estáveis e responsáveis por intoxicação alimentar, e as descobertas mais recentemente designadas por novas que correspondem a G, H, I, R, S e T, não estando ainda completamente estabelecida a sua relação com intoxicação alimentar (Argudín *et al.*, 2010). A enterotoxina A parece ser a mais importante. Neste caso há início abrupto de vômitos intensos, diarreia e dores abdominais, que surgem cerca de 4 horas após a ingestão do alimento contaminado e desaparecem, geralmente, em 1 a 3 dias (Su & Wong, 1995; Young-Duck *et al.*, 2007). Surgem alterações inflamatórias em diferentes áreas do trato gastrointestinal, com lesões mais severas no estômago e na parte superior do intestino delgado (Dinges *et al.*, 2000; Argudín *et al.*, 2010).

1.5.4 *Escherichia coli*

Bacterium coli, que mais tarde originou o nome de *Escherichia coli*, foi isolado pela primeira vez por Escherich em 1885, a partir de fezes de crianças com enterite. Depressa foi compreendido que *E. coli* era um habitante normal do intestino das crianças e adultos saudáveis, bem como de outros mamíferos (Smith, Willshaw & Cheatsy, 2000).

E. coli é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram negativa, em forma de bacilo, imóvel ou móvel por flagelos, que pertence à família *Enterobacteriaceae*. As estipes de *E. coli* podem ser diferenciadas com base nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K). Adicionalmente, a presença de fímbrias e de outras estruturas relacionadas desempenham um papel importante na virulência da bactéria. A temperatura ótima de multiplicação é de 37 °C, com uma temperatura mínima de multiplicação de 15 °C e uma temperatura máxima de 45 °C (Willshaw, Cheasty & Smith, 2000; Kaper, Nataro & Mobley, 2004; Meng, Doyle, Zhaot & Zhaot, 2007).

A maioria das estirpes de *E. coli* não é patogénica e por isso não representa qualquer perigo para o seu hospedeiro. Contudo, nos últimos 25 anos tem sido progressivamente reconhecida a importância desta bactéria como causa de diarreia. *E.coli* responsáveis por diarreia são um grupo heterogéneo atendendo aos mecanismos de patogenicidade, baseados na expressão de fatores de virulência e ao modo de interação celular. Atualmente consideram-se os seguintes grupos principais de *E. coli* patogénicos associados ao consumo de alimentos: *E. coli* enteropatogénico (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) e *E. coli* verotoxigénico (VTEC), onde se inclui *E.coli* O157:H7. Outros dois grupos foram epidemiologicamente associados, em alguns estudos, com diarreias: *E.coli* enteroaderente agregante (EAEC) e *E.coli* enteroaderente difuso (DAEC). As suas propriedades de virulência não estão tão bem clarificadas como as dos anteriores grupos e não está estabelecido o papel dos alimentos na sua transmissão (Meng *et al.*, 2007; HPA, 2012). A infeção pode ser adquirida através do contato direto com animais, do contato com humanos e do consumo de alimentos contaminados e água. Os surtos ocorridos demonstram que os alimentos mais frequentemente implicados têm sido vegetais contaminados com matéria fecal, água para consumo, carnes mal cozinhadas,

principalmente de origem bovina (hambúrgueres) e ovina, enchidos curados, alface, sumos de fruta não pasteurizados, queijo curado e leite cru (Viegas, 2009a).

Os estudos realizados sobre inativação térmica de *E.coli* revelaram que esta é mais sensível do que *Salmonella* pelo que os tratamentos térmicos utilizados para eliminar *Salmonella* podem ser aplicados na destruição de *E. coli* (Santos, 2010).

Tal como já foi referido, *E.coli* é um habitante normal do trato intestinal do Homem e de outros animais de sangue quente. De entre todas as espécies da família *Enterobacteriaceae* que fazem parte da flora intestinal do Homem, *E.coli* é a espécie predominante. Faz parte da flora normal e é encontrado pouco tempo após o nascimento. Está sempre presente, é uma saprófita que desempenha um papel importante em várias funções fisiológicas. No entanto, certos serovares, como referenciado anteriormente, são patogénicos para o Homem e para outros animais e estes não são considerados como fazendo parte da flora intestinal normal (Willshaw *et al.*, 2000; Kaper *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2007).

1.6 Critérios microbiológicos aplicáveis a produtos cárneos

Tanto os governos como os responsáveis pela saúde pública e a indústria alimentar pretendem reduzir a incidência das doenças de origem alimentar (DOA) causadas pelo consumo de alimentos contaminados. Tradicionalmente, os países têm tentado melhorar a segurança dos alimentos através do cumprimento de critérios microbiológicos, quer para as matérias-primas quer para os produtos processados e acabados.

Nesse sentido, a Comissão Europeia (CE), com o objetivo de assegurar um elevado nível de proteção da saúde pública, publicou, em 2005, o Regulamento europeu 2073/2005, alterado pelo Regulamento 1441/2007, e pelo Regulamento 365/2010, relativos a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Esta legislação divide, ainda, estes critérios em dois tipos: os critérios de segurança dos géneros alimentícios (que definem a aceitabilidade de um produto ou de um lote de géneros alimentícios aplicável aos produtos colocados no mercado) e os critérios de higiene dos processos (que indicam se o processo de produção funciona de modo aceitável, não sendo aplicável aos produtos colocados no mercado e que estabelece um valor de contaminação indicativo, acima do qual se tornam necessárias medidas corretivas para preservar a higiene do processo em conformidade com a legislação alimentar). O

Regulamento apresenta como microrganismos patogénicos com significado em preparados de carne *Salmonella* e *L. monocytogenes*, enquanto nos critérios de higiene dos processos o microrganismo relevante é *E. coli*.

De acordo com o Regulamento (CE) n° 2073/2005 e suas alterações, ao nível da indústria, e para os alimentos suscetíveis de permitir a multiplicação de *L. monocytogenes*, não é admitida a presença deste microrganismo em 25 g de amostra no momento em que o alimento deixa de estar sob o controlo do operador da empresa do sector alimentar que a produziu, a menos que o produtor possa demonstrar às autoridades competentes que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao fim do seu período de vida útil.

Na tabela 2 estão representados os critérios microbiológicos utilizados para as análises microbiológicas a preparados de carne, de acordo com o Regulamento 1441/ 2007.

Para além dos microrganismos contemplados no Regulamento 1441/2007, pode ser importante avaliar a presença de outros microrganismos patogénicos relevantes para determinados produtos. Assim, neste trabalho foi efetuada a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva (maioritariamente da espécie *Staphylococcus aureus*) dado que um dos reservatórios primários deste microrganismo é o homem e que este estudo incide sobre um produto que requer muita manipulação. *Staphylococcus aureus* são um dos agentes de intoxicações alimentares devido à sua capacidade de produzir enterotoxinas. Os manipuladores de alimentos, que sejam portadores do microrganismo, podem contaminar os alimentos e desta forma provocar uma intoxicação alimentar para o consumidor se existirem condições favoráveis à multiplicação (Jordá, Marucci, Guida, Pires & Manfredi, 2012). Além dos manipuladores, as matérias-primas utilizadas também podem estar contaminadas com este microrganismo.

Tabela 2- Critérios microbiológicos para preparados de carne, de acordo com o Regulamento 1441/2007.

| Categoria de alimentos | Micror- ganismo | Plano de amostra- gem | | Limites | | Método de análise/ referên- cia | Fase em que o critério se aplica |
|---|-------------------------------|--------------------------|---|--|--------------------------------|---|---|
| | | n | c | m | M | | |
| Carne picada e preparados de carne destinados a serem consumidos crus | <i>Salmonella</i> | 5 | 0 | Ausência em 25g | | EN/ISO 6579 | Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil |
| Carne picada e preparados de carne de aves de capoeira destinados a serem consumidos cozinhados | | | | A partir de 1.1.2006 Ausência em 10 g A partir de 1.1.2010 Ausência em 25 g | | | |
| Carne picada e preparados de carne, exceto os obtidos a partir de carne de aves de capoeira, destinados a serem consumidos cozinhados | | | | Ausência em 10 g | | | |
| Produtos à base de carne destinados a serem consumidos crus, excluindo aqueles em que o processo de fabrico ou a composição do próprio produto eliminarão o risco relativamente à <i>Salmonella</i> | | | | Ausência em 25 g | | | |
| Produtos à base de carne obtidos a partir de carne de aves de capoeira destinados a serem consumidos cozinhados | | | | A partir de 1.1.2006 Ausência em 10 g A partir de 1.1.2010 Ausência em 25 g | | | |
| Alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos | <i>Listeria monocytogenes</i> | 5 | 0 | 100 ufc/g | | EN/ISO 11290-2 | Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil. |
| Alimentos prontos para consumo não susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos | | | | Ausência em 25g | | EN/ISO 11290-1 | Antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu |
| Alimentos prontos para consumo não susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos | | | | 100 ufc/g | | EN/ISO 11290-2 | Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil. |
| Preparados de carne | <i>Escherichia coli</i> | 5 | 2 | 500 ufc/g ou cm ² | 5.000 ufc/g ou cm ² | ISO 16649-1 ou 2 | Fim do processo de fabrico |

n – Número de unidades que constituem a amostra.

c – Número de unidades da amostra que apresentam resultados compreendidos entre m e M.

m – Limite abaixo do qual todos os resultados são considerados satisfatórios.

M – Limite de aceitabilidade acima do qual os resultados já não são considerados satisfatórios.

De acordo com o Regulamento 1441/2007, a interpretação dos resultados analíticos para os microrganismos indicados é efectuada do seguinte modo:

Salmonella spp.

- Satisfatória, se todos os valores observados indicarem a ausência da bactéria,
- Insatisfatória, se for detectada a presença da bactéria em qualquer uma das unidades da amostra;

Listeria monocytogenes

- Satisfatória, se todos os valores observados indicarem a ausência da bactéria,
- Insatisfatória, se for detectada a presença da bactéria em qualquer uma das unidades da amostra;

Escherichia coli

- Satisfatória, se todos os valores observados forem $\leq m$,
- Aceitável, se houver um máximo de c/n valores entre m e M e os restantes valores observados forem $\leq m$,
- Insatisfatória, se um ou mais valores observados forem $> M$ ou mais do que c/n valores estiverem entre m e M .

Staphylococcus coagulase positiva

Uma vez que este microrganismo não está contemplado na legislação, optou-se por seguir o critério do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) (Santos, Correia, Campos, Saraiva & Novais, 2005a).

Inaceitável se os valores observados forem $\geq 10^4$

Não satisfatória $\geq 10^2 < 10^4$

Satisfatória $< 10^2$.

1.7 Caracterização físico-química de produtos cárneos

Dado que os produtos cárneos são produtos de origem animal, apresentam determinadas características que afetam o crescimento dos microrganismos. O conhecimento dessas características pode ser usado para prevenir ou retardar a multiplicação de microrganismos patogénicos ou de alteração (Jay *et al.*, 2005).

Os géneros alimentícios não apresentam apenas um valor nutricional importante para quem os consome pois constituem igualmente, na maioria dos casos, um meio de cultura ideal para o desenvolvimento microbiano (Novais, 1998).

As carnes e produtos cárneos apresentam características intrínsecas que fazem com que os microrganismos que neles se encontrem tenham a capacidade de se multiplicar. Para além das características intrínsecas também as características extrínsecas interferem com a multiplicação dos microrganismos (Brown, 2000).

Para o caso da carne e produtos cárneos, os principais fatores intrínsecos são referidos a seguir.

1.7.1 Atividade da água

Para todos os organismos a água é o principal componente da célula (cerca de 80%) e é o meio onde ocorrem as reações celulares (Pampulha, 1998). A atividade da água (a_w) é um parâmetro que exprime a fração de água do alimento que está disponível para participar nas reações físico-químicas e bioquímicas do metabolismo microbiano. É definida como o quociente entre a tensão de vapor de água de um alimento (p) e a da água pura (p_o), para a mesma temperatura ($a_w=p/p_o$). Os valores variam entre um, para a água pura (na ausência de forças capilares ou de adsorção) até zero. Quanto maior for a a_w maior será o desenvolvimento microbiano de um produto (ICMSF, 1980). A carne fresca apresenta, em média, um valor de 0.990, valor este ótimo para uma grande variedade de microrganismos (Feitosa, 1999; Jay *et al.*, 2005).

A a_w está relacionada com a presença de humectantes e de substâncias solúveis no alimento (NaCl, glúcidos, etc), com o teor em água, com o teor em gordura e com a temperatura. A sua influência faz-se sentir quer ao nível de mecanismos químicos e bioquímicos (oxidação lipídica, escurecimento não enzimático, alteração de pigmentos, alteração da textura, perda de nutrientes e alteração da atividade enzimática) quer ao nível do desenvolvimento dos microrganismos. A ação da a_w sobre a microbiota do alimento assume particular importância na medida em que o seu controlo permite conservar determinados produtos sem recurso à refrigeração, sem risco para a sua deterioração e para a saúde do consumidor. A função estabilizadora da redução dos valores de a_w nos alimentos é conseguida por limitar condições ótimas de multiplicação e atividade metabólica dos microrganismos presentes nos alimentos. A ação inibidora

da a_w reduzida é potenciada pelo pH, potencial redox (Eh) e temperaturas adversas, pela presença de substâncias inibidoras e de flora microbiana competitiva desprovida de ação corruptiva (Martins & Patarata, 1993; Jay *et al.*, 2005).

A importância atribuída pelos tecnólogos à a_w levou à classificação dos alimentos em três categorias, em função do valor de a_w : alimentos de humidade elevada (HMF) com 1,0 a 0,90 de a_w ; alimentos de humidade intermédia (IMF) de a_w compreendida entre 0,90 e 0,60; alimentos de humidade reduzida (LMF) de a_w inferior a 0,60 (Gauthier *et al.*, 1986; Leistner, 1990, citados por Martins & Patarata, 1993).

O efeito da a_w é influenciado por outros parâmetros tais como o pH, a temperatura e o potencial redox (Eh). A combinação dos valores de pH e de a_w permite classificar os produtos cárneos em 3 categorias: estáveis, alteráveis e facilmente alteráveis (tabela 3).

Tabela 3 – Condições de armazenamento de produtos cárneos em função dos valores de a_w e pH

| Categoria | Critério | Temperatura de armazenamento |
|-----------------------|---|--------------------------------|
| Estáveis | $a_w \leq 0,95$ e $\text{pH} \leq 5,2$ ou $a_w \leq 0,91$ ou $\text{pH} \leq 4,5$ | Não necessitam de refrigeração |
| Alteráveis | $a_w \leq 0,95$ ou $\text{pH} \leq 5,2$ | $\leq +10^\circ\text{C}$ |
| Facilmente alteráveis | $a_w > 0,95$ e $\text{pH} > 5,2$ | $\leq +5^\circ\text{C}$ |

(Fonte: Tendinha, 2007; adaptado de Diretiva Sanitária nº 77/CEE de 21 de Dezembro de 1979)

Na tabela 4 estão representados valores médios e intervalos de pH e a_w de algumas carnes e produtos cárneos.

Tabela 4 – Valores médios ou intervalos de valores de pH e a_w de carne e de produtos cárneos Portugueses.

| Produto | pH | a_w |
|-----------------------|---------|-----------|
| Carne fresca de vaca | 5,4-5,8 | 0,98 |
| Carne fresca de porco | 5,6-6,0 | 0,98 |
| Enchidos fumados | >4,5 | <0,90 |
| Chouriço cru seco | 4,9-5,2 | 0,85-0,93 |
| Presunto cru | 5,3-5,8 | 0,90-0,93 |
| Morcela | 6,2-7,0 | 0,96-0,98 |

(Fonte: Peres, 2000)

1.7.2 Potencial hidrogeniónico

O potencial hidrogeniónico (pH) é a medida que indica o grau de acidez de um alimento e é um fator muito influente na multiplicação e metabolismo dos microrganismos. Como diferentes bactérias toleram diferentes valores de pH, este é também responsável por alguma seleção da flora microbiana de um alimento. De um modo geral, quanto

menor o valor de pH maior a dificuldade de desenvolvimento dos microrganismos existentes num determinado produto. Contrariamente, os alimentos com pH mais elevado oferecem melhores condições para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos. A grande maioria dos microrganismos potencialmente patogénicos prolifera melhor em produtos com pH neutro (Lawrie & Ledward, 2006).

Sendo o pH um importante fator químico que condiciona as reacções enzimáticas, bem como a sobrevivência e a multiplicação dos microrganismos nos alimentos, este fator constitui uma potencial barreira que interessa conhecer e controlar ao longo de todo o processo produtivo, a fim de garantir uma maior segurança e melhor conservação dos géneros alimentícios até ao seu consumo final (Hernández-Herrero, Roig-Sagués, López-Sabater, Rodríguez-Jerez & Mora-Ventura, 1999; Rompf & Jahn, 2000; Ordóñez & Hoz, 2007).

A maioria dos produtos cárneos apresenta um pH de 5,6 ou superior, o que torna estes produtos suscetíveis à multiplicação de bactérias e fungos. A presença destes microrganismos conduz à proteólise e à quebra anaeróbica das proteínas (putrefacção), libertando compostos aminados com forte odor (Jay *et al*, 2005).

O pH exerce uma importante função na estabilidade dos produtos cárneos transformados, dado que a inibição dos microrganismos pode ser conseguida pelo aumento da acidez de forma artificial (adição de ácidos fracos) ou de forma natural (fermentação – importância das bactérias lácticas).

1.7.3 Proteína

A proteína é o composto mais abundante do músculo (18%), depois da água.

Nos produtos de origem animal, alimentos proteicos por excelência, é importante controlar a abundância relativa da proteína por dois motivos: avaliar a qualidade nutritiva do alimento e controlar a composição de certos produtos transformados, aos quais é permitida a adição de gorduras, glúcidos, água, entre outros.

De acordo com a Portaria nº1313/93 de 29 de Dezembro não existe qualquer limitação para teores mínimos de proteína para produtos transformados.

1.7.4 Gordura

A gordura encontra-se em muito pequena quantidade no músculo (3%), quando comparada com a água ou a proteína, no entanto, desempenha um importante papel nas características organolépticas da carne. Atualmente, dada a relação entre o consumo de gorduras e a incidência de doenças cardiovasculares, o consumidor tem tendência a procurar alimentos proteicos pobres em gordura, sacrificando muitas vezes as suas qualidades sápidas (Tendinha, 2007).

A gordura tem um impacto nos valores finais do pH e da a_w do produto. Altos níveis de gordura aumentam o pH do preparado de carne, mas sem influência na fermentação do produto (Feiner, 2006).

A determinação do teor em gordura é importante porque permite, esclarecer o consumidor acerca do valor nutritivo dos produtos de origem animal, e permite controlar os produtos transformados, aos quais é permitido adicionar gordura.

1.7.5 Cloretos

O sal de mesa ou sal de cozinha é um composto químico predominantemente constituído por cloreto de sódio (NaCl), sendo talvez o condimento mais antigo usado pelo Homem (Viegas, 2009b).

De acordo com o Decreto - Lei nº 350/2007, de 19 de Outubro, o sal alimentar é o produto cristalino de extracção, no estado natural ou tratado, essencialmente constituído por cloreto de sódio num mínimo de 90% do produto seco.

O cloreto de sódio é um ingrediente de utilização frequente no processamento de alimentos. O seu emprego na conservação da carne, peixe e produtos de salsicharia é feito desde tempos imemoriais sendo responsável pelo sabor salgado e pela intensificação e harmonização dos sabores entre os diferentes ingredientes (Patarata, 1995).

A ingestão de sódio é motivo de preocupação em muitos países industrializados, pois o seu consumo excessivo tem sido associado à hipertensão, aumento do risco de acidentes vasculares cerebrais e morte prematura devida a doenças cardiovasculares. A quantidade de sal recomendada para um adulto saudável é de 5-6 g/dia e 1 a 3 g/dia para

indivíduos hipertensos. Têm sido feitos esforços para tentar baixar as quantidades de sal nos alimentos, mas essa diminuição afeta o sabor, a textura e o tempo de prateleira desses mesmos produtos (Puolanne, Ruusunen & Vainionpää, 2001; Ruusunen & Puolanne, 2005).

A sua capacidade sequestrante de moléculas de água (uma molécula de NaCl consegue ligar-se a seis moléculas de H₂O), faz do sal um humectante que permite diminuir o a_w nos alimentos e com isso aumentar a sua estabilidade mesmo quando estes permanecem com um elevado teor em água, garantindo a manutenção de características organolépticas como a plasticidade e melhorando os rendimentos na produção, desde que utilizado dentro dos limites sensoriais aceitáveis para cada produto.

O poder conservante do sal cria um efeito depressor na a_w do alimento, mas a sua acção inibitória sobre a multiplicação dos microrganismos também é exercida de forma directa, provocando osmólise, interferindo no bom funcionamento da membrana e dos sistemas enzimáticos das células, seleccionando e regulando assim os microrganismos que conseguem desenvolver-se, dependendo da sensibilidade que varia de espécie para espécie (Flores, 1997).

1.8 Fatores extrínsecos que influenciam os produtos cárneos

Além dos fatores intrínsecos existem os fatores extrínsecos que influenciam a conservação dos alimentos.

- Temperatura de armazenamento – A temperatura de refrigeração pode retardar a multiplicação microbiana, durante o armazenamento. No entanto com o prolongamento do tempo os microrganismos psicrófilos e psicrotrófilos podem multiplicar-se e produzir algumas alterações nos alimentos. Segundo as diferentes temperaturas óptimas, máximas e mínimas de crescimento, os microrganismos podem ser classificados como: mesófilos, termófilos, psicrófilos e psicrotróficos.

A temperatura é dos fatores que mais afeta a atividade e o desenvolvimento microbiano, pois esta influencia a atividade das enzimas microbianas e de enzimas dos tecidos. As enzimas presentes nos alimentos continuam a sua atividade durante o armazenamento e a sua atividade é tanto menor quanto menor for a temperatura de armazenamento. No geral, às temperaturas de refrigeração, os microrganismos têm dificuldade de se

desenvolver, o que diminui fortemente a produção de toxinas, levando a um aumento da conservação dos produtos e a uma preservação das características organolépticas e nutricionais do alimento. Contudo, a refrigeração não permite destruir os microrganismos, ao contrário de temperaturas elevadas, o que leva ao seu desenvolvimento quando a temperatura lhes é favorável. Além disso, não permite eliminar algumas toxinas previamente produzidas. (Gava *et al.*, 2008, citados por Guerreiro, 2011).

- Humidade – O crescimento microbiano é iniciado mais rapidamente com valores de humidade relativa alta, mesmo a baixas temperaturas. Quando os alimentos mais secos são colocados em ambientes húmidos, pode ocorrer uma absorção de humidade por parte da superfície do alimento, permitindo a multiplicação de microrganismos (Novais, 1998).

- Atmosfera gasosa – A atmosfera onde os alimentos são conservados é muito importante. Quando temos quantidades de CO₂ à volta de 10%, estamos perante uma atmosfera controlada ou modificada, podendo o seu uso aumentar o período de armazenamento das carnes (Novais, 1998).

A eliminação do oxigénio em algumas formas de embalagem em atmosfera modificada, leva à alteração da microbiota de deterioração, impedindo o crescimento de aeróbios estritos e retardando o crescimento de anaeróbios facultativos (Lund, Baird-Parker & Gould, 2000). O controlo da temperatura é essencial para a eficácia da embalagem em atmosfera modificada, pois a função do CO₂ é bem sucedida quando a temperatura é baixa (Lund *et al.*, 2000).

O CO₂ é muito eficaz contra as bactérias Gram-negativas, ao contrário das bactérias Gram-positivas em que o seu efeito é menor (Santos *et al.*, 2005b).

2. Materiais e Métodos

2.1 Processo de fabrico dos maranhos e colheita de amostras

As amostras analisadas neste trabalho, num total de 50 unidades, foram cedidas por empresas produtoras de maranhos e por uma grande superfície. As amostras foram em geral colhidas nas próprias empresas e, no caso da grande superfície, no local de venda. Houve também casos de amostras entregues diretamente no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pelo produtor, durante o circuito de distribuição.

Foram analisadas amostras de 8 empresas (tabela 5), localizadas nos concelhos de Vila de Rei, Sertã, Proença-a-Nova, Mação, e Castelo Branco. Dado que o maranho se encontra à venda no estado cru ou já cozido e embalado a vácuo (Figura 2), a amostragem incidiu sobre estas duas formas de apresentação. Como se pode verificar na tabela 4, a maioria das amostras analisadas encontrava-se no estado cru.

Por outro lado, a colheita de amostras incidiu sempre sobre 5 unidades por lote, para que os resultados pudessem ser interpretados com base no Regulamento (CE) 1441/2007.

Tabela 5 – Empresas fornecedoras das amostras de maranho analisadas neste trabalho, localização, estado da amostra e número de amostras fornecidas.

| Empresa/Produtor | Localização | Estado da amostra | Nº de unidades |
|--------------------|------------------|-------------------|----------------|
| Carnes Simões | Sertã | Cru | 5 |
| Casel | | Cru | 5 |
| Estrela da Beira | Vila de Rei | Cru | 5 |
| Carpinhal | | Cozido | 5 |
| Almeida e Filhos | Proença-a-Nova | Cru | 5 |
| Verganista | Sobreira Formosa | Cru | 5 |
| Salsibeira | Alcains | Cru | 5 |
| | | Cozido | 5 |
| O Fumeiro da Beira | Mação | Cru | 5 |
| | | Cozido | 5 |

De forma a garantir a confidencialidade das empresas produtoras de maranho, estas passaram a ser designadas de forma aleatória pelas letras A, B, C, D, E, F, G e H.



Figura 2 – Maranhos crus embalados a vácuo. (Fonte: autora)

O processo de fabrico das empresas contactadas para a execução deste trabalho é muito semelhante e apresenta-se esquematizado na Figura 3.

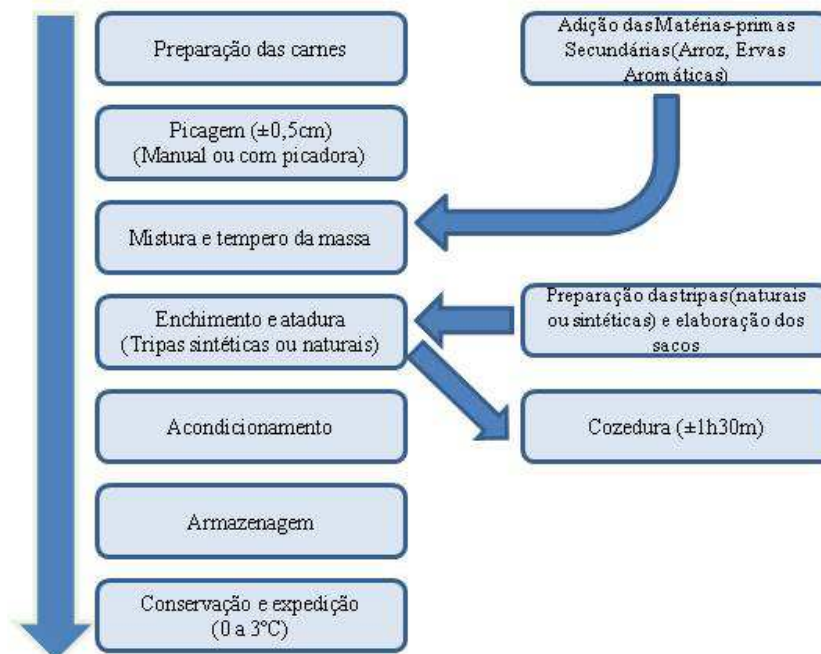


Figura 3 – Fluxograma do processo produtivo do marancho. Nota: a etapa de cozedura apenas ocorre nas amostras cozidas

As carnes utilizadas nos maranhos em estudo são provenientes, predominantemente de pequenos ruminantes (caprinos e ovinos), e de suínos.

Depois da preparação das carnes, faz-se a sua picagem com recurso a máquinas picadoras, ou manualmente, de forma grosseira, em pedaços de aproximadamente 0,5 cm. Efetua-se igualmente a miga dos restantes ingredientes, como é o caso do presunto, chouriço, toucinho que são então misturados na carne (Figura 4). Estes ingredientes podem variar de produtor para produtor. De seguida é adicionado o arroz cru, sal, vinho

branco e outros condimentos característicos deste produto como a hortelã ou o serpão e vinho branco.



Figura 4- Miga ou corte dos ingredientes. (Fonte: <http://www.google.pt>)

Após a mistura dos ingredientes faz-se o enchimento dos sacos (Figura 5), os quais são pequenos, têm forma ovalada a cilíndrica, e são elaborados a partir dos compartimentos gástricos de pequenos ruminantes, no caso da tripa natural, ou recorrendo a tripa sintética. Os sacos não podem ficar muito cheios para que, durante a cozedura dos mesmos, o arroz tenha espaço para cozer.



Figura 5- Atadura dos sacos após enchimento dos mesmos. (Fonte: <http://sicnoticias.sapo.pt/vida/2011/06/13/confeccionado-em-proenca-a-nova-maranho-com-40-metros-candidato-a-maior-do-mundo>)

De seguida são acondicionados em câmaras de refrigeração para poderem ser comercializados.



Figura 6 – Maranho pronto para ir para a câmara de refrigeração (Fonte:http://1.bp.blogspot.com/_wE8sT2XKYow/TIfsxpLlmVI/AAAAAAAAACwo/rVDYrQTgj1k/s400/P1060882.JPG)

Nas empresas que fazem a comercialização dos maranhos cozidos, a cozedura é feita depois do enchimento e atadura dos sacos.

2.1 Transporte e receção de amostras

De acordo com o que foi anteriormente referido, as amostras utilizadas para a realização deste trabalho foram colhidas em unidades de produção, numa grande superfície e por produtores que entregavam diretamente as amostras nos laboratórios da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

As amostras foram transportadas de forma a garantir que estas se mantivessem refrigeradas até à chegada ao Laboratório de Microbiologia.

Após a sua receção, foram guardadas no frigorífico a uma temperatura de aproximadamente 4 °C. Foi atribuído um código interno identificativo para cada amostra, que garantisse o acompanhamento destas até à saída do resultado final.

As amostras analisadas neste trabalho apresentavam, de acordo com a informação constante nos rótulos, as características mencionadas na tabela 6.

2.2 Preparação das amostras e da suspensão mãe

Durante a preparação das amostras para análise microbiológica, de acordo com as boas práticas de laboratório (BPL) descritas na norma (ISO 7218, 2007), as embalagens foram inicialmente colocadas num tabuleiro em inox estéril (Figura 7). Posteriormente, desinfetou-se uma zona da embalagem com álcool a 70%, abriu-se a embalagem com o auxílio de uma lâmina esterilizada, retirou-se o maranho e seguidamente retirou-se a respetiva pele.



Figura 7 – Preparação da amostra de maranho em tabuleiro de inox estéril (Fonte: autora)

Tabela 6 – Informação dos rótulos presentes nas amostras analisadas.

| Empresa/Produtor | Ingredientes | Instruções/Informações | Validade |
|------------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| Estrela da Beira Vila de Rei | Carne de suíno, arroz, hortelã e sal. | 40/45 Minutos de fervura em água simples | 30 dias (cru) |
| Casel Sertã | Ovino adulto, pimenta, arroz, hortelã, presunto, chouriço, carne gorda, sal, carne magra, vinho. | Conservar entre 0°C e 4°C Embalado em atmosfera controlada (gás ou vácuo) | 10 dias (cru) |
| Almeida e Filhos Proença-a-Nova | Carne de cabrito, carne e gordura de porco, chouriço, presunto, sal, alho, especiarias, vinho e aromatizantes naturais. | Consumir após confecção culinária. Conservar entre 0°C e 3°C Acondicionado em atmosfera protectora | 10 dias (cru) |
| Carpinhal Vila de Rei | Carne de porco, arroz, presunto, chouriço, sal azeite, vinho e especiarias. | Conservar entre 0°C e 5°C | 30 dias (cozido) |
| Verganista Sobreira Formosa | 60% Carne de cabra, 20% arroz, 5% de presunto serrano, 5% de chouriço, vinho, sal. | Não voltar a congelar. (O nosso produto não foi congelado) | 6 meses no produto congelado. |
| Salsibeira Alcains | Carne de caprino, suíno, arroz, presunto e condimentos. | | 10 dias (cru) 3 meses (cozido) |
| O Fumeiro da Beira Mação | Carne de porco, bucho e carne de borrego, arroz, presunto, chouriço, hortelã, especiarias. | Cozer 12 minutos em água, sal hortelã (facultativo). Retire logo da Água. Conservar entre 0°C e 6°C | 30 dias para os cozidos. |
| Carnes Simões Sertã | Carne de ovino, caprino e porco, presunto, chouriço, hortelã, sal e arroz. | Aconselha-se a uma cozedura de 1h15m Embalado a vácuo Conservar entre 0°C e 4°C | 10 dias (cru) |

O maranho foi cortado em pequenos fragmentos sempre com material esterilizado.

A preparação da suspensão-mãe para análise microbiológica seguiu o procedimento constante na Norma (ISO 6887-2, 2003).

Pesou-se na balança (Mettler Pc 2000), a quantidade necessária de produto dependendo do parâmetro microbiológico a analisar (10 g para as contagens e 25 g para as pesquisas), com os devidos cuidados de assepsia, para sacos esterilizados próprios para *Stomacher* (PE dim 177x304 mm com tela filtrante Seward Limited, London, UK), devidamente identificados com o número da amostra, data e hora da colheita.

À toma da amostra de 10 g adicionou-se diluente estéril (90 ml de peptona sal), de modo a obter-se uma suspensão-mãe, a qual foi usada na contagem se *Staphylococcus* coagulase positiva e na contagem de *E. coli*. Às tomas de 25 g de amostra foi adicionado 225 ml dos caldos de enriquecimento específicos para a pesquisa de *L. monocytogenes* e pesquisa de *Salmonella* spp.

A mistura assim preparada foi ao aparelho homogeneizador *Stomacher* (*Stomacher* 400 Circulator, Seward Limited, London, UK), (Figura 8) durante 1 minuto a 230 rotações por minuto (rpm), de modo a obter uma correta homogeneização.



Figura 8 – *Stomacher* 400 circulator – Homogeneizador de amostras (fonte: autora)

Após a retirada das tomas de amostra para as análises microbiológicas a amostra restante foi colocada num saco estéril e posteriormente usada para a realização das análises físico-químicas.

2.3 Análises microbiológicas

2.3.1 Procedimento para a pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. efetuou-se seguindo a Norma (ISO 6579, 2002), com pré-enriquecimento de 25 g de amostra em 225 ml de água peptonada tamponada (APT) (Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França) durante 18 h \pm 2h a 37 °C \pm 1 °C, seguido do enriquecimento em simultâneo nos meios líquidos *Muller Kauffmann Tetrathionate* (MKTTn) suplementado com novobiocina (ambos produtos OxoidTM, Cambridge, UK) e solução de iodo-iodeto e iodeto de Potássio (ambos produtos Merck, Danstald, Germany), e Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) (Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França), que incubaram 24 h \pm 2 h respectivamente a 37°C \pm 1°C e a 41,5 °C \pm 1°C.

Seguiu-se o isolamento nos meios selectivos sólidos *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* XLD (Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França) e *Brilliant-Green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar* (BPLS) (Merck, Danstald, Germany), ou *Gelose au Vert Brillante et au Rouge de Phenol* (*Edel et Kampeimacher*) (Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França) que incubaram a 37 °C \pm 1 °C por 24 h \pm 2 h, após o que as colónias suspeitas foram repicadas para o meio sólido *Triple Sugar Iron* (TSI) (Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França) (Figura 9).

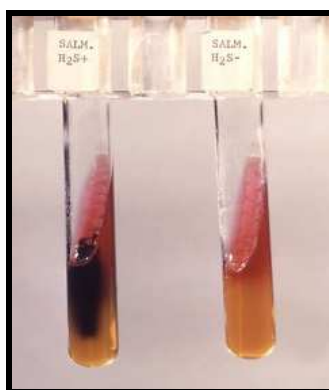


Figura 9 – Meio tryptone sugar iron (TSI)

(Fonte: <http://totallyfreeimages.com/previews/standard/7/8/c/17381219cdad2abd8090661abb6acc1f6a45d78.jpg>)

Trata-se de um meio em rampa que permite verificar a fermentação (ou não) de três açúcares, com ou sem produção de gás, e produção de H₂S (Marchal & Bourdon, 1973). A diferenciação das bactérias no meio XLD fundamenta-se na fermentação da xilose,

descarboxilação da lisina e produção de H₂S, reacções que permitem efectuar uma diferenciação primária de *Shigella* e *Salmonella* de outras bactérias não patogénicas. A concentração de desoxicolato, agente inibidor, permite a inibição de coliformes sem interferir com o desenvolvimento de *Salmonella* e *Shigella*. As colónias apresentam-se vermelhas com centro negro. O meio BPLS apresenta elevada concentração de verde brilhante que inibe o crescimento da maioria das bactérias. A presença de lactose e sacarose permite a distinção entre bactérias do género *Salmonella* que apresentam colónias rosa com halo vermelho à volta das colónias, da flora competitiva que apresenta colónias amarelas ou esverdeadas.

Quando a cultura se apresentava característica no TSI, fez-se a prova de oxidase e, no caso desta apresentar um resultado negativo, fez-se o isolamento em *Tryptone Soy Agar* (TSA) (Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França), para posterior confirmação mediante recurso aos testes bioquímicos da galeria API 20E (bioMérieux® SA, Marcy L'Étoile, França) (Figura 10).



Figura 10– Galeria API 20E após inoculação e incubação a 37°C (Fonte:autora)

2.3.2 Procedimento para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e serotipagem por *Polymerase Chain Reaction multiplex*

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi seguida a norma (ISO 11290-1, 1996) e a (ISO-11290-1 Amendment 1, 2004) com enriquecimento primário de 25 g da amostra em 225 ml do primeiro caldo de Fraser (Merck, Danstald, Germany), indo a incubar durante 24 h ± 2 h a 30 °C ± 1 °C. A partir deste foi efectuada uma passagem para o segundo caldo de Fraser (Merck, Danstald, Germany), indo a incubar durante 48 h ± 2 h a 37 °C ± 1 °C. Para a preparação do meio Fraser completo foram adicionados o suplemento selectivo e citrato de ferro (III) amoniacal (ambos produtos Merck, Danstald, Germany).

O isolamento realizou-se a partir dos caldos de enriquecimento, mediante sementeira por estria à superfície nos meios de cultura Oxford Selective Agar (Oxoid™, Cambridge, UK) e *Ottaviani Agosti Agar* (OAA) (BioMerieux® SA, Marcy L'Étoile, França).

O meio OAA permite a detecção de β -glucosidase que actua sobre um substrato cromogénico, fazendo desta forma a identificação presuntiva do género *Listeria* que apresenta colónias azuis esverdeadas. As colónias características de *L. monocytogenes* apresentam um halo opaco, que as distingue das outras espécies pertencentes a este género (Figura 11), e cuja formação está relacionada com a actividade da fosfolipase C. A selectividade do meio é conferida pela acção combinada do cloreto de lítio e dos antibióticos (ácido nalidíxico, ceftazidima e polimixina B).



Figura 11 – Colónias típicas de *Listeria monocytogenes* no meio de cultura *Ottaviani Agosti Agar* (OAA).
(Fonte: autora)

As colónias típicas em Oxford são pequenas, acinzentadas e rodeadas por um halo negro resultante da hidrólise da esculina. Ao fim de 48 horas de incubação estas colónias tornam-se mais escuras, aumentam o seu diâmetro e apresentam uma depressão central.

Para confirmação das colónias suspeitas foi efectuada a repicagem de 5 colónias para o meio TSA (Biokar Diagnostics™, Beauvais, França) com extrato de levedura (Merck, Darmstadt, Germany) e posterior incubação durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

As colónias típicas neste meio apresentam cerca de 1 a 2 mm de diâmetro, são convexas e têm margens regulares.

Os testes de confirmação iniciam-se com o estudo da transiluminação de Henry, que permite ver a luminiscência azul característica das colónias de *Listeria* spp. Às que apresentaram esta luminiscência fez-se o teste de catalase, CAMP test e coloração de

Gram. Por fim, efetuaram-se os testes bioquímicos através da inoculação da galeria API Listeria (bioMerieux® SA, Marcy L'Étoile, França).

Todos os isolados de *L. monocytogenes* obtidos das amostras positivas, num total de 14, foram crioconservados (Anexo II), para posterior serotipagem. Esta foi realizada de acordo com o método descrito em Doumith, Buchrieser, Glaser, Jacquet & Martin, (2004), com algumas alterações.

O ensaio de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), multiplex foi desenvolvido no *Institut Pasteur* de Paris por Doumith e colaboradores, em 2004, e é baseado na utilização de cinco pares de *primers* capazes de agrupar as estirpes de *L. monocytogenes* em quatro grupos filogenéticos relacionados com o serovar (Doumith, *et al.*, 2004). Estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao serogrupo 1/2a, 3a geram fragmentos amplificados a partir dos genes *lmo0737* (691 pb), e *prs* (370 pb), as pertencentes ao serogrupo 1/2b, 3b, 7 geram fragmentos amplificados a partir dos genes ORF2819 (471 pb) e *prs* (370 pb), as pertencentes ao serogrupo 1/2c, 3c geram fragmentos amplificados a partir dos genes *lmo0737* (691 pb), *lmo1118* (906 pb) e *prs* (370 pb), e por fim, as estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao serogrupo 4b, 4d, 4e geram fragmentos amplificados a partir dos genes ORF2819 (471 pb), ORF2110 (597 pb), e *prs* (370 pb).

Este método não diferencia o serovar 1/2a do 3a, o serovar 1/2c do 3c, o serovar 1/2b do 3b e do 7, nem o serovar 4b do 4d e do 4e (Doumith *et al.*, 2004).

Este método permite separar os quatro serovares mais prevalentes (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) de *L. monocytogenes* em 4 serogrupos distintos. Os genes marcadores usados são *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819, ORF2110 e *prs* (tabela 7). Este último caracteriza-se por ser um gene comum a todas as espécies do género *Listeria*.

Tabela 7 – Fragmentos amplificados em cada um dos serovares de *Listeria monocytogenes*.

| Amplificação dos fragmentos de gene por <i>Multiplex PCR</i> | | | | | Serogrupos |
|--|----------------|---------|---------|------------|--|
| <i>lmo1118</i> | <i>lmo0737</i> | ORF2110 | ORF2819 | <i>prs</i> | |
| - | + | - | - | + | <i>L. monocytogenes</i> sv 1/2a, 3a |
| - | - | - | + | + | <i>L. monocytogenes</i> sv 1/2b, 3b, 7 |
| + | + | - | - | + | <i>L. monocytogenes</i> sv 1/2c, 3c |
| - | - | + | + | + | <i>L. monocytogenes</i> sv 4b, 4d, 4e |
| - | - | - | - | + | <i>Listeria</i> spp. |

Fonte: (Pintado, 2005)

2.3.3 Procedimento para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* - Técnica com confirmação de colónias

O procedimento seguido baseou-se na norma (NP 4400-1, 2002).

A partir da suspensão-mãe e das respectivas diluições foi feita uma sementeira à superfície de 0,1 ml ou 1 ml em placas com meio selectivo de Baird-Parker Agar (BP) (Oxoid™, Cambridge, UK). Seguiu-se a incubação durante 48 h \pm 2 h a 37 °C \pm 1 °C, para posterior contagem e isolamento das colónias características e não características como descrito na norma de referência. Neste meio a glicina, o cloreto de lítio e o telurito de potássio atuam como agentes seletivos ao passo que a adição de gema de ovo permite a observação da lecitinase. As colónias caracterizam-se por serem cinzentas escuras ou pretas devido à redução do telurito, brilhantes, convexas, com margens inteiras e halos opacos em seu redor devido a ação proteolítica. Dentro destes, muitas vezes forma-se um halo transparente devido à ação de uma lipase.

Três a cinco colónias características foram repicadas para o meio *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) (Merck, Danstald, Germany), e incubadas 24 h \pm 2 h a 37 °C \pm 1 °C, para uma posterior confirmação através da prova da coagulase. Foram igualmente repicadas para confirmação 3 a 5 colónias não características.

Para a pesquisa da coagulase juntou-se 0,1 ml da cultura jovem em BHI a 0,3 ml de plasma de coelho com EDTA (Merck, Danstald, Germany), em tubos de hemólise, indo depois a incubar a 37 °C \pm 1 °C durante 4 h a 6 h ou, se necessário, até 24 h.

Considera-se a reação como positiva quando o coágulo ocupa mais de 3 quartos do volume inicialmente ocupado pelo líquido (Figura12).



Figura 12 – Reação de coagulase positiva (Fonte: <http://prokariotae.tripod.com/Coagulase.jpg>)

2.3.4 Procedimento para a contagem de *Escherichia coli*

Foi seguido o método horizontal para a contagem de *E. coli* presumíveis, Método por contagem de colónias a 44°C, referido na norma (ISO 16649-2, 2001).

A partir da suspensão-mãe (primeira diluição decimal), foram preparadas mais 3 diluições decimais em peptona sal.

Posteriormente, realizou-se uma sementeira por incorporação de 1ml de cada diluição no meio *Tryptone Bile X-Glucuronide* Agar (TBX) (Merck, Danstald, Germany), indo a incubar a 44 °C ± 1 °C durante um período máximo de 24 h. Este meio contém um substrato cromogénico, designado 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucuronideo (X – glucuronideo), que é degradado pela enzima β -glucuronidase, produzida pela maior parte das estirpes de *E. coli* (apenas 3% a 4 % são β -glucuronidase negativas, entre as quais se inclui o serovar O157), por quebra da ligação do açúcar com o cromogéneo. Como se trata de uma substância insolúvel acumula-se dentro da célula levando à formação de colónias azuis muito fáceis de identificar e diferenciar da flora envolvente, pelo que não é necessário efetuar qualquer teste de confirmação. O meio TBX apresenta ainda sais biliares que inibem o crescimento das bactérias Gram positivas (Figura 13).

Depois da incubação, contaram-se as colónias de cada placa que continham menos de 150 colónias características e menos de 300 no total.

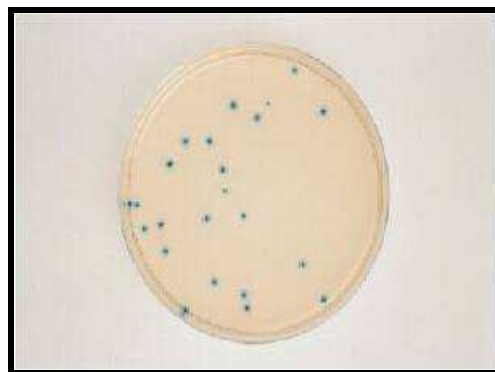


Figura 13 – Colónias características de *Escherichia coli* no meio *Tryptone Bile X-Glucuronide* (TBX) Agar.

(Fonte: <http://www.frilabo.pt/fcms/images/stories/TBX.jpg>)

2.3.5 Cálculo e expressão dos resultados

Expressão dos resultados dos métodos de pesquisa

O resultado da *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* é expressa do seguinte modo:

Positiva em 25g ou Negativa em 25g.

Cálculos efetuados nas contagens

As contagens das placas semeadas foram executadas após o período de incubação mencionado em cada norma específica, como referido anteriormente. Foram contadas as colónias de placas contendo menos de 150 colónias, seguindo as indicações da norma (ISO 7218, 2007).

Para aplicação da fórmula geral são consideradas duas diluições consecutivas, sendo necessário que pelo menos uma das placas apresente um mínimo de 10 colónias. Foi então calculado o número (N) de unidades formadoras de colónias (ufc) presentes em cada amostra pela média ponderada avaliada através da seguinte operação:

$$N = \frac{\Sigma C}{1,1 \times V \times d}$$

Em que:

ΣC - é a soma das colónias contadas nas placas consideradas nas duas diluições consecutivas em que pelo menos uma delas apresente um mínimo de 10 colónias;

V - é o volume do inóculo semeado em cada placa em mililitros

d - é a taxa de diluição correspondente à primeira diluição considerada.

No caso da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, método que necessita de confirmação em que são contadas colónias características e colónias não características, as colónias repicadas, 3 a 5 de cada tipo e de cada placa original, são utilizadas para calcular o número de microrganismos para cada uma das placas com recurso à seguinte equação:

$$a = \frac{b^c}{A^c} \times C^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times C^{nc}$$

Em que:

b^c - é o número de colónias características que se revelaram coagulase +

b^{nc} - é o número de colónias não características que se revelaram coagulase +

C^c - é o número total de colónias características contabilizadas na placa;

C^{nc} - é o número total de colónias não características contabilizadas na placa;

A^c - é o número de colónias características submetidas ao teste da coagulase (geralmente 5).

A^{nc} - é o número de colónias não características submetidas ao teste da coagulase (geralmente 5).

Em todas as contagens, quando a placa da suspensão inicial apresenta um número de colónias inferior a 10, o resultado é considerado um número estimado e é obtido através da equação:

$$N_E = \frac{N}{V \times d}$$

Em que:

N_E - é o número estimado de ufc;

N - é o número de colónias contadas na placa;

V - é o volume semeado;

d - é o factor de diluição.

Quando na placa da suspensão-mãe não ocorreu desenvolvimento de colónias o resultado apresenta-se como:

$$< \frac{1}{V \times d}$$

Em que:

V - é o volume semeado;

d - é o factor de diluição.

Todos os resultados foram arredondados a dois algarismos significativos, entre 1,1 e 9,9, multiplicados pela correspondente potência de base 10.

2.4 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição da Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Os parâmetros analisados foram os seguintes: atividade da água (a_w), potencial hidrogeniônico (pH), teor de cloretos, proteína total e gordura total.

2.4.1 Preparação da amostra

A partir da mesma unidade de amostra anteriormente analisada microbiologicamente, foi efetuada a preparação de amostra para as análises físico-químicas. Começou-se por retirar toda a pele e linhas. O produto foi depois triturado e homogeneizado numa máquina de picar até se obter uma pasta fina.

As amostras assim preparadas foram colocadas em frascos de vidro de boca larga com tampa hermética, devidamente identificados, para sua posterior análise físico-química. Na tabela 8 encontram-se referidos os métodos de análise usados.

Tabela 8 – Métodos de análise e de referência usados nas análises físico-químicas.

| Parâmetro/determinação | Método de análise/referência |
|-------------------------------|---|
| Atividade da água (a_w) | Rotronic Hygroskop DT |
| Potencial hidrogeniônico (pH) | NP 3441 (1990) |
| Teor de cloretos | A.O.A.C. (1975) |
| Proteína total | Método de Kjeldhal, referido na norma, NP 1612 (2006) com algumas modificações. |
| Gordura total | Método de Soxhlet A.O.A.C. (1975) |

2.4.2 Determinação da atividade da água

A determinação da a_w fez-se com recurso a um aparelho previamente calibrado, modelo Rotronic Hygroskop DT (Figura 14) equipado com uma estação de medida do tipo WA14-TH termicamente estável a 25 °C e copos de poliestireno ref^a PS 14 (14ml).

A amostra foi hermeticamente fechada na célula do aparelho, permitindo que a humidade relativa (HR) do alimento e a HR do ambiente no interior da célula ficassem em equilíbrio. O sensor localizado na parte superior da célula, faz a leitura constante da HR, estabilizando quando a variação for inferior a 0,02% HR/min e 0,02 °C/min.



Figura 14 – Rotronic Hygroskop DT (Fonte:autora)

Cálculos

Leitura no aparelho Rotronic Hygroskop DT = 99.2

$$A_w = \text{HR}/100$$

$$A_w = 99,2/100$$

$$A_w = 0,992$$

2.4.3 Determinação do potencial hidrogeniónico

O pH das amostras foi determinado com recurso a um potenciómetro (Hanna Instruments – HI 9024 *microcomputer pH meter*) (Figura 15), tendo a medição sido feita em triplicado, seguido de uma média aritmética das três determinações para assim se obter o valor do pH. Recorreu-se à norma (NP 3441, 1990).



Figura 15 – Potenciómetro HI 9024 – Hanna Instruments (Fonte:autora)

2.4.4 Determinação do teor de cloretos

Para a determinação do teor de cloretos foi seguido o método A.O.A.C. (1975), conforme descrito no procedimento interno do Laboratório de Nutrição da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Os cloretos, expressos em % de cloreto de sódio, determinaram-se titulando o excesso de nitrato de prata, que não foi combinado com os cloretos existentes na amostra, com tiocianato de potássio, utilizando como indicador o sulfato de ferro e amónio.

A destruição da matéria orgânica e a clarificação da solução (Figura 16), é assegurada pelo permanganato de potássio e pelo calor. O nitrobenzeno destina-se a proteger o precipitado da reacção com o tiocianato de potássio.



Figura 16 – Titulação de cloretos (Fonte:autora)

Cálculos:

Normalidade NO_3Ag – 0.1 (N)

KSCN – 0.1 (N')

$P_m (\text{NaCl}) = 58.44$

V – volume gasto de NO_3Ag (20)

V' - Volume gasto de KSCN

$\% \text{NaCl} = [(2 - (V' \times N')) \times P_m (\text{NaCl})] / \text{peso da amostra}$

2.4.5 Determinação da proteína total

Para a determinação da proteína total foi seguido o método de *Kjeldhal* referido na norma (NP 1612, 2006), com algumas modificações. O aparelho usado encontra-se na Figura 17.



Figura 17 – Aparelho Kjeltec Analyzer Unit 2300 (Fonte:autora)

Este método é constituído por três fases distintas: mineralização, destilação e titulação. O azoto total é doseado por mineralização com ácido sulfúrico concentrado, que promove a transformação do azoto orgânico em azoto amoniacal, na presença de sulfato de cobre e sulfato de potássio como catalisadores.

A adição de hidróxido de sódio provoca a libertação de amoníaco, sendo este destilado e recebido num excesso de solução de ácido bórico com indicador.

O amoníaco combinado com ácido bórico é titulado pelo ácido clorídrico.

Cálculos

Partindo-se do pressuposto de que a proteína contém 16% de azoto, o teor da proteína bruta do produto é obtido através da multiplicação do seu teor em azoto pelo factor 6,25.

100g de proteína-----16g de azoto

Xg de proteína-----1g de azoto

$$X = 6,25$$

Assim:

$$\%(\text{NT}) = \frac{(\text{ml HCl amostra} - \text{ml HCl branco}) \times N \times 14,008}{10 \times \text{massa da amostra (g)}}$$

$$\% \text{ Proteína total} = \% \text{ NT} \times 6,25$$

2.4.6 Determinação da gordura total

Para a determinação da gordura total foi seguido o método de *Soxhlet* descrito em A.O.A.C. (1975), segundo a qual a gordura é extraída da amostra seca através do solvente apropriado, o éter de petróleo.

No aparelho *Soxtec* (Soxtec System HT 1043 Extraction Unit) (Figura18), o solvente é vaporizado e condensado, circulando através da amostra e permitindo que a gordura, bem como todas as substâncias solúveis no éter, sejam completamente arrastadas pelo solvente que é recuperado no copo do aparelho previamente pesado. A gordura é determinada por diferença de peso após a evaporação do solvente.



Figura 18 – Aparelho Soxtec System HT 1043 Extraction Unit (Fonte:autora)

Cálculos:

$$\% \text{ Gordura} = [(P3 - P2) / P1] \times 100$$

Sabendo que:

P1 – Peso da amostra

P2 – Peso do copo de alumínio

P3 – Peso após arrefecimento.

2.5 Tratamento estatístico dos resultados

Os dados obtidos nas contagens de microrganismos foram tratados com recurso aos programas Microsoft Office Excel 2010 para as medianas, o programa SPSS para o teste *t* de *Student*, na contagem de *E. coli* das amostras cruas de maranho, e o *R commander* (Version 2.15.3 (2013)), para os diagramas de extremos e quartis.

3. Resultados e Discussão

No Anexo III, estão representados os valores das análises microbiológicas efectuadas aos maranhos. Nesta tabela encontramos tanto as amostras no estado cru (amostras A, B, C, E, F, G e H), como as amostras comercializadas no estado cozido (amostras com asterisco: D*, G* e F*). Cada amostra é constituída por 5 unidades identificadas como M1, M2, M3, M4 e M5.

3.1 Análises Microbiológicas

3.1.1 Contagem de *Escherichia coli*

Como podemos verificar na tabela 9 os valores de *E. coli* nos maranhos apresentam um resultado satisfatório na maioria das amostras. A amostra C foi classificada como aceitável visto que a unidade M1 apresentou uma contagem de *E. coli* entre $5,0 \times 10^2$ (m) e $5,0 \times 10^3$ (M) sendo as restantes unidades da amostra de valor inferior a m, enquanto a amostra F foi classificada como insatisfatória porque três das unidades ($> a c/n$) apresentaram resultados compreendidos no intervalo mencionado. Podemos ainda observar que as outras 5 unidades de amostra analisadas do mesmo produtor F, correspondentes a maranho cozido, apresentaram resultados satisfatório, com todas as contagens inferiores a $1,0 \times 10^1$ ufc/g. A sombreado encontram-se os resultados das amostras cozidas.

Considerando a contagem de *E. coli* nas unidades de amostra cruas ($n=35$), obtivemos valores que variaram entre $<1 \times 10^1$ ufc/g (7/35; 20%) e $2,4 \times 10^3$ ufc/g.

A apreciação dos resultados da contagem de *E. coli* nas 7 amostras de maranho cruas, de acordo com o Regulamento 1441/2007, mostra que apenas uma amostra foi considerada insatisfatória (14%) e uma aceitável (14%), sendo as restantes classificadas como de qualidade satisfatória (86%). No caso em que se verificou um resultado insatisfatório, e de acordo com o referido Regulamento, devem ser tomadas medidas no

sentido de uma melhor seleção das matérias-primas assim como da melhoria da higiene na produção.

Pode-se verificar que as 5 unidades que constituem a amostra qualificada como insatisfatória apresentam um valor médio de pH de 6,08 e um valor médio de cloretos de 1,8% de NaCl, valores estes propícios à multiplicação microbiana.

Tabela 9– Resultados da contagem de *E.coli* nas amostras de maranho.

| Produtor | Contagem de <i>E. coli</i> (Ufc/g) | | | | | |
|----------|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| | Unidades da amostra | | | | | |
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | Classificação |
| A | <1x10 | <1x10 | 1x10 | 1,6x10 ² | <1x10 | S |
| B | 1,1x10 | 9,0x10 | 8,0x10 | 1,4x10 | 1,5x10 | S |
| C | 5,1x10 ² | 2,6x10 ² | 2,1x10 ² | 2,0x10 ² | 1,0x10 ² | A |
| D* | <1x10 | <1x10 | <1x10 | <1x10 | <1x10 | S |
| E | 1,3x10 ² | 9,0x10 | 8,0x10 | 4,0x10 | 3,0x10 | S |
| F | 5,2x10 ² | 4,0x10 ² | 1,0x10 ³ | 2,4x10 ³ | 3,4x10 ² | I |
| G | 1,8x10 ² | 3,0x10 | 6,0x10 | 9,0x10 | <1x10 | S |
| H | 1,8x10 ² | 1,0x10 | <1x10 | <1x10 | <1x10 | S |
| G* | <1x10 | <1x10 | <1x10 | <1x10 | <1x10 | S |
| F* | <1x10 | <1x10 | <1x10 | <1x10 | <1x10 | S |

S-Satisfatório A-Aceitável I-Insatisfatório A sombreado estão os resultados das análises efectuados às amostras comercializadas cozidas.

Considerando agora a contagem de *E. coli* nas 3 amostras de maranho cozidas, verificamos que, de acordo com o Reg.1441/2007, todas as amostras foram classificadas como de qualidade satisfatória, apresentando sempre contagens inferiores a 1x10 ufc/g.

Na tabela 10 podemos ver os resultados em log ufc/g para as amostras de maranho, cru o que nos permite estabelecer uma comparação com os resultados obtidos por Salavessa (2009). Assim, podemos observar que a média das contagens de *E.coli* nos maranhos não processados do referido trabalho era de 2,62 log ufc/g, superior ao valor encontrado neste estudo, que foi de 1,6 ufc/g. Quanto aos maranhos cozidos é mencionada uma média de 0,23 log ufc/g, enquanto no presente trabalho todas as amostras se revelaram com contagens de ufc/g inferiores a 10. De referir ainda que, para a determinação da média, mediana e desvio padrão, obtidos neste trabalho (tabela 10), foi considerado um

valor de 0 ufc de *E.coli* por g de amostra nos casos em que o resultado era inferior a 1×10 ufc/g, sendo possível desta forma a determinação dos parâmetros de estatística descritiva referidos acima.

Tabela 10 – Valores médios das contagens de *E.coli* nas amostras de maranho cru e a amplitude dos resultados por amostra (log UFC/g).

| Produtor | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão |
|----------|-------|---------|--------|--------|---------------|
| A | 0,64 | 0 | 0 | 2,20 | 0,97 |
| B | 1,44 | 1,18 | 1,04 | 1,95 | 0,44 |
| C | 2,35 | 2,32 | 2,00 | 2,71 | 0,25 |
| E | 1,81 | 1,90 | 1,48 | 2,11 | 0,26 |
| F | 2,85 | 2,72 | 2,53 | 3,38 | 0,35 |
| G | 1,49 | 1,78 | 0 | 2,26 | 0,88 |
| H | 0,65 | 0 | 0 | 2,26 | 1,00 |

Na Figura 19 apresentam-se diagramas de extremos e quartis para o log das contagens de *Escherichia coli*, por produtor. Estes diagramas constituem um sumário gráfico da distribuição da amostra, pois apresentam medidas de localização e dispersão. Podemos verificar que a amostra do produtor F é a que apresenta resultados mais elevados

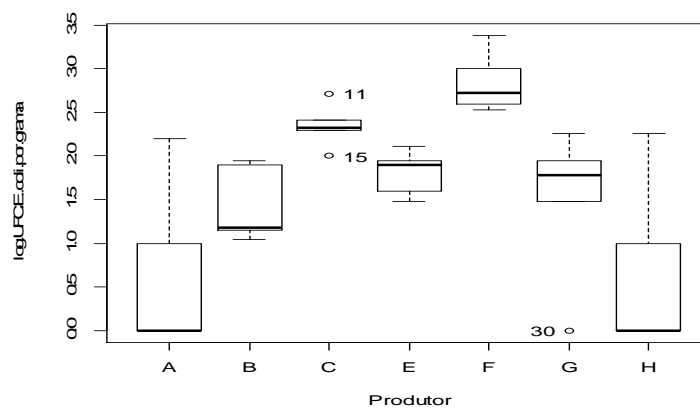


Figura 19. Diagrama de extremos e quartis da contagem de *Escherichia coli* (log ufc/g), nas amostras de maranho cru.

O teste t *de Student* mostra que existem diferenças significativas ($p < 0.05$) entre o nível de contaminação de *E. coli* nos maranhos crus e nos maranhos cozidos o que reflete o efeito positivo do processamento térmico sobre a qualidade higiénica do produto final.

3.1.2 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Na tabela 11 estão apresentados os resultados das análises de *Staphylococcus coagulase positiva* nos maranhos.

Tabela 11 – Resultados da contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* nos maranhos.

| Produtor | Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (Ufc/g) | | | | |
|----------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Unidades da amostra | | | | |
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
| A | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² |
| B | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² |
| C | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² |
| D* | <1x10 | <1x10 | <1x10 | <1x10 | <1x10 |
| E | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² |
| F | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² |
| G | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² |
| H | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² |
| G* | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² |
| F* | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² | <1x10 ² |

A sombreado estão os resultados das análise efetuados às amostras comercializadas cozidas.

Como podemos verificar, todos os resultados indicam contagens inferiores a $1,0 \times 10^2$ ufc/g ou, no caso das amostras do produtor D*, <1x10 ufc/g todas as amostras apresentam qualidade satisfatória. Os resultados obtidos de certa forma foram surpreendentes uma vez que sendo o nosso produto muito manipulado, com miga das carnes, da hortelã e mistura do preparado, esperava-se que a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* fosse elevada, pois a presença destas bactérias está frequentemente relacionada com a manipulação dos alimentos por portadores deste microrganismo (Udo, 2009).

Salavessa (2009), obteve para *Staphylococcus aureus* resultados bastante diferentes. Para maranhos crus encontrou 40,63% das amostras positivas e nos maranhos após cozedura refere uma percentagem de positividade de 15,63%, resultados indicativos de

que o processamento térmico influenciou a presença deste microrganismo. Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de este investigador ter recorrido a um método de pesquisa que implica um enriquecimento antes do isolamento no meio seletivo, permitindo detetar níveis mais baixos de microrganismos.

3.1.3 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Por observação da tabela 12 podemos verificar que de igual modo não foi encontrada *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras de maranhos (25g) analisadas, tendo todas as amostras sido classificadas como satisfatórias.

Tabela 12- Resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de maranho.

| Produtor | Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em 25g | | | | | |
|----------|---|-----|-----|-----|-----|---------------|
| | Unidades da amostra | | | | | |
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | Classificação |
| A | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | - |
| B | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | - |
| C | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | - |
| D* | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | S |
| E | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | - |
| F | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | - |
| G | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | - |
| H | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | - |
| G* | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | S |
| F* | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | S |

A sombreado estão os resultados das análises efetuados às amostras comercializadas cozidas. S - Satisfatório

Comparando os nossos resultados com os obtidos por Salavessa (2009), verificamos que a ocorrência de *Salmonella* spp também foi muito baixa com apenas 3,13% (que corresponde a um caso positivo em 32 amostras), para amostras de maranho cru e 0% de casos positivos para amostras de maranho já cozido.

Estes resultados não eram os esperados, uma vez que tendo as estirpes de *Salmonella* a capacidade de sobreviver no solo, na água, e em várias superfícies, podendo ainda multiplicar-se a temperaturas de refrigeração aumentaria desta forma a probabilidade desta bactéria estar presente neste tipo de produto (D`Aoust, 2000). Destes resultados

podemos inferir que foram respeitadas as Boas Práticas de Fabrico (BPF) e as matérias-primas não estavam contaminadas com este microrganismo.

3.1.4 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

No que concerne ao microrganismo *L. monocytogenes*, a sua presença foi detectada em várias amostras de maranho, como podemos verificar na tabela 13.

Podemos assim dizer que *L. monocytogenes* foi o microrganismo que apresentou resultados insatisfatórios do ponto de vista da segurança alimentar e da saúde pública.

Das 50 unidades de amostra analisadas, 17 (34%) apresentaram *Listeria* spp. mas não *Listeria monocytogenes* e 14 (28%) apresentaram *L. monocytogenes*. Apenas 19 unidades de amostra (38%) apresentaram ausência de qualquer espécie do género *Listeria*. Para efeitos de qualificação segundo o Regulamento 1441/2007, que preconiza a pesquisa deste microrganismo em produtos prontos a comer, apenas as amostras cozinhadas poderão ser avaliadas.

Assim, considerando as três amostras de maranho cozido analisadas, cada uma constituída por cinco unidades, verificou-se que duas apresentam qualidade satisfatória e a terceira apresenta uma qualidade insatisfatória, com duas das cinco unidades com resultados da pesquisa positiva para *L. monocytogenes*, não satisfazendo o exigido na legislação.

No que se refere às amostras de maranho cru analisadas, cada uma constituída por cinco unidades verifica-se que em todas elas se encontra *Listeria* spp. e em cinco foi detetada *L. monocytogenes*. Sendo assim, podemos dizer que 71% das amostras de maranho cru analisadas apresentaram uma a quatro unidades de amostra com pesquisa positiva para esta bactéria patogénica. De referir que esta percentagem é muito elevada. No entanto, e uma vez que estas amostras não podem ser avaliadas segundo o Regulamento 1441/2007, se considerarmos as amostras individualmente verificamos que a percentagem de positividade é bastante mais baixa visto que encontramos 12 amostras positivas em 35 analisadas, o que corresponde a uma percentagem de 34,3%.

Ressalta-se ainda que, dado tratar-se de um produto que ainda irá ser sujeito a um tratamento térmico é expectável que esta bactéria seja destruída, uma vez que uma

temperatura da ordem de 70 °C durante 2 a 3 minutos permite a sua inativação (Mena *et al.*, 2004; Murphy, Hanson, Duncan, Feze & Lyon, 2005).

Tabela 13 – Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes* nas amostras de maranho.

| Produtor | Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> em 25 g | | | | | |
|----------|---|---|---|---|---|---------------|
| | Unidades da amostra | | | | | |
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | Classificação |
| A | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | - |
| B | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Positivo | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Positivo | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | - |
| C | Positivo | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Positivo | - |
| D* | Neg | Positivo | Neg | Positivo | Neg | I |
| E | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | - |
| F | Positivo | Positivo | Positivo | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | - |
| G | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Neg | - |
| H | Neg (positivo para <i>Listeria</i> spp. | Neg | Neg | Positivo | Neg | - |
| G* | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | S |
| F* | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | S |

S – Satisfatório I – Insatisfatório

O maior problema relacionado com esta contaminação prende-se com o facto de que numa instalação fabril onde se processam produtos derivados de carne crua e processados prontos a comer, a bactéria *L. monocytogenes* pode instalar-se nas superfícies de trabalho e equipamentos a partir dos quais pode contaminar os produtos processados (Carpentier & Cerf, 2011). Depois de instalada é muito difícil de eliminar visto que forma biofilmes muitas vezes em partes inacessíveis dos equipamentos. Deste modo, a presença desta bactéria nos produtos processados pode advir de uma recontaminação pós-processamento por contaminações cruzadas se não existir completa separação entre áreas de crus e processados e/ou os trabalhadores poderem circular entre essas mesmas áreas. Pode ainda ser devida a um tratamento térmico inadequado (Osaili, Alaboudi & Nesiari, 2011).

De acordo com Salavessa (2009), verificamos que foi encontrada a presença de *L. monocytogenes* numa percentagem de 40,37%, mais elevada do que a revelada neste trabalho (34,3%) em amostras de maranho cruas. Já no que diz respeito às amostras de maranho cozido este autor refere a completa ausência desta bactéria para as amostras analisadas.

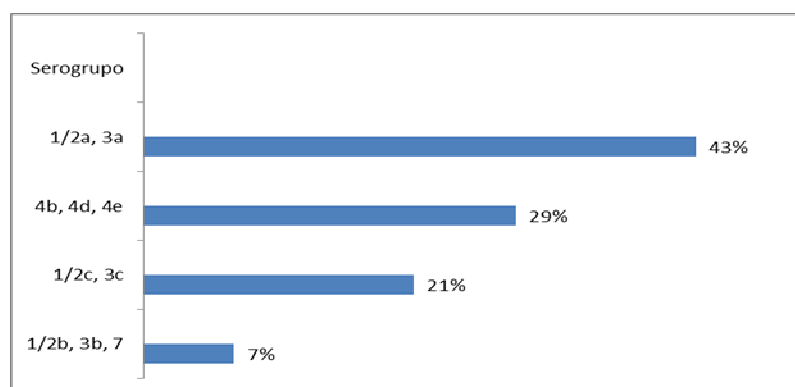
A presença de *L. innocua* ou outras espécies de *Listeria* em alimentos, é considerado um indicador da presença de *L. monocytogenes* uma vez que partilham os mesmos nichos ecológicos (Encimas *et al.*, 1999; Aguado, Vitas & Garcia-Jalón, 2004). Assim, a presença de *Listeria* spp. nas amostras de maranho deve ter-se em conta uma vez que *L. monocytogenes* representa nos dias de hoje um motivo de preocupação na indústria alimentar, pois trata-se de uma bactéria ubiqüitária com grande capacidade de sobrevivência e multiplicação a temperaturas de refrigeração e ambientes fabris (Swaminathan *et al.*, 2007; Arevalos-Sanchez, Regalado, Martin, Domínguez-Domínguez & García-Almendárez, 2012).

3.1.5 Serotipagem dos isolados de *Listeria monocytogenes* por *Polymerase Chain Reaction Multiplex*

Como pode ser verificado na tabela 14, e na figura 20, dos 14 isolados serotipados, seis (43%) pertencem ao serogrupo 1/2a, 3a, quatro (29%) ao serogrupo 4b, 4d, 4e, três (21%) ao serogrupo 1/2c, 3c e um (7%) ao serogrupo 1/2b, 3b, 7.

Tabela 14 – Amostras de *L. monocytogenes* isoladas de maranhos e serotipadas por PCR. *multiplex*

| Produtor | Unidade de amostra | Serogrupo de <i>Listeria monocytogenes</i> |
|----------|--------------------|--|
| B | M2 | 1/2b, 3b, 7 |
| | M4 | 1/2c, 3c |
| C | M1 | 1/2c, 3c |
| | M5 | 1/2c, 3c |
| D* | M2 | 4b, 4d, 4e |
| | M4 | 4b,4d, 4e |
| F | M1 | 4b, 4d, 4e |
| | M2 | 1/2a, 3a |
| | M3 | 4b, 4d, 4e |
| G | M1 | 1/2a, 3a |
| | M2 | 1/2a, 3a |
| | M3 | 1/2a, 3a |
| | M4 | 1/2a, 3a |
| H | M4 | 1/2a, 3a |

Figura 20 – Percentagens dos serogrupos dos isolados de *L. monocytogenes* por PCR *Multiplex*.

Ressalta-se que segundo MacLauchlin, *et al.* (2004), os serovares 1/2a, 1/2b, 1/2c e sobretudo o 4b são os que aparecem com mais frequência associados a listeriose e todos estes serovares estavam presentes nas amostras de maranhos. Vários estudos publicados referem que tem sido encontrada uma percentagem de incidência de *L. monocytogenes* em carne crua e produtos à base de carne, entre <1 e 92% (Encimas, Sanz, López & Otero, 1999). Um trabalho publicado efectuado em 167 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de produtos à base de carne prontos a comer, frango cru e produtos vegetais frescos evidencia que a maioria dos isolados pertencia ao serogrupo 1/2b, 3b, 7

(40,7%), ao serogrupo 4b, 4d, 4e (31,7%) e ao serogrupo 1/2a, 3a (25,7%). Os serogrupos 1/2c, 3c (1,2%) e 4a, 4c (0,6%), encontravam-se em menor quantidade (Zhang *et al.*, 2007). Segundo os mesmos autores, nos produtos à base de carne prontos a comer o serogrupo mais frequente é o 1/2b, 3b, 7, enquanto no nosso trabalho este serogrupo apenas aparece associado a uma amostra. Um outro estudo efectuado em estirpes provenientes do ambiente de 13 unidades de processamento de carne e seus produtos derivados mostra que a maioria, 49%, dos isolados são serovar 1/2a, 20,4% serovar 1/2c, 12% serovar 1/2b, 8% serovar 4b e apenas 0,1% serovar 4e (Thévenot *et al.*, 2006).

De referir ainda que foi possível verificar que as diferentes unidades de amostra dos produtores B e F estavam contaminadas com *L. monocytogenes* pertencente a mais do que um tipo de serovar, o que poderá indicar que a fonte de contaminação por esta bactéria é múltipla nos produtores já referenciados.

3.2 Análises físico-químicas

Na tabela do Anexo IV, estão representados todos os valores das análises físico-químicas efectuadas aos maranhos. Nessa tabela encontramos tanto as amostras no estado cru (amostras A, B, C, E, F, G e H) como as já cozidas (amostras D*, G* e F*). Cada amostra é constituída por cinco unidades de amostra, designadas pelas letras M1, M2, M3, M4 e M5.

3.2.1 Potencial hidrogeniónico

Os valores médios das determinações de pH observadas na análise aos maranhos estão representados na tabela 15. Da análise efectuada verificamos que as amostras B, D*, E, F, G, H, G*, F* são classificadas como alteráveis pois o pH é $>5,2$; a amostra A é classificada como estável ($\text{pH} \leq 4,5$), assim como a amostra C ($a_w \leq 0,95$ e $\text{pH} \leq 5,2$).

Podemos verificar que as amostras de maranho do produtor A apresentam valores muito baixos em relação aos restantes, o que nos leva a supor que houve adição de substâncias conservantes, do tipo ácidos orgânicos. O valor médio de pH encontrado para as 5 amostras deste produtor foi de 2,6 valor este muito inferior aos valores médios das amostras dos restantes produtores, os quais variaram entre 5,01 e 6,19. De acordo com Figueiredo (2008) e Salavessa (2009), os valores médios de pH para as amostras de maranho analisadas por estes autores foram, respectivamente, 5,57 e 6,01.

Tabela 15 – Resultados da determinação do pH das amostras de maranho.

| Análise | | Empresa/Produtor | | | | | | | | | |
|---------|----------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | A | B | C | D* | E | F | G | H | G* | F* |
| PH | M1 | 3,18 | 5,38 | 5,08 | 6,15 | 6,10 | 6,18 | 5,99 | 5,69 | 6,12 | 5,73 |
| | M2 | 2,94 | 5,33 | 4,99 | 6,20 | 5,83 | 6,29 | 5,26 | 5,78 | 5,97 | 4,79 |
| | M3 | 2,35 | 5,32 | 5,01 | 6,19 | 5,81 | 6,03 | 5,32 | 5,62 | 5,85 | 5,92 |
| | M4 | 2,57 | 5,18 | 5,00 | 6,23 | 5,77 | 5,97 | 5,30 | 5,60 | 5,66 | 5,97 |
| | M5 | 1,95 | 5,27 | 4,97 | 6,17 | 5,75 | 5,92 | 5,23 | 5,40 | 5,87 | 5,47 |
| | Média (γ) | 2,60 | 5,30 | 5,01 | 6,19 | 5,85 | 6,08 | 5,42 | 5,62 | 5,89 | 5,58 |
| | Mínimo | 1,95 | 5,18 | 4,97 | 6,15 | 5,75 | 5,92 | 5,23 | 5,4 | 5,66 | 4,79 |
| | Máximo | 3,18 | 5,38 | 5,08 | 6,23 | 6,1 | 6,29 | 5,99 | 5,78 | 6,12 | 5,97 |
| | Mediana | 2,57 | 5,32 | 5,00 | 6,19 | 5,81 | 6,03 | 5,30 | 5,62 | 5,87 | 5,73 |
| | Desvio padrão (δ) | 0,48 | 0,08 | 0,04 | 0,03 | 0,14 | 0,15 | 0,32 | 0,14 | 0,17 | 0,48 |

*amostras comercializadas cozidas

No nosso caso, e exceptuando as 5 amostras do produtor A, obtivemos um valor global médio de pH para as amostras analisadas de 5,99, valor este próximo do referido pelos autores citados atrás. Foi feita uma tentativa para a obtenção do diagrama de fabrico do maranho produzido pela empresa A mas tal não nos foi facultado. No entanto, por telefone, foi possível saber que esta empresa produz diariamente para grandes superfícies e que o prazo de validade destes maranhos é de 30 dias. Este é um prazo de validade superior ao das amostras de maranho cru das restantes empresas, o qual é de 10 dias.

Como já foi referido, não nos foi facultado o acesso nem ao diagrama de fabrico, ficha técnica do produto, nem às instalações, pelo que não se sabe qual o tipo de conservante usado. Podemos, no entanto, referir que os principais aditivos usados neste tipo de produtos são os antioxidantes, conservantes e intensificadores de sabor.

Na tabela seguinte (16) podemos verificar que as amostras de maranho previamente processados termicamente, apresentam valores mais baixos de desvio padrão, o que nos leva a concluir que os dados estão mais próximos da média e que existe uma maior precisão de dados.

Tabela 16- Resultados das determinações médias do pH das amostras de maranho.

| pH | Média (\bar{x}) | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão (δ) |
|--------------|------------------------|---------|--------|--------|-------------------------------|
| Cru | 5,13 | 5,42 | 2,60 | 6,08 | 1,17 |
| Cozido | 5,89 | 5,89 | 5,58 | 6,19 | 0,31 |
| Cru e cozido | 5,35 | 5,68 | 2,60 | 6,19 | 1,03 |

Na Figura 21 apresentam-se diagramas de extremos e quartis para as determinações de pH, por produtor e por amostra crua (cr), e cozida (co). Estes diagramas constituem um sumário gráfico da distribuição da amostra, pois apresentam medidas de localização e dispersão. Podemos verificar que a amostra F é a que apresenta resultados mais elevados de pH enquanto que a amostra A apresenta os valores mais baixos. No diagrama por amostra podemos ainda verificar que os valores da amostra A são considerados como *outliers*, uma vez que se afastam do padrão geral dos dados para as restantes amostras no estado cru.

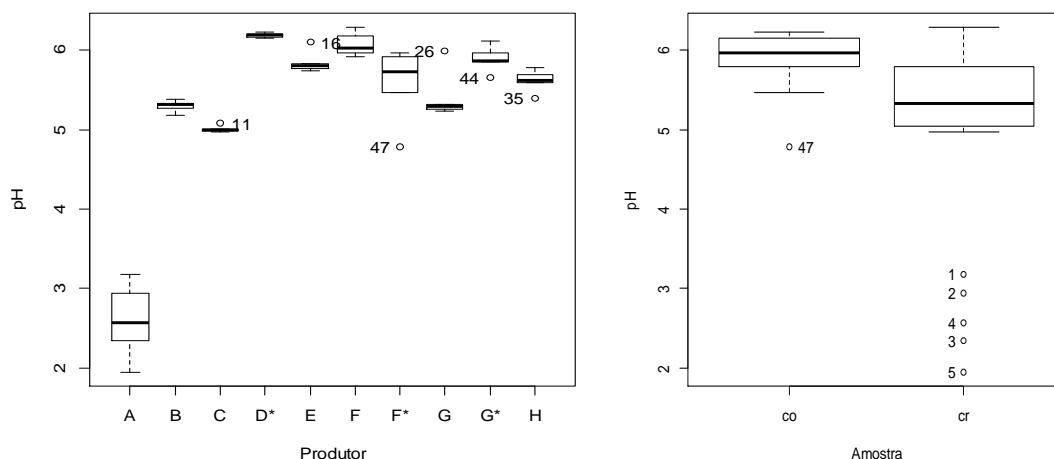


Figura 21 - Diagramas de extremos e quartis para os valores de pH, por produtor e por amostra, cozido (co), e cru (cr).

3.2.2 Atividade da água

Os valores médios das determinações da a_w obtidas nos maranhos estão representados na tabela 17, apresentando diferenças mínimas entre os valores obtidos.

Tabela 17- Resultados da determinação de a_w das amostras de maranho.

| Análise | | Empresa/Produtor | | | | | | | | | |
|---------|----------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | A | B | C | D* | E | F | G | H | G* | F* |
| a_w | M1 | 0,929 | 0,928 | 0,925 | 0,937 | 0,922 | 0,923 | 0,928 | 0,924 | 0,935 | 0,929 |
| | M2 | 0,932 | 0,929 | 0,930 | 0,936 | 0,915 | 0,926 | 0,926 | 0,932 | 0,917 | 0,929 |
| | M3 | 0,930 | 0,926 | 0,933 | 0,922 | 0,919 | 0,924 | 0,927 | 0,923 | 0,925 | 0,929 |
| | M4 | 0,928 | 0,929 | 0,932 | 0,928 | 0,922 | 0,925 | 0,928 | 0,933 | 0,928 | 0,930 |
| | M5 | 0,933 | 0,928 | 0,926 | 0,925 | 0,922 | 0,926 | 0,925 | 0,924 | 0,929 | 0,921 |
| | Média (χ) | 0,930 | 0,928 | 0,929 | 0,930 | 0,920 | 0,925 | 0,927 | 0,927 | 0,927 | 0,928 |
| | Mínimo | 0,928 | 0,926 | 0,925 | 0,922 | 0,915 | 0,923 | 0,925 | 0,923 | 0,917 | 0,921 |
| | Máximo | 0,933 | 0,929 | 0,933 | 0,937 | 0,922 | 0,926 | 0,928 | 0,933 | 0,935 | 0,930 |
| | Mediana | 0,930 | 0,928 | 0,930 | 0,928 | 0,922 | 0,925 | 0,927 | 0,924 | 0,928 | 0,929 |
| | Desvio padrão (δ) | 0,002 | 0,001 | 0,004 | 0,007 | 0,003 | 0,001 | 0,001 | 0,005 | 0,007 | 0,004 |

*Amostras comercializadas cozidas

O valor médio do a_w nos maranhos variou entre 0,920 e os 0,930. Com valores entre 0,920 e 0,930, os maranhos estão incluídos na categoria de alimentos de humidade elevada (1,0 a 0,9 a_w), existindo assim condições favoráveis para a multiplicação e atividade dos microrganismos que podem causar alterações no produto e, no caso dos microrganismos patogénicos, colocar em risco a saúde dos consumidores.

Comparando estes valores com os obtidos por Figueiredo (2008) e Salavessa (2009), verificamos que o valor médio global por nós encontrado (0,93) se encontra dentro dos valores médios referidos por ambos (0,91 e 0,94, respectivamente).

Com o objetivo de verificar de que forma podemos classificar as amostras analisadas neste trabalho, optou-se por registar os valores de a_w e de pH de todas as unidades de amostra num gráfico (Figura 22). Através da observação deste gráfico, podemos constatar que a maior parte das amostras analisadas (78%) são consideradas alteráveis, com base nos valores de a_w e de pH constantes na tabela 3. Considerando as amostras

classificadas como estáveis ($n = 11$), podemos dizer que estas pertencem aos produtores A ($n = 5$), B ($n = 1$) e C ($n = 5$).

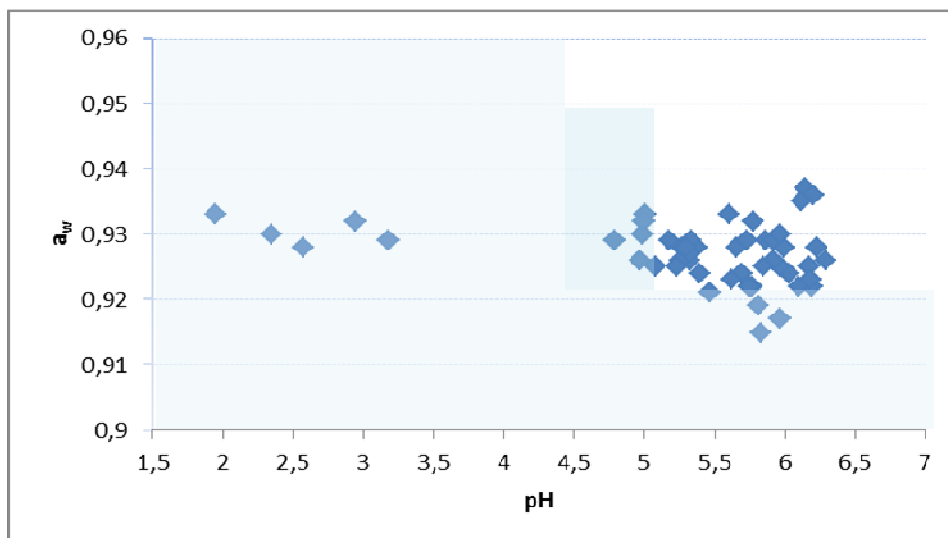


Figura 22 – Comparação dos valores de a_w com os valores de pH.

Ao analisar a tabela 18 podemos verificar que as determinações médias de a_w apresentam uma grande precisão de dados e que estes estão muito próximos das médias em todas as amostras, como podemos ver pelos baixos valores de desvio padrão.

Tabela 18 - Resultados das determinações médias de a_w das amostras de maranho.

| A_w | Média (\bar{x}) | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão (δ) |
|--------------------|------------------------|---------|--------|--------|----------------------------------|
| Cru | 0,927 | 0,927 | 0,920 | 0,930 | 0,003 |
| Cozido | 0,928 | 0,928 | 0,927 | 0,930 | 0,001 |
| Cru e cozido | 0,927 | 0,927 | 0,920 | 0,930 | 0,003 |

Na Figura 23 apresentam-se diagramas de extremos e quartis para as determinações de a_w , por produtor e por amostra crua (cr) ou cozida (co). Estes diagramas constituem um sumário gráfico da distribuição da amostra, pois apresentam medidas de localização e dispersão. Podemos verificar que a amostra D* é a que apresenta resultados mais elevados de a_w enquanto que a amostra E apresenta os valores mais baixos. No diagrama por amostra podemos verificar que as amostras cozidas apresentam dois *outliers* enquanto que as amostras cruas apenas um.

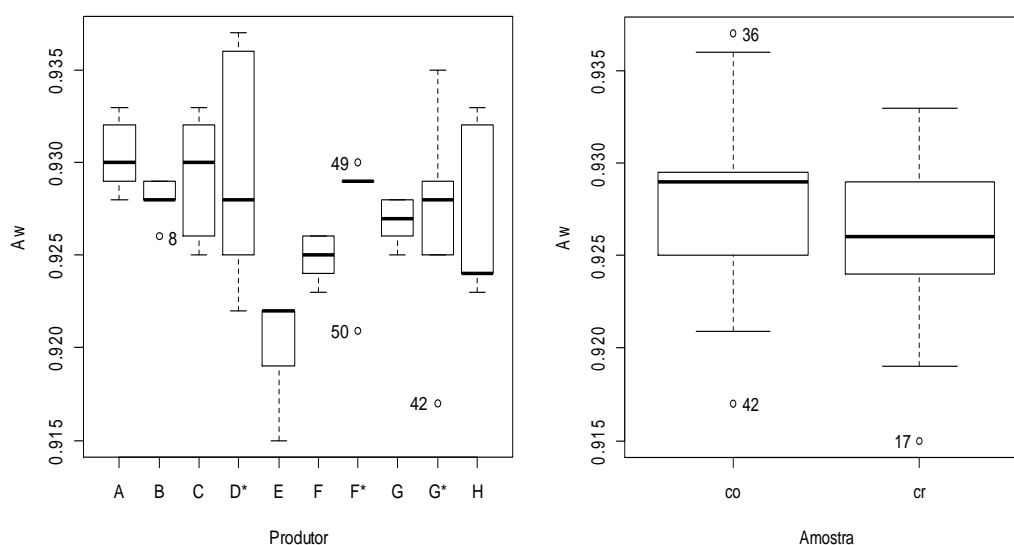


Figura 23 - Diagramas de extremos e quartis para os valores de aw, por produtor e por amostra cozida (co) e crua (cr).

3.2.3 Gordura total

Os valores de gordura variaram entre 9,72% e os 19,95% como podemos verificar na tabela 19.

Tabela 19 – Resultados da determinação da gordura total das amostras de maranho.

| Análise | | Empresa/Produtor | | | | | | | | | |
|----------------------------|--------------------|------------------|-------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|------|
| | | A | B | C | D* | E | F | G | H | G* | F* |
| Gordura Total (%) | M1 | 4,73 | 11,07 | 3,37 | 5,18 | 16,87 | 5,03 | 16,38 | 9,40 | 16,00 | 8,97 |
| | M2 | 7,26 | 10,46 | 5,02 | 4,74 | 23,68 | 4,82 | 17,97 | 11,38 | 15,18 | 8,70 |
| | M3 | 6,33 | 10,92 | 5,01 | 3,70 | 18,44 | 3,84 | 13,44 | 12,18 | 13,82 | 9,47 |
| | M4 | 8,37 | 15,81 | 4,93 | 6,26 | 19,21 | 4,28 | 15,40 | 12,39 | 18,39 | 9,51 |
| | M5 | 5,60 | 7,99 | 7,41 | 5,25 | 21,57 | 2,38 | 12,18 | 9,72 | 13,79 | 7,32 |
| | Média (γ) | 6,46 | 11,25 | 5,15 | 5,03 | 19,95 | 4,07 | 15,07 | 11,01 | 15,44 | 8,79 |
| | Mínimo | 4,73 | 7,99 | 3,37 | 3,7 | 16,87 | 2,38 | 12,18 | 9,40 | 13,79 | 7,32 |
| | Máximo | 8,37 | 15,81 | 7,41 | 6,26 | 23,68 | 5,03 | 17,97 | 12,39 | 18,39 | 9,51 |
| | Mediana | 6,33 | 10,92 | 5,01 | 5,18 | 19,21 | 4,28 | 15,40 | 11,38 | 15,18 | 8,97 |
| Desvio padrão (δ) | 1,42 | 2,84 | 1,45 | 0,93 | 2,69 | 1,05 | 2,30 | 1,38 | 1,90 | 0,89 | |

*amostras comercializadas cozidas

As variações encontradas para os valores da gordura total estão diretamente relacionadas com os diferentes tipos de ingredientes utilizados na produção de maranhos.

Nos enchidos a percentagem de gordura pode ser baixa (10%), alta (40%) ou difícil de avaliar, no caso em que a gordura e a carne não tenham sido separadas para o preparado de carne. O rácio carne/gordura é de 2:1 na maioria dos preparados de carne dos produtos de salsicharia industriais, enquanto que nos enchidos tradicionais essa proporção é variável (Mendonça, 2012).

Comparando os valores obtidos neste trabalho com os referidos por Figueiredo (2008) e Salavessa (2009), verificamos que o nosso valor médio global (10,2%) se encontra acima dos valores médios por eles encontrados (7,35% e 8,57%, respectivamente) (ver Anexo 4).

De salientar a grande heterogeneidade das amostras para este parâmetro, principalmente considerando as amostras de diferentes produtores.

Através da análise da tabela 20 verificamos que estamos perante amostras muito heterogeneas a nível da % de gordura total visto termos altos valores de desvio padrão.

Tabela 20 – Resultados médios das determinações da (%) de gordura nas amostras de maranho.

| Gordura total (%) | Média (\bar{x}) | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão (σ) |
|-------------------|---------------------|---------|--------|--------|----------------------------|
| Cru | 10,42 | 11,01 | 4,07 | 19,95 | 5,73 |
| Cozido | 9,75 | 8,79 | 5,03 | 15,44 | 5,27 |
| Cru e cozido | 10,22 | 9,90 | 4,07 | 19,95 | 5,31 |

Na Figura 24 apresentam-se diagramas de extremos e quartis para as determinações de % de gordura por produtor e por amostra crua (cr) e cozida (co). Estes diagramas constituem um sumário gráfico da distribuição da amostra, pois apresentam medidas de localização e dispersão. Podemos verificar que a amostra E é a que apresenta resultados mais elevados enquanto que a amostra F apresenta os valores mais baixos. Podemos verificar que no diagrama por produtor temos produtores com mais do que um *outlier* como o B, C e D*.

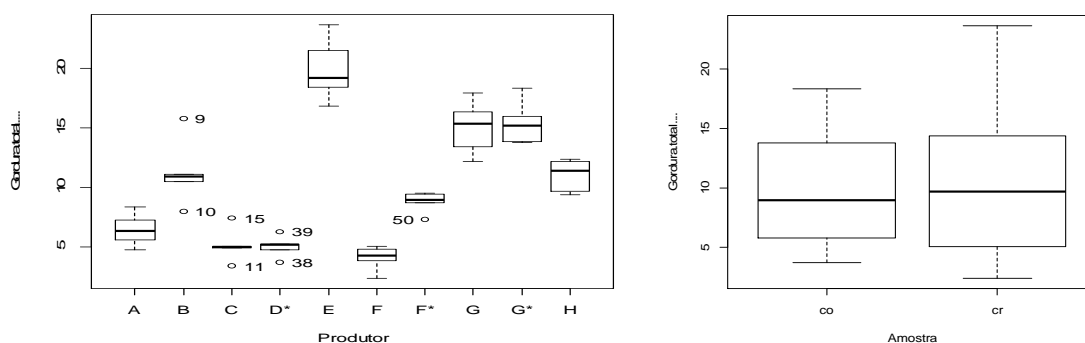


Figura 24 - Diagramas de extremos e quartis para os valores de % de gordura total, por produtor e por amostra, cozida (co) e crua (cr).

3.2.4 Proteína total

Na análise da proteína os valores variaram entre os 10,57% e 15,89% (tabela 21).

Tabela 21 – Resultados da determinação da proteína total das amostras de maranhos.

| Análise | | Empresa/Produtor | | | | | | | | | |
|----------|----------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | A | B | C | D* | E | F | G | H | G* | F* |
| Proteína | M1 | 14,59 | 12,75 | 14,73 | 16,56 | 10,85 | 12,25 | 11,53 | 13,35 | 12,85 | 15,82 |
| | M2 | 15,13 | 12,98 | 14,68 | 16,63 | 9,45 | 12,96 | 12,44 | 13,50 | 12,96 | 14,43 |
| | M3 | 15,13 | 12,10 | 13,73 | 16,74 | 11,43 | 12,70 | 11,60 | 12,92 | 13,11 | 15,38 |
| | M4 | 14,80 | 11,09 | 13,73 | 14,56 | 10,84 | 12,07 | 11,07 | 12,77 | 13,26 | 15,60 |
| | M5 | 14,26 | 12,13 | 13,45 | 14,98 | 10,26 | 13,02 | 12,47 | 12,92 | 13,29 | 13,51 |
| Total | Média (\bar{x}) | 14,78 | 12,21 | 14,06 | 15,89 | 10,57 | 12,60 | 11,82 | 13,09 | 13,09 | 14,95 |
| (%) | Mínimo | 14,26 | 11,09 | 13,45 | 14,56 | 9,45 | 12,07 | 11,07 | 12,77 | 12,85 | 13,51 |
| | Máximo | 15,13 | 12,98 | 14,73 | 16,74 | 11,43 | 13,02 | 12,47 | 13,5 | 13,29 | 15,82 |
| | Mediana | 14,8 | 12,13 | 13,73 | 16,56 | 10,84 | 12,70 | 11,60 | 12,92 | 13,11 | 15,38 |
| | Desvio padrão (δ) | 0,37 | 0,73 | 0,60 | 1,04 | 0,75 | 0,42 | 0,61 | 0,31 | 0,19 | 0,96 |

*amostras comercializadas cozidas

Comparando os valores médios encontrados com os de Figueiredo (2008) e Salavessa (2009), verificamos que o valor médio global por nós encontrado (13,3%) se encontra próximo dos valores médios obtidos por aqueles autores (14,46%, e 13,7 % respectivamente).

As amostras do produtor E e G destacam-se pelo facto de terem valores de proteína total inferiores aos da gordura total.

Com a análise da tabela 22 verificamos que as médias das amostras variam entre 12,73 para amostras de maranho cru, 14,64% para amostras de maranho cozido e 13,31 para as amostras de maranho cru e cozidas. As amostras de maranho cozidas e cruas são aquelas que apresentam um valor mais alto de desvio padrão.

Tabela 22 – Resultados médios das determinações da (%) de proteína nas amostras de maranho.

| Proteína total (%) | Média (α) | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão (δ) |
|--------------------|-----------|---------|--------|--------|-------------------|
| Cru | 12,73 | 12,60 | 10,57 | 14,78 | 1,41 |
| Cozido | 14,64 | 14,95 | 13,09 | 15,89 | 1,42 |
| Cru e cozido | 13,31 | 13,09 | 10,57 | 15,89 | 1,62 |

Na Figura 25 apresentam-se diagramas de extremos e quartis para as determinações de % de proteína total por produtor e por amostra crua (cr) e cozida (co). Estes diagramas constituem um sumário gráfico da distribuição da amostra, pois apresentam medidas de localização e dispersão. Podemos verificar que a amostra D* é a que apresenta resultados mais elevados enquanto que a amostra E apresenta os valores mais baixos.

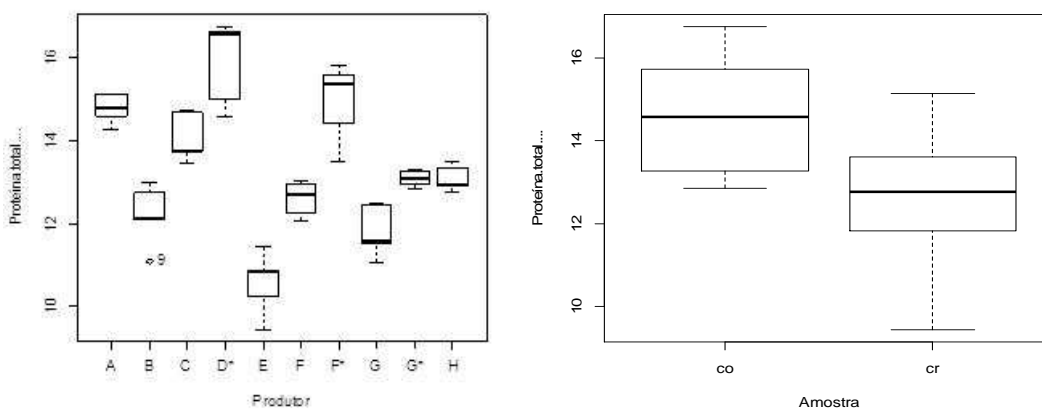


Figura 25 - Diagramas de extremos e quartis para os valores de proteína total, por produtor e por amostra cozida (co) e crua (cr).

3.2.5 Teor de cloretos

Os valores médios de cloretos apresentaram valores de 0,97% de NaCl e 2,69% de NaCl (tabela 23).

Tabela 23- Resultados da determinação do teor de cloretos das amostras de maranho.

| Análise | | Empresa/Produtor | | | | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | A | B | C | D* | E | F | G | H | G* | F* |
| Cloretos (%) NaCl | M1 | 1,39 | 2,43 | 0,96 | 1,60 | 1,98 | 1,67 | 1,15 | 1,70 | 1,06 | 1,61 |
| | M2 | 1,78 | 2,59 | 0,91 | 1,71 | 2,15 | 1,88 | 1,38 | 1,89 | 1,42 | 1,63 |
| | M3 | 1,63 | 3,27 | 0,94 | 1,72 | 2,06 | 1,93 | 1,32 | 1,87 | 1,32 | 1,59 |
| | M4 | 1,42 | 2,31 | 0,85 | 1,55 | 1,98 | 1,70 | 1,26 | 1,74 | 1,11 | 1,88 |
| | M5 | 1,65 | 2,87 | 1,20 | 1,65 | 1,98 | 2,03 | 1,24 | 1,79 | 1,23 | 1,60 |
| | Média (γ) | 1,57 | 2,69 | 0,97 | 1,65 | 2,03 | 1,84 | 1,27 | 1,80 | 1,23 | 1,66 |
| | Mínimo | 1,39 | 2,31 | 0,85 | 1,55 | 1,98 | 1,67 | 1,15 | 1,70 | 1,06 | 1,59 |
| | Máximo | 1,78 | 3,27 | 1,20 | 1,72 | 2,15 | 2,03 | 1,38 | 1,89 | 1,42 | 1,88 |
| | Mediana | 1,63 | 2,59 | 0,94 | 1,65 | 1,98 | 1,88 | 1,26 | 1,79 | 1,23 | 1,61 |
| | Desvio padrão (δ) | 0,17 | 0,38 | 0,13 | 0,07 | 0,08 | 0,15 | 0,09 | 0,08 | 0,15 | 0,12 |

*amostras comercializadas cozidas

Comparando estes valores com os obtidos por Figueiredo (2008) e Salavessa (2009) verificamos que o valor médio global por nós encontrado (1,66% de NaCl) se encontra um pouco acima dos valores por eles encontrados (1,55% de NaCl e 1,04% de NaCl respectivamente).

As amostras do produtor C são as que apresentam valores mais baixos de NaCl (média de 0,97% de NaCl para as cinco amostras), enquanto que as do produtor B, com um valor médio de 2,69% de NaCl são as que apresentam os valores mais elevados.

Relativamente à média das amostras de maranho analisadas (Tabela 24) verificamos que quanto ao desvio padrão são as amostras de maranho cozido que se aproximam mais dos valores da média, uma vez que apresentam um valor mais baixo (0,25).

Tabela 24 - Resultados das determinações médias do teor de cloretos das médias das amostras de maranho, cruas, cozidas e cruas e cozidas.

| Teor de cloretos (% NaCl) | Média (\bar{x}) | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão (δ) |
|---------------------------|---------------------|---------|--------|--------|----------------------------|
| Cru | 1,74 | 1,80 | 0,97 | 2,54 | 0,51 |
| Cozido | 1,51 | 1,65 | 1,23 | 1,66 | 0,25 |
| Cru e cozido | 1,67 | 1,66 | 0,97 | 2,54 | 0,45 |

Na Figura 26 apresentam-se diagramas de extremos e quartis para as determinações de % de NaCl por produtor e por amostras cruas (cr) e cozidas (co). Estes diagramas constituem um sumário gráfico da distribuição da amostra, pois apresentam medidas de localização e dispersão. Podemos verificar que a amostra B é a que apresenta resultados mais elevados enquanto que a amostra C apresenta os valores mais baixos.

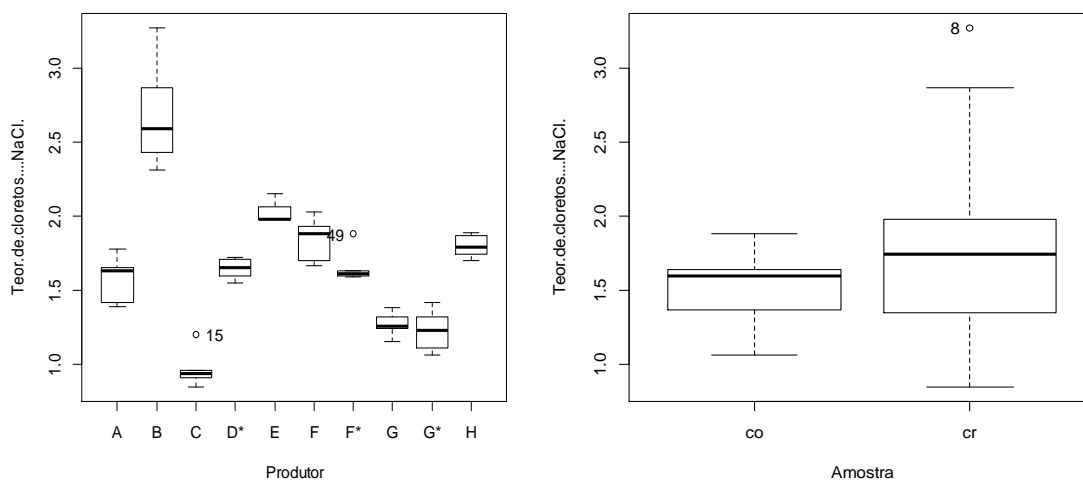


Figura 26 - Diagramas de extremos e quartis dos valores de % de teor de NaCl, por produtor e por amostras cozidas (co) e cruas (cr).

4. Conclusões

Que seja do nosso conhecimento existiam apenas dois estudos sobre maranhos, e, como consequência, acreditamos que este trabalho vem contribuir para o conhecimento da qualidade deste produto tradicional. É um produto pouco conhecido mas muito apreciado pelas gentes das regiões onde é produzido assim como de quem o consome pela primeira vez.

Relativamente à qualidade higiénica, considerando o indicador de contaminação *E. coli*, verificamos que as contagens se situaram entre $<1 \times 10^1$ ufc/g e $2,4 \times 10^3$ ufc/g, e, de acordo com a legislação europeia, 90% das amostras revelaram uma qualidade satisfatória/aceitável e apenas uma amostra revelou uma qualidade insatisfatória. No que respeita à contagem de *S. coagulase* positiva verificamos que nenhuma das amostras se revelou positiva pelo método utilizado. Como o limite de deteção do método é de $1,0 \times 10^2$, é possível que pudesse existir um nível de contaminação inferior que não foi possível detetar. Refere-se que é necessário um nível deste microrganismo $> 10^4$ ufc/g para que possam ocorrer situações de intoxicação alimentar e, por conseguinte um nível inferior ao limite de deteção do método não representa risco para o consumidor. Além disso esta bactéria não se multiplica a temperaturas de refrigeração durante o tempo de prateleira do produto. Nenhuma das amostras se revelou positiva para *Salmonella* spp.

No entanto, do ponto de vista da segurança alimentar é um produto que apresenta algumas preocupações a nível da presença de *L. monocytogenes*, pois foi o microrganismo patogénico encontrado em algumas das 50 amostras analisadas. Este microrganismo patogénico tem originado muitos casos e surtos de origem alimentar, especialmente nos grupos de risco. A nível da UE não se registou aumento do número de casos de 2009 para 2011 mas em 2009 registou-se um aumento comparativamente aos 5 anos anteriores, sendo o grupo dos idosos o mais afetado. A presença de *L. monocytogenes* no produto cozido revela que ocorreu contaminação do produto após o processamento térmico por incorreta manipulação. Dado que este microrganismo tem a capacidade de se multiplicar durante o período de vida útil do produto este pode representar um risco severo para a Saúde Pública.

5. Bibliografia

- Aguado, V., Vitas, A.I., Garcia-Jalón, I. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA, *International Journal of Food Microbiology*, **90** (3), 341-347.
- Almeida, G.N., Gibbs, P.A., Hogg, T.A., Teixeira, P.C. (2006). Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection, *BMC Infectious Diseases*, **6**, 1-4.
- Anderson, M. e Pascual, V. (2000). *Microbiología Alimentaria*, Díaz de Santos, S.A.
- A. O. A. C. (1975). Official Methods of Analysis, 12th ed. Association Analytical Chemists, Washington, D. C.
- Arevalos-Sánchez, M., Regalado, C., Martin, S.E., Domínguez-Domínguez, J., García-Almendárez, B.E. (2012). Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity, *Food Control*, **24** (1-2), 116-22.
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins, *Toxins*, **2**, 1751-1773.
- Baird-Parker, T., C. (2000). *Staphylococcus aureus*, in Lund, B.M., Baird-Parker, T.,C. e Gould, G.W. (Ed.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*, (1317-1331). Aspen Publication, Gaithersburg, EUA.
- Bergdoll, M. S. e Wong, A. L. (2006). Staphylococcal Intoxications, *Foodborne Infections and Intoxications*, Elsevier Inc., 523-552.
- Brown, M. H. (2000). Processed Meat Products. In:Lund, B.M.;Parker, T.C. B.; Goul. G. W. - *The microbiological Safety and Quality of Food Vol.I* – Springer.

- Bustan, M. A., Udo, E. E., Chugh, T. D. (1996). Nasal carriage of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* among restaurant workers in Kuwait City, *Epidemiology and Infection*, **116**, 319-322.
- Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises, *International Journal of Food Microbiology*, **145**, 1-8.
- Carrito, M. M. (2007). Federação Portuguesa das Confrarias Gastronómicas, Mensagem da Presidente. Disponível em <http://www.fpcg-online.com/>
- Colaço, M. do R. (1989). Efeito de aditivos químicos nas características do salpicão tradicional de Vila Real ao longo do processo de cura. (Tese de doutoramento). Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- D'Aoust, J.Y (2000). *Salmonella* in Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Ed.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*, (pp. 1233-99). Aspen Publication, Gaithersburg, EUA.
- D'Aoust, J.Y. e Mauer, J. (2007). *Salmonella* species in Doyle, M. P., Beuchat, L. R. (Ed.) *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, (pp. 249-69). ASM Press, Washington, EUA.
- Decreto-Lei nº 560/99, de 18 de Dezembro. Diário da República nº 131- I Série. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação.
- Decreto- Lei nº 350/2007, de 19 de Outubro. Diário da Republica nº202 – I Série. Ministério de Agricultura, desenvolvimento Rural e Pescas.
- Dias, J. L. (1970). *Etnografia da Beira. A alimentação, contos, e narrativas, costumes, vida agrícola, crenças e superstições, cancionero, notas etnográficas e históricas*, Volume X, (pp.36).

- Diakos, A., Borges, M. (2011). Prevalência de *Salmonella* nos produtos de origem animal no retalho em Portugal, no âmbito do controlo oficial. Revista Riscos e Alimentos - Alimentos de origem animal. Nº 1, Julho 2011. ASAE. Disponível em <http://www.asae.pt/>
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiology Reviews*, **13**, 16-34.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. (2004). Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 3819-3822.
- Duquenne, M., Fleurot, I., Aigle, M., Darrigo, C., Borezée-Durant, E., Derzelle, S. (2010). Tool for Quantification of Staphylococcal Enterotoxin Gene Expression in Cheese, *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 1367-1374.
- DRAPC - Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro (2008). Produtos tradicionais de qualidade na região centro, Disponível em <http://ptqc.drapc.min-agricultura.pt/documentos/apresentacao.htm>.
- EFSA - European Food Safety Authority (2012b). *Salmonella*. Disponível em <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella.htm>
- EFSA – European Food Safety Authority (2012a). Food Additives, Last updated: 16 November 2012. [Consultado em 2012/11/21].
Disponível em <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives.htm>
- EFSA – European Food Safety Authority (2012c) “The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010”. [Consultado em 2013/01/18].
Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>

- EFSA – European Food Safety Authority (2013) “The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. [Consultado em 2013/07/20].
Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3129.pdf>
- Encimas, J.P., Sanz, J.J., López, M.L.G., Otero, A. (1999). Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage), *International Journal of Food Microbiology*, **46**, 167-171.
- Esteves, A., L.Patarata, C.Saraiva, J.A.Silva, C.Martins. (2000). Microbiological Profile and Hazards of Traditional Sausage from Trás-os-Montes. *47th International Congress of Meat Science and Technology*. Buenos Aires, Argentina. Vol.2, 6II-P4:704-705
- Esteves, A., L.Patarata, C.Martins. (2003). Microrganismos psicotróficos (*Listeria* spp.; *Yersinia enterocolitica*) em "Alheira." *International Conference Food Protection*. Cooperativa de ensino Superior Egas Moniz. Lisboa, Portugal: pp. 80-81.
- Farber, J.M. e Peterkin, P.J. (2000). *Listeria monocytogenes*, in Lund, B.M., Baird-Parker, T.,C. e Gould, G.W. (Ed.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*, (pp. 1178-232). Aspen Publication, Gaithersburg, EUA.
- Feiner, G. (2006). Raw fermented salami Meat products handbook. In *Feiner, G., Meat products Hand book Practical Science and Technologic*, (pp. 314–375). Reino Unido: Woodhead Publishing Limited.
- Feitosa, T. (1999). Contaminação, Conservação e Alteração da Carne. Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agro-pecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agro-indústria Tropical.
- Figueiredo, N. D. N. (2008). Contribuição para a caracterização físico-química dos maranhos da zona do Pinhal, relatório do trabalho de fim de curso – Engenharia

Zootécnica. Escola Superior Agrária de Castelo Branco – Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Flores, J. (1997). Mediterranean vs. Northern Europe meat products. Processing technologies and main differences. *Food Chemistry*, **59**(4), 505-510.

Fraqueza, M.J. (2008). Tecnologia dos produtos cárneos. Aulas de Tecnologia Produtos Animais. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária.

Gomes, M. JP (2011). Género *Listeria* spp, *Microbiologia Clínica Veterinária*, VET 3225, Área de Bacteriologia. UFRGS.

Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., Bakker, H. C. den., Wiedmann, M., Swaminathan, B. and Saunders B. (2010). *Listeria marthii* sp. Nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60** (6), 1280 – 1288.

Guerra, M. M. e F. A. Bernardo. (2004). O Risco da listeriose e a identificação do perigo – Revisão. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. **550**, 69 – 76.

Guerreiro, M. S. F. B. da E. (2011). Estudo da Microbiota de um produto cárneo cozido – Aplicação de duas Tecnologias de embalagem: vácuo e atmosfera modificada. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa.

Health Protection Agency (2012) “Verocitotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC)”, HPA. Última atualização em 2012. [Consultado em 2012/11/18]. Disponível em: <http://www.hpa.org.uk/ecoliVTEC>

Hernández-Herrero, M., Roig-Sagués, A., López-Sabater, E., Rodríguez-Jerez, J. e Mora-Ventura, M. (1999). Influence of storage temperature on the quality of beef liver; pH as a reliable indicator of beef liver spoilage. *Journal of the Science and Agriculture*, **79**(14), 2035-2039.

- Hicks S.J., B.M.Lund. (1991). The survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *Journal of Applied Bacteriology*. **70** 308-314.
- Hultin, H. (1993). Características del tejido muscular. In Fennema, O. – Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia. ISBN 84-200-0733-1. 815-888.
- ICMFS - International Commission on Microbiological Specification for Foods. (1980) Microbial Ecology of Foods. V.2. New York: Academic Press.
- ISO 11290-2 (1998). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Enumeration Method. AMENDMENT 1 (2004) Modification of the Isolation Media and the Haemolysis Test, and Inclusion of Precision Data, *International Organization for Standardization*, Geneve, Suíça.
- 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 6887-2 (2003). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination – Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products, *International Organization for Standardization*, Geneve, Suíça.
- ISO 6579-(2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.. *International Organization for Standardization*, Geneve, Suíça.
- ISO 11290-1(1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method, *International Organization for Standardization*, Geneve, Suíça.

ISO-11290-1 Amendment 1 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method - Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inc. *International Organization for Standardization*, Geneve, Suíça.

ISO 7218 (2007). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – General Requirements and Guidance for Microbiological Examinations, *International Organization for Standardization*, Geneve, Suíça.

Jay, J.M., Loessner, M.J. e Golden, D.A. (2005). *Modern Food Micobiology*, Springer, Nova Iorque, EUA.

Jordá, G. B., Marucci, R. S., Guida, A. M., Pires, P. S., Manfredi, E.A. (2012). Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. *Revista argentina de microbiologia*. Vol. 44 n°2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Kaper, J.B., Nataro, J.P. e Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*, *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 123-140.

Lawrie, R.A. & Ledward, D.A. (2006). *Lawrie's Meat Science*. Seventh Edition. Cambridge; Woodnead Publishing Limited.

Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Fléche-Matéos, A. le., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Monnier, A. le., Lecuit, M., and Allerberger, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **60**(9), 2210-2214.

Lecuit, M. (2007). Human listeriosis and animal models, *Microbes and Infection*, **9**, 1216-1225.

- Lou, Y. e A. E. Yousef. (1999). Characteristics of *Listeria monocytogenes* importante to food processors, (pp. 131 – 224) in E. T. Ryser e E. H. Marth (eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety*. Marcel Dekker. Nova – Iorque.
- Lovett, J. (1990). Taxonomy and general characteristics of *Listeria* spp. in: Foodborne Listeriosis, ed. Miller A.J., J.L. Smith, and G.A. Somkuti, (pp. 9-12). Amsterdam, The Netherlands: Society for Industrial Microbiology, Elsevier.
- Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., e Gould, G. W. (2000). The microbiological safety and quality of food (Vol. 2). Gaithersburg, Maryland: Springer.
- MacLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods, *International Journal of Food Microbiology*, **92** (1-1), 15-33.
- Marcelo, M. L. (1993). Beira Baixa – A memória e o Olhar, novos guias de Portugal. , (pp.70-71). Editorial Presença, Lisboa, Portugal.
- Marchal, M. e Bourdon, J.L. (1973) *Milieux de Culture et Identification Biochimique des Bactéries*, (pp.63-65), DOIN Editeurs, Paris, França.
- Marth, E. H. (1988). Disease characteristic of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, **42**(51), 165 – 168.
- Martins, C. e Patarata, L. (1993). Análises Físico-químicas de Carne e Produtos Cárneos. Protocolos de apoio às aulas práticas de tecnologia dos produtos animais. Série Didáctica Ciências Aplicadas, 32. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin P. M. & Robert V. Tauxe, R. V. (1999). Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, **5**(5), 607-625.

- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. e Gibbs, P. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal, *Food Microbiology*. **21**(2), 213-16.
- Mendonça, J. M. G.T.C. (2012). Aplicação de Tecnologia de Alta Pressão na Conservação de um Produto Cárneo Transformado em Portugal. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Meng, J., Doyle, M.P., Zhaot, T. e Zhaot, S. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Doyle, M.P. e Beuchat, L.R. (Ed.) *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, (pp. 249-69), ASM Press, Washington, EUA.
- Montville, T. J. e Mathews, K. R. (2008). *Food Microbiology, An introduction*, 2^a Edição ed., ASM Press, Washington, EUA.
- Murphy, R., Hanson, R. Duncan, L., Feze, N. e Lyon, B. (2005). Considerations for post-lethality treatments to reduce *Listeria monocytogenes* from fully cooked bologna using ambient and pressurized steam, *Food Microbiology*, **22**(4), 359-65.
- Novais, M.R. (1998). Microbiologia dos Alimentos in Ferreira, W.F.C. e Sousa, J.C.F. (Ed.) *Microbiologia* (Vol.I), (pp. 297-310). Lidel – Edições Técnicas, Lisboa, Portugal.
- NP 1612 (2006). Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de azoto total. Método de referência. Instituto Português da Qualidade.
- NP 3441 (1990). Carnes, derivados e produtos cárneos, determinação do ph. Processo de referência. Viandes et produits à base de viande, détermination du ph. Méthode de référence. Meat and meat products, measurement of ph. Reference method. Instituto Português da Qualidade.

- NP 4400-1 (2002). Regras gerais para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positive. Instituto Português da Qualidade.
- Nunes, M.; Santo, E. J. (2011). Real Confraria do Maranhão História e Tradição. (pp. 13-16). C. Carvalho Artes Gráficas
- Ordóñez, J. e Hoz, L. (2007). Mediterranean products. In: Toldrá, F, Hui, Y., Astiasarán, I, Nip, W., Sebranek, Silveira, E., E., Stahnke, L & Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. 333-347.
- Osaili, T.M., Alaboudi, A.R., Nesiari, E.A. (2011). Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan, *Food Control*, **22** (3-4), 586-90.
- Pampulha, M.E. (1998). Nutrição e crescimento de microrganismos. Ferreira, W.F.C. & Sousa, J.C. F. - Microbiologia, Vol.I Lidel Editora.
- Patarata, L. (1995). Conservação de produtos de salsicharia tradicional: relatório de uma aula teórico-prática (pp.72). Vila Real: Universidade de Trás - os Montes e Alto Douro.
- Peres, F. (2000). Tecnologia dos produtos cárneos”. Aulas Praticas de Tecnologia. Castelo Branco: Escola Superior Agrária de Castelo Branco.
- Pinhal Maior - Associação de desenvolvimento do Pinhal Interior Sul Disponível em <http://www.pinhalmaior.pt/>
- Pintado, C. M. B. S., Oliveira, A., Pampulha, M. E. e Ferreira, M. A. S. S.. (2005). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food microbiology*, **22**, 79-85.

Pintado, C.M.B.S. (2005). Application of molecular subtyping for characterizing *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products and environment (Report). Health Protection Agency. Food Safety Microbiology Laboratory. Foodborne Pathogen Reference Unit. London, United Kingdom.

Pintado, C.M.B.S. (2009). Efeito de bioconservantes no crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em queijo de ovelha. Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.

Portaria 699/2008 de 29 de Julho, *Diário da República*, 145.

Portaria 1313/93 de 29 de Dezembro, *Diário da República*, 302.

Puolanne, E.J., Ruusunen, M.H., Vainionpaa, J. I. (2001). Combined effects of NaCl and raw meat pH on water-holding in cooked sausage with and without added phosphate". *Meat Science*, 50 (1), 1-7.

Regulamento (CE) 853/2004 de 29 de Abril relativo regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem, *Jornal Oficial da União Europeia*, L226/22, Comissão Europeia, Bruxelas.

Regulamento (CE) 2073/2005 de 15 de Novembro relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia*, L338/1, Comissão Europeia, Bruxelas.

Regulamento (CE) 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia*, L322/12, Comissão Europeia, Bruxelas.

Regulamento (CE) 1333/2008 de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares, *Jornal Oficial da União Europeia* L354/16, Comissão Europeia, Bruxelas.

- Regulamento (CE) 365/2010 de 28 de Abril de 2010 que altera o Regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios no que diz respeito a *Enterobacteriaceae* no leite pasteurizado e noutros produtos lácteos líquidos pasteurizados e a *Listeria monocytogenes* no sal alimentar, Jornal Oficial da União Europeia L107/9, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Rompf, A. e Jahn, D. (2000). Ecology of bacteria and fungi in foods. Influence of redox potential and pH. In: Robison, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopedia of food microbiology. Vol.1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. 556-563.
- Ruusunen, M. e Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, **70** (3), 531-541.
- Salavessa, J.J.S.M. (2009). Salsicharia tradicional da Zona do Pinhal - Caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos, *Tese de Doutoramento*, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Santana, E. H. W., Beloti, V., Aragon-alegro, L. C., Mendonça, M. B. O. C. (2010). *Estafilococos em Alimentos*. Arq. Inst. Biol., São Paulo, **773**, 545 – 554.
- Santos, M.I. (2010). Laboratório em avaliação de contaminantes e perigos biológicos, Mestrado em Segurança Alimentar e Saúde Pública, *Manual de apoio*, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Santos, M.I., Correia, C., Campos, C.M.I., Saraiva, M.M., Novais, M.R. (2005a). Valores Guia para Avaliação da Qualidade Microbiológica de Alimentos Prontos a Comer Preparados em Estabelecimentos de Restauração. *Revista da Ordem dos Farmacêuticos*, **64**, 66 – 8.
- Santos E. M., Diez, A. M., González-Fernández, C., Jaime, I., e Rovira, J. (2005b). Microbiological and sensory changes in Morcilla de Burgos preserved in air, vacuum and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, **71**, 249-255.

- Seeliger, H.P.R., D.Jones. (1986). Genus *Listeria*. in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, ed. P.H.A. Sneath, M.S. Maine, M.E. Sharpe, J.G. Holt, (pp. 1235-1245). Baltimore, M.D., U.S.A.. Williams and Wilkins.
- Seo, K. S., Bohach, G. A. (2007). Staphylococcal Food Poisoning. In: Juneja, V. K.; Sofos, J. N. (Eds.). Pathogens and Toxins in Foods. Washington: ASM Press, pp. 119-130.
- Shinohara, N.K.S., Barros, V.B., Jimenez, S.M.C., Machado, E.C.L., Dutra, R.A.F. e Filho, J.L.L. (2008). *Salmonella* spp., importante agente patogénico veiculado em alimentos. Ciência e Saúde colectiva., **13**(5).
- Smith, H.R., Willshaw, G.A., Cheatsy T. (2000). *Escherichia coli* in Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. e Gould, G.W (Ed.) *The Microbiological Safety and Quality of Food* (vol. I), (pp. 622-84). Aspen Publication, Gathersburg. EUA.
- Soeiro, A. (2009). Qualificação dos Produtos Tradicionais – A Qualidade e a Origem, Qualifica-Associação Nacional de Municípios e de Produtores para a Valorização e Qualificação dos Produtos Tradicionais Portugueses.
- Su, Y.-C., Wong, A. C. L. (1995). Identification and Purification of a New Staphylococcal Enterotoxin, H, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 1438-1443.
- Su, Y. C., Wong, A. C. L. (1997). Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins”. *Journal of Food Protection*, **60**(2), 195 – 202.
- Swaminathan, B., Cabanes, D., Zhang, W. e Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes*, in Doyle, M.P. e Beuchat, L.R. (Ed.) *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, (pp. 249-69). ASM Press, Washington, EUA.
- Tendinha, I. (2007). Tecnologia dos produtos cárneos – Aulas práticas. Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Instituto Politécnico de Castelo Branco.

- Thévenot, D., Delignette-Muller, M-L., Christieans, S., Leroy, S., Kodjo, A., Vernozzy-Rozand, C. (2006). Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting–curing plants and their products, *International Journal of Food Microbiology*, **112** (2), 153-61.
- Udo, E. E, Al-Mufti, S., Albert, J. M. (2009). The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants, *BMC Research Notes*, **2** (108), 1-6.
- Valente, M.O.C. (1997). Cozinha de Portugal – Beiras temas e debates, (pp. 279-280).
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants, *Clinical Microbiology Reviews*, **14**, 584-640.
- Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M. M., Seabra, M. J., Borges, M., Fernandes, P., Nunes, S.. (2009). Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica.
- Viegas, Cláudia, (2009b). Consumo de sal numa Escola de Hotelaria. *Segurança e Qualidade Alimentar*, **6**, 34-38.
- Viegas, S. J. (2009a). *Alterações do Estado de Saúde Associados à Alimentação – Contaminação microbiológica dos alimentos*, Unidade de Observação e Vigilância, Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, (pp. 33-34). INSA, Lisboa, Portugal.
- Willshaw, G.A., Cheasty, T. e Smith, H.R. (2000). *Escherichia coli* in Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Ed.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*, (pp. 1136-77). Aspen Publication, Gaithersburg, EUA.

- Wong, A. C. L.; Bergdoll, M. S. (2002). *Staphylococcal food poisoning*. In Cliver, do; Riemann, H. P. Foodborne Diseases. Amsterdam: Academic Press, **2**, 231 – 248.
- Young-Duck, L., Moon, B.-Y., Park, J.-H., Chang, H.-I., Kim, W. J. (2007). Expression of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates based on mRNA analysis, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**, 461-467.
- Yousef, A. E. e Carlstrom, C. (2003). *Food Microbiology: a laboratory manual*, John Wilsey & Sons, Inc.
- Zang, Y., Yeh, E., Hall, G., Cripe, J., Bhagwat, A. A., Meng, J. (2007). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 47-53.
- Zunabovic, M., Domig , K. J., Kneifel,W. (2011). Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments - A review. *LWT - Food Science and Technology*, **44** (2), 351-62

6. ANEXOS

Anexo I - Hino da Confraria do maranho

I

Ser confrade é preservar
Os valores e a tradição
Promover e divulgar
Toda esta região.
È ter orgulho em mostrar
A nossa gastronomia
E também saber honrar
O maranho e a confraria.

II

O maranho é tradição
Que juramos defender
Excelência infinita
É um prato sem igual.
Seu sabor é promoção
É todo um saber fazer
É um cartão-de-visita
É orgulho regional.

III

De Oleiros a Mação
Sertã e Vila de Rei
Pedrogão, Proença-a-Nova:
Seis concelhos – Um Pinhal
Unidos numa canção
Como se fosse uma grei
Que agora se renova
Neste canto nacional.

Refrão

Quem não provar a lampreia
Comer cabrito estonado
Ou o bucho recheado
E os maranhos do Pinhal
Não faz sequer uma ideia
Do que é ouvir um fado
À guitarra acompanhado
Ou um hino a Portugal.

Letra: *Joaquim Filipe Patrício*

Música: *Maestro Augusto Mesquita*

Real confraria do maranho



ANEXO II – PROCEDIMENTO DE TRABALHO PARA A CRIOCONSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS A -80°C.

1. DEFINIÇÃO E OBJECTIVO

A criopreservação de microrganismos é a técnica de os isolar e manter a baixas temperaturas para que todas as suas características permaneçam inalteradas e a sua viabilidade mantida por tempo indefinido.

2. REFERENCIAL NORMATIVO

17025

3. DESCRIÇÃO

A manutenção em laboratório deve garantir que os microrganismos permaneçam viáveis e protegidos de possíveis contaminações.

As culturas podem ser mantidas :

- refrigeradas a 4°C;
- congeladas a (-20°C) ou (-80°C);
- em azoto líquido (-180°C);
- liofilizadas.

1 - Purificação da cultura

Seja qual for o método de conservação a cultura a conservar deve primeiro ser purificada:

- com uma ansa retirar uma pequena porção de uma colónia bem isolada e fazer uma sementeira por esgotamento em meio de cultura sólido (por exemplo: TSYEA);
- incubar à temperatura adequada (37°C);
- do crescimento obtido a partir de uma única célula, convém fazer subculturas a partir sempre de uma só colónia bem isolada, de modo a certificar-se da sua pureza.

2 - Preparação da cultura para centrifugar

- após purificação da cultura, inocular uma ansada num tubo com 10 ml de meio líquido TSB ou BHI, homogeneizar e incubar durante 6 a 7 horas a 37°C. Após este período, os microrganismos encontram-se na fase exponencial do seu crescimento e é a altura ideal para se proceder à sua conservação.

Nota: caso não haja possibilidade de centrifugar nesse dia, faz-se uma diluição 1/10 para refrescar o meio, cerca de 4 horas antes de iniciar a centrifugação.

3 - Centrifugação

Para cada estirpe, usar dois criotubos de 2 ml esterilizados e devidamente identificados. (É importante fazer duplicados para ter um tubo de trabalho e um de reserva);

- com uma pipeta esterilizada retirar para cada criotubo 1,5 ml de suspensão das células,
- centrifugar a 10 000 rotações por minuto durante 5 minutos;
- rejeitar o sobrenadante e repetir a mesma operação duas, três ou mais vezes de modo a obter o máximo de cultura;
- terminada a sequência de centrifugações, nos criotubos com o pelet, colocar em cada um 500 µl de meio líquido com 15% de glicerol;
- fechar as tampas, e agitar no vortex para ressuspender o pelet.
- congelar em arca a -80°C.

Composição dos meios de cultura

TSYEA

| | |
|----------------------|---------|
| TSB | 30 g |
| Extracto de levedura | 6g |
| Agar-agar | 15-18 g |
| Água destilada | 1000 ml |

TSB g/litro

| | |
|-------------------------------|-----|
| Pancreatic digest of casein | 17 |
| Papaic digest of soybean meal | 3 |
| Cloreto de sódio | 5 |
| Fosfato dipotassio | 2,5 |
| Dextrose | 2,5 |

Preparado de acordo com indicações do fabricante.
pH : 7,3 + 0,2 a 25°C

TSB + glicerol a 87%

15 ml de TSB + 3 ml de glicerol

4. CONTROLO

Para controlar a actividade, após alguns meses de congelação, a cultura poderá ser repicada para um meio de cultura selectivo e de isolamento e observar as suas características.

5. RESPONSABILIDADES

| | | | | | |
|-------|--|--|--|--|--|
| Acção | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Responsável

Colabora)

6. MODELOS ASSOCIADOS

INSTRUÇÕES DE TRABALHO

- Estufa
- Câmara de fluxo laminar
- Centrífuga
- Balança
- Placa de aquecimento
- Autoclave

PROCEDIMENTOS

- Preparação de meios de cultura
- Esterilização de meios de cultura
- Crioconservação
- Inactivação de culturas

7. REGISTOS

| IDENTIFICAÇÃO | SUPORTE E LOCAL DE ARQUIVO | RESPONSÁVEL PELO ARQUIVO | TEMPO MÍNIMO DE ARQUIVO |
|--|--|--------------------------|-------------------------|
| Registos de utilização dos equipamentos associados | Digital e papel no lab. de microbiologia | | |
| Registos de manutenção dos equipamentos associados | Digital e papel no lab. de microbiologia | | |
| VERSÃO | DATA | ALTERAÇÕES | |
| 1 | 2010 | Versão inicial | |
| | | | |
| ELABORADO | | APROVADO | |
| | | | |

Anexo III

Resultados de todas as análises microbiológicas efectuadas aos maranhos (n= 50)

| Amostra/Unidade da amostra | | <i>Escherichia coli</i> (Contagem) | <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (Contagem) | <i>Salmonella spp.</i> (Pesquisa) | <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (Pesquisa) |
|----------------------------|----|---------------------------------------|--|--------------------------------------|---|
| A Cru | M1 | <1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M2 | <1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M3 | 1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M4 | 1,6x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M5 | <1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| Apreciação | | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório |
| B Cru | M1 | 1,1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M2 | 9,0x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M3 | 8,0x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M4 | 1,4x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M5 | 1,5x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| Apreciação | | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório | Insatisfatório |
| C Cru | M1 | 5,1x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M2 | 2,6x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M3 | 2,1x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M4 | 2,0x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M5 | 1,0x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| Apreciação | | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório | Insatisfatório |
| D Cozido | M1 | <1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ⁴ ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M2 | <1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ⁴ ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M3 | <1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ⁴ ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M4 | <1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ⁴ ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M5 | <1x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ⁴ ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| Apreciação | | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório | Insatisfatório |
| E Cru | M1 | 1,3x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg. 25g | Neg 25g* |
| | M2 | 9,0x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M3 | 8,0x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M4 | 4,0x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M5 | 3,0x10 ⁴ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| Apreciação | | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório |
| F Cru | M1 | 5,2x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M2 | 4,0x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M3 | 1,0x10 ³ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M4 | 2,4x10 ³ ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M5 | 3,4x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |

| Apreciação | | Aceitável | Satisfatório | Satisfatório | Insatisfatório |
|-------------|----|---------------------------|--------------------------|--------------|----------------|
| G Cru | M1 | 1,8x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M2 | 3,0x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M3 | 6,0x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M4 | 9,0x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M5 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| Apreciação | | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório | Insatisfatório |
| H Cru | M1 | 1,8x10 ² ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g* |
| | M2 | 1,0x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M3 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M4 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Positivo 25g |
| | M5 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| Apreciação | | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório | Insatisfatório |
| G Cozido | M1 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M2 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M3 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M4 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M5 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| Apreciação | | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório |
| F Cozido | M1 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M2 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M3 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M4 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| | M5 | <1x10ufc/g | <1x10 ² ufc/g | Neg 25g | Neg 25g |
| Apreciação | | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório | Satisfatório |

*Positivo para *Listeria* spp

Anexo IV

Resultados de todas as análises físico-químicas efectuadas aos maranhos (n= 50)

| Análise | Amostra/Empresa/Produtor | | | | | | | | | |
|------------------|--------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| | A | B | C | D* | E | F | G | H | G* | F* |
| pH | 3,18 | 5,38 | 5,08 | 6,15 | 6,10 | 6,18 | 5,99 | 5,69 | 6,12 | 5,73 |
| | 2,94 | 5,33 | 4,99 | 6,20 | 5,83 | 6,29 | 5,26 | 5,78 | 5,97 | 4,79 |
| | 2,35 | 5,32 | 5,01 | 6,19 | 5,81 | 6,03 | 5,32 | 5,62 | 5,85 | 5,92 |
| | 2,57 | 5,18 | 5,00 | 6,23 | 5,77 | 5,97 | 5,30 | 5,60 | 5,66 | 5,97 |
| | 1,95 | 5,27 | 4,97 | 6,17 | 5,75 | 5,92 | 5,23 | 5,40 | 5,87 | 5,47 |
| | χ 2,6 | χ 5,30 | χ 5,01 | χ 6,19 | χ 5,85 | χ 6,08 | χ 5,42 | χ 5,62 | χ 5,89 | χ 5,58 |
| | δ 0,48 | δ 0,075 | δ 0,041 | δ 0,030 | δ 0,1421 | δ 0,1535 | δ 0,32 | δ 0,1407 | δ 0,168 | δ 0,481 |
| a _w | 0,929 | 0,928 | 0,925 | 0,937 | 0,922 | 0,923 | 0,928 | 0,924 | 0,935 | 0,929 |
| | 0,932 | 0,929 | 0,930 | 0,936 | 0,915 | 0,926 | 0,926 | 0,932 | 0,917 | 0,929 |
| | 0,930 | 0,926 | 0,933 | 0,922 | 0,919 | 0,924 | 0,927 | 0,923 | 0,925 | 0,929 |
| | 0,928 | 0,929 | 0,932 | 0,928 | 0,922 | 0,925 | 0,928 | 0,933 | 0,928 | 0,93 |
| | 0,933 | 0,928 | 0,926 | 0,925 | 0,922 | 0,926 | 0,925 | 0,924 | 0,929 | 0,9209 |
| | χ 0,93 | χ 0,928 | χ 0,9292 | χ 0,9296 | χ 0,92 | χ 0,9248 | χ 0,9268 | χ 0,9272 | χ 0,9268 | χ 0,9276 |
| | δ 0,002 | δ 0,0012 | δ 0,00356 | δ 0,0066 | δ 0,00308 | δ 0,0013 | δ 0,001 | δ 0,0048 | δ 0,0065 | δ 0,00376 |
| Gordura Total % | 4,73 | 11,07 | 3,37 | 5,18 | 16,87 | 5,03 | 16,38 | 9,40 | 16,00 | 8,97 |
| | 7,26 | 10,46 | 5,02 | 4,74 | 23,68 | 4,82 | 17,97 | 11,38 | 15,18 | 8,70 |
| | 6,33 | 10,92 | 5,01 | 3,7 | 18,44 | 3,84 | 13,44 | 12,18 | 13,82 | 9,47 |
| | 8,37 | 15,81 | 4,93 | 6,26 | 19,21 | 4,28 | 15,40 | 12,39 | 18,39 | 9,51 |
| | 5,60 | 7,99 | 7,41 | 5,25 | 21,57 | 2,38 | 12,18 | 9,72 | 13,79 | 7,32 |
| | χ 6,46 | χ 11,25 | χ 5,15 | χ 5,03 | χ 19,95 | χ 4,07 | χ 15,07 | χ 11,01 | χ 15,44 | χ 8,79 |
| | δ 1,417 | δ 2,8366 | δ 1,4457 | δ 0,9269 | δ 2,685 | δ 1,0532 | δ 2,30 | δ 1,3844 | δ 1,899 | δ 0,8919 |
| Proteína Total % | 14,59 | 12,75 | 14,73 | 16,56 | 10,85 | 12,25 | 11,53 | 13,35 | 12,85 | 15,82 |
| | 15,13 | 12,98 | 14,68 | 16,63 | 9,45 | 12,96 | 12,44 | 13,50 | 12,96 | 14,43 |
| | 15,13 | 12,10 | 13,73 | 16,74 | 11,43 | 12,70 | 11,60 | 12,92 | 13,11 | 15,38 |
| | 14,8 | 11,09 | 13,73 | 14,56 | 10,84 | 12,07 | 11,07 | 12,77 | 13,26 | 15,6 |
| | 14,26 | 12,13 | 13,45 | 14,98 | 10,26 | 13,02 | 12,47 | 12,92 | 13,29 | 13,51 |
| | χ 14,78 | χ 12,21 | χ 14,06 | χ 15,89 | χ 10,57 | χ 12,6 | χ 11,82 | χ 13,09 | χ 13,09 | χ 14,95 |
| | δ 0,371 | δ 0,7344 | δ 0,596 | δ 1,0387 | δ 0,748 | δ 0,42409 | δ 0,61 | δ 0,31459 | δ 0,189 | δ 0,96284 |
| Cloretos % | 1,389 | 2,426 | 0,955 | 1,603 | 1,975 | 1,673 | 1,148 | 1,701 | 1,060 | 1,611 |
| | 1,780 | 2,585 | 0,906 | 1,710 | 2,153 | 1,88 | 1,379 | 1,893 | 1,416 | 1,629 |
| | 1,626 | 3,266 | 0,938 | 1,724 | 2,062 | 1,929 | 1,324 | 1,871 | 1,321 | 1,587 |
| | 1,424 | 2,309 | 0,847 | 1,549 | 1,977 | 1,700 | 1,261 | 1,744 | 1,114 | 1,878 |
| | 1,654 | 2,871 | 1,200 | 1,646 | 1,976 | 2,034 | 1,242 | 1,792 | 1,227 | 1,604 |
| | χ 1,575 | χ 2,691 | χ 0,969 | χ 1,646 | χ 2,029 | χ 1,843 | χ 1,271 | χ 1,800 | χ 1,228 | χ 1,662 |
| | δ 0,164 | δ 0,38419 | δ 0,135 | δ 0,073 | δ 0,078 | δ 0,15378 | δ 0,081687 | δ 0,081687 | δ 0,1459 | δ 0,12179 |

Anexo V

Valores obtidos por Figueiredo (2008) e Salavessa(2009)

| Parâmetros | Amostras cruas | | Amostras cozidas | |
|----------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | Figueiredo (2008) | Salavessa (2009) | Figueiredo (2008) | Salavessa (2009) |
| pH | 5,42 | 5,92 | 5,72 | 6,1 |
| A _w | 0,91 | 0,945 | 0,92 | 0,94 |
| Gordura | 7,34 | 10,03 | 7,42 | 7,11 |
| Proteína | 13,45 | 12,81 | 15,46 | 14,6 |
| Cloretos | 1,69 | 1,25 | 1,41 | 0,82 |

Valores médios obtidos de todas as amostras por Figueiredo (2008) e Salavessa (2009)

| Parâmetros | Média de todas as amostras | |
|----------------|----------------------------|------------------|
| | Figueiredo (2008) | Salavessa (2009) |
| pH | 5,57 | 6,01 |
| A _w | 0,91 | 0,94 |
| Gordura | 7,35 | 8,57 |
| Proteína | 14,46 | 13,7 |
| Cloretos | 1,55 | 1,04 |

Resultados das análises microbiológicas efectuadas por Salavessa (2009).

| Estado da amostra | Análises microbiológicas (valores médios) | | | |
|-------------------|---|--|--|---|
| | <i>E.coli</i> (log ufc/g) | <i>Staphylococcus aureus</i> (resultados negativos 1g) | <i>Salmonella</i> spp. Positivo em 25g | <i>L. monocytogenes</i> (positivo em 25g) |
| Cru | 2,62 | 59,37% | 3,13% | 40,37% |
| Cozido | 0,23 | 84,3% | 0% | 0% |