



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

UTILIZAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURAIS COMO ALTERNATIVAS NA
CONSERVAÇÃO E MELHORIA DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS DE
CHARCUTARIA

por

Joana Maria Carvalho Gomes

Dezembro, 2016



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

UTILIZAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURAIS COMO ALTERNATIVAS NA
CONSERVAÇÃO E MELHORIA DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS DE
CHARCUTARIA

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para
obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada

por

Joana Maria Carvalho Gomes

Local: Centro de Biotecnologia e Química Fina, Laboratório Associado - Escola Superior de Biotecnologia,
Universidade Católica Portuguesa;
Primor Charcutaria-Prima, S.A.

Orientação: Professora Doutora Paula Teixeira

Co-orientação: Doutora Joana Barbosa

Dezembro, 2016

*Para a minha avó, que será sempre um exemplo de força e motivação.
Estará para sempre na minha memória e no meu coração.*

Resumo

A qualidade microbiológica dos alimentos é um aspeto preocupante para a indústria alimentar visto que a ação de microrganismos pode causar a deterioração dos alimentos e afetar a saúde dos consumidores. O uso de aditivos alimentares, a aplicação de um tratamento térmico adequado e de Boas Práticas de Fabrico são essenciais para a redução microbiana nos alimentos.

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Centro de Biotecnologia e Química Fina (CBQF) e na empresa Primor. O estudo em laboratório teve como objetivos testar a atividade antimicrobiana de três compostos naturais – quitosano, extrato etanólico de propólis e nisina – contra vários microrganismos, 21 Gram-positivo, 15 Gram-negativo e dois fungos e, ainda, comparar com a ação antimicrobiana do composto químico nitrito de sódio, isoladamente e em combinação com cloreto de sódio. A concentração mínima inibitória foi determinada através dos métodos da diluição em agar e da difusão da gota em agar, de modo a verificar a diferença entre os métodos. Também foi testada a atividade antimicrobiana com diferentes valores de pH do meio de cultura (5, 6 e 7) e diferentes temperaturas de incubação (4, 12, 20 e 37 °C), com os objetivos de verificar a influência do pH e temperatura na inibição dos microrganismos e simular a presença dos patogénicos em diferentes produtos alimentares e diferentes condições de armazenamento. Os compostos naturais testados tiveram maior efeito inibitório contra os vários microrganismos comparativamente com o nitrito de sódio sozinho e em combinação com cloreto de sódio, nas diferentes condições de pH e temperatura. Com a concentração de 0,65% (m/v) de quitosano foi possível inibir a maioria dos microrganismos testados. Com a concentração de 10 mg/mL de propólis foram inibidos os fungos, a maioria das bactérias Gram-positivo e algumas Gram-negativo. Com a concentração de 25 µg/mL de nisina foi possível inibir a maioria das bactérias Gram-positivo.

O trabalho desenvolvido na empresa alimentar Primor teve como objetivos o desenvolvimento de um novo tratamento térmico para o chouriço corrente e a implementação de melhorias nas Boas Práticas no seu processo de produção para reduzir a quantidade de bactérias do ácido láctico, principal contaminante do produto. De modo a reduzir o número destes microrganismos de deterioração e de microrganismos totais, para melhorar a qualidade e segurança microbiológica do chouriço, também se aplicou quitosano a este produto de charcutaria. Após i) a aplicação de uma cozedura de 77 °C durante 40 minutos no chouriço corrente, com 100% humidade e a chaminé da estufa semi-aberta, e ii) a aplicação de metodologias de monitorização de Boas Práticas mais eficazes, incluindo maior controlo do processo de produção do chouriço, as quantidades de bactérias do ácido láctico obtidas nas amostras, após embalamento, foram inferiores às das amostras do processo de cozedura *standard* e também das amostras obtidas por um processo não monitorizado. Com a adição de 0,15% (m/v) de quitosano ao chouriço, as quantidades de bactérias do ácido láctico e de microrganismos totais obtidas foram inferiores comparativamente com o chouriço com nitrito, ao fim de 14 dias de armazenamento. Por isso, a aplicação de um tratamento térmico alternativo ao do chouriço corrente *standard* e a implementação de melhorias nas Boas Práticas de Fabrico permitiram a melhoria da qualidade microbiológica do enchido após embalamento. Além disso, o quitosano parece ser uma alternativa natural com características interessantes para aplicação num produto alimentar.

Abstract

The microbiological quality of food is of considerable concern to the food industry since the activity of microorganisms can result in food spoilage and, more seriously, affect the health of consumers. The use of food additives, the application of a suitable heat treatment and Good Manufacturing Practices are essential to reducing microbial loads in foods.

The present work was developed in the Microbiology laboratory of Centro de Biotecnologia e Química Fina (CBQF) and at the food company Primor.

In the laboratory, the objectives of the study were to test the antimicrobial activity of 3 natural compounds – chitosan, ethanolic extract of propolis, and nisin – against various microorganisms, 21 Gram-positive, 15 Gram-negative bacteria and 2 fungi and, also, to compare with the antimicrobial action of the chemical compound sodium nitrite, alone and in combination with sodium chloride. The minimal inhibitory concentration was determined through the agar dilution and the drop agar diffusion methods, to examine any differences between both methods. Antimicrobial activity was also tested at different pH values of the culture medium at 5, 6 and 7 and different temperatures of incubation at 4, 12, 20 and 37 °C, with the objectives of determining the influences of pH and temperature on the inhibition of microorganisms and simulating the presence of the pathogens in different food products and different storage conditions. The natural compounds tested had greater inhibitory effect against the various microorganisms compared with sodium nitrite alone and in combination with sodium chloride, in the different conditions of pH and temperature. With the concentration of 0.65% (w/v) of chitosan it was possible to inhibit most of the tested microorganisms. With a concentration of 10 mg/mL of propolis, fungi, most of the Gram-positive microorganisms and some of the Gram-negatives were inhibited. With a concentration of 25 µg/mL of nisin it was possible to inhibit most of the Gram-positive microorganisms.

The work developed in Primor had as objectives the development of a new heat treatment for *chouriço corrente* and implementation of improvements in Good Practices in its production process to reduce the number of lactic acid bacteria, the major contaminant of the product. To reduce the number of such spoilage microorganisms and also total microorganisms, and to improve the microbiological safety of *chouriço*, chitosan was added to this charcuterie product. After i) the application of baking at 77 °C for 40 minutes on the *chouriço corrente*, with 100% humidity and with the stove chimney semi-open, and ii) the application of Good Practices monitoring methodologies with greater effectiveness, including greater control of the *chouriço* production process, the number of lactic acid bacteria in the samples after packing was lower than in the samples produced by the standard baking process and also lower than in samples obtained through a non-monitored process. With the addition of 0.15% (w/v) of chitosan to the *chouriço*, the number of lactic acid bacteria and total microorganisms was lower compared with the *chouriço* with nitrite, after 14 days of storage. Therefore, the application of an alternative heat treatment to the one used in the standard *chouriço corrente* and the implementation of improvements in Good Manufacturing Practices resulted in an improvement in the microbiological safety and shelf-life of the food product after packing. Additionally, chitosan appears to be a natural alternative with interesting characteristics for application in a food product.

Agradecimentos

Queria agradecer a todas as pessoas que estiveram comigo, me ajudaram e me apoiaram durante a realização do Projeto de Investigação, tanto durante o trabalho no laboratório e na empresa como durante a escrita da dissertação.

Principalmente, à minha orientadora da Escola Superior de Biotecnologia, Professora Doutora Paula Teixeira, por estar sempre disponível para ajudar, pela paciência, pelo incentivo e por ter sempre uma palavra amiga. Foi muito importante na realização deste trabalho.

Também queria agradecer à Doutora Joana Barbosa, como co-orientadora, por tudo o que me ensinou, pela paciência, pela disponibilidade e por me acompanhar sempre de perto, foi uma ajuda essencial ao longo deste tempo.

Queria agradecer à minha orientadora da Primor, Doutora Fátima Carvalho, que, apesar do curto tempo de estágio, esteve sempre pronta a ajudar. Também queria agradecer ao Doutor Pedro Silva pelo incentivo.

Gostaria de agradecer aos colegas de trabalho do laboratório que me ajudaram, principalmente à Cláudia, à Maria e à Ana. Nunca me esquecerei da ajuda que me deram.

Também gostaria de agradecer aos meus colegas da Primor, dos departamentos da Qualidade e de Investigação e Desenvolvimento, por me terem recebido tão bem. Um obrigado especial à Regina por todo o acompanhamento e ajuda.

Um obrigado à minha família por todo o apoio que me deu. Aos meus pais e ao meu irmão, pelo carinho, pela paciência e porque sem eles nunca teria chegado onde cheguei. Foram muito importantes durante esta etapa. Ao Rui, pela paciência, pelo apoio, pelo carinho e por ouvir sempre os meus desabafos.

Muito obrigada a todos que me ajudaram.

Índice

Resumo	2
Abstract.....	3
Agradecimentos.....	4
CAPITULO 1.....	6
1. Introdução.....	6
2. Materiais e Métodos	13
3. Resultados e Discussão	17
4. Conclusões.....	34
CAPÍTULO 2.....	34
1. Introdução.....	34
2. Metodologia.....	43
3. Resultados e Discussão.....	49
4. Conclusões.....	68
Conclusões gerais	69
Trabalho futuro	70
Apêndices.....	71
Bibliografia.....	77

CAPITULO 1

Agentes antimicrobianos naturais como alternativa aos antimicrobianos químicos na conservação de produtos alimentares

1. Introdução

1.1. Aditivos alimentares

Os aditivos alimentares são utilizados desde há milhares de anos. O açúcar, o sal e o xarope de milho são dos aditivos mais utilizados em alimentos (USDA, 2015). Atualmente, mais de 2000 aditivos são aplicados intencionalmente nos alimentos, com o objetivo destes manterem determinadas propriedades ou para prolongar o seu tempo de vida útil (Branen & Haggerty, 2002).

De um modo geral, um aditivo alimentar é qualquer substância adicionada ao alimento, mas existem várias definições conhecidas. Segundo a *Food and Drug Administration of the United States of America* (FDA), o conceito refere-se a qualquer substância usada intencionalmente ou que seja razoavelmente expectável resultar – direta ou indiretamente – num complemento alimentar ou afetar a característica do alimento. Esta definição abrange qualquer substância utilizada na produção, processamento, tratamento, embalagem, transporte ou armazenamento de alimentos. O objetivo da definição legal é estabelecer um requisito de aprovação de pré-mercado. Isto é, ocorrer um processo de revisão científica e regulamentar para avaliar a segurança e eficácia dos aditivos, antes da introdução no mercado (FDA, 2016). No entanto, são excluídos os produtos cujo uso é geralmente reconhecido como seguro (não requer a aprovação do governo), assim como aqueles ingredientes que são aprovados para uso, pela FDA ou pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, anteriormente às normas legais de aditivos alimentares e aditivos de cor e pesticidas, onde outras condições de aprovação de pré-mercado legais são aplicadas (FDA, 2014a).

Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), o aditivo alimentar é “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”.

A definição do *Codex Alimentarius* para um aditivo alimentar é “qualquer substância normalmente não consumida como alimento em si e habitualmente não utilizada como ingrediente característico dos alimentos, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos géneros alimentícios, para um efeito tecnológico (incluindo organolético) no fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, transporte ou armazenamento de tais resultados alimentares, ou pode ser razoavelmente esperado para resultar, (direta ou indiretamente) nele ou nos seus subprodutos tornando-se um componente do mesmo ou, de outra forma, afetando as características de tais alimentos. O termo não inclui os contaminantes ou substâncias adicionadas aos alimentos para manter ou melhorar as qualidades nutricionais” (*Codex Alimentarius*, 2016).

Os aditivos alimentares diretos são aqueles que são adicionados a um género alimentício para um propósito específico naquele alimento. Um exemplo de um aditivo direto é a goma xantana, que é utilizada em molhos para salada, leite com chocolate, recheios de panificação, pudins e em outros alimentos com o objetivo de melhorar a sua densidade e textura. A maior parte dos aditivos alimentares diretos estão identificados no rótulo dos ingredientes.

Os aditivos alimentares indiretos são aqueles que passam a fazer parte dos alimentos em quantidades pequenas, devido à sua embalagem, armazenamento ou outro manuseamento. Por exemplo, pequenas quantidades de substâncias presentes na embalagem podem entrar em contacto com os alimentos durante o armazenamento. No entanto, estas substâncias têm que ser autorizadas para este uso (FDA, 2014a).

Na União Europeia (UE) todos os aditivos alimentares são identificados por um número E. Por exemplo, o número E 1105 corresponde à lizozima (EFSA, 2011). Os aditivos alimentares são sempre incluídos nas listas de ingredientes de alimentos em que são usados. Os rótulos dos produtos devem identificar tanto a função do aditivo no alimento acabado (por exemplo, conservante ou cor) como a substância específica utilizada através da referência do número E ou do seu nome (por exemplo, E 415 ou goma xantana) (EFSA; <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives>). A EFSA acrescenta que “não deverão ser consideradas como aditivos alimentares as substâncias cuja utilização tenha por objetivo conferir determinado aroma e/ou sabor ou tenha fins nutricionais, tais como os sucedâneos do sal, as vitaminas e os minerais” (EFSA, 2008). Os aditivos mais comuns são os agentes de cor, os emulsionantes, os estabilizantes, os agentes gelificantes e espessantes, os conservantes e os edulcorantes (EFSA; <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives>).

Por outro lado, a bibliografia refere que os aditivos alimentares podem ser classificados dentro de uma das seis principais funções: conservação, melhoria no valor nutricional, adição ou substituição de cor, adição ou substituição de um aroma, melhoria na textura ou auxiliares de processamento (Branen & Haggerty, 2002; Carocho *et al.*, 2015).

A utilização de aditivos alimentares abrange todos os tipos de alimentos, desde os minimamente processados até aos produtos alimentares altamente processados e transformados. A utilização de aditivos alimentares é regulada por legislação própria, tanto em Portugal como em todos os países da União Europeia. Para que possa ser aplicado no processamento de alimentos, qualquer aditivo tem que estar incluído nas listas positivas de aditivos alimentares. As listas positivas envolvem todos os aditivos alimentares autorizados, sendo específicas para cada grupo de alimentos e indicam os teores máximos permitidos para cada aditivo (ASAE, 2016).

Alguns autores relatam problemas de saúde relacionados com o consumo de aditivos alimentares, contudo, as autoridades revêm periodicamente os dados de apoio de segurança e correspondente ingestão diária aceitável (revisto por Carocho *et al.*, 2015). Os aditivos alimentares desempenham um papel essencial na manutenção da qualidade alimentar e características que os consumidores exigem, mantendo os alimentos seguros, saudáveis e atraentes desde o produtor até ao consumidor (EUFIC, 2015).

1.2. Conservantes alimentares

Os conservantes são subdivididos em agentes antimicrobianos, antioxidantes e agentes anti-escurecimento (Carocho *et al.*, 2015). A conservação é, geralmente, definida como um método utilizado para manter um estado existente ou para evitar danos provocados por fatores químicos (oxidação), físicos (temperatura, luz) ou biológicos (microrganismos). Hoje em dia, os conservantes são uma parte indispensável do alimento. Isto porque os consumidores são mais exigentes por uma maior escolha, facilidade e conveniência de alimentos e devido aos elevados padrões de segurança alimentar (EUFIC, 2004a). Os conservantes são um importante meio de limitar o crescimento de microrganismos em vários produtos alimentares, mas também em produtos farmacêuticos, cosméticos e em outras áreas especializadas (Russell, 1991). Os antimicrobianos são substâncias/agentes que matam ou inibem o crescimento de microrganismos (com exceção dos vírus que não multiplicam em alimentos) (EUFIC, 2013). Os antimicrobianos mais utilizados em alimentos são os benzoatos, os sorbatos, os propionatos, os nitritos e os parabenos. Muitos destes estão relacionados com efeitos potencialmente perigosos para a saúde (Carocho *et al.*, 2015).

1.3. A problemática dos aditivos alimentares químicos

A qualidade microbiológica de alimentos é um aspeto preocupante para a indústria alimentar, pois a ação de microrganismos pode causar a deterioração dos alimentos e também afetar a saúde dos consumidores (Casquete, 2016a). Por outro lado, existem vários problemas relacionados com a saúde associados ao uso de aditivos alimentares químicos. O número de compostos químicos permitidos para serem utilizados como conservantes alimentares é limitado, devido, em grande parte, ao problema da real ou potencial toxicidade para os consumidores (Russell, 1991). Embora, atualmente, a maioria dos conservantes não tenham efeitos adversos e sejam classificados como seguros, tem havido problemas relativamente à segurança de alguns destes produtos químicos. Esses problemas incluem a possibilidade de alergias derivadas do ácido benzoico e de sulfitos, a formação de nitrosaminas cancerígenas derivadas do nitrito (Parke & Lewis, 2009) e, dependendo da dose aplicada, o sorbato de sódio pode ser genotóxico em linfócitos *in vitro* (Mamur *et al.*, 2010).

Numa altura em que o público está mais atento e interessado com a alimentação, os aditivos naturais têm vindo a ganhar interesse, tanto nas indústrias alimentares como nos consumidores. Estudos demonstram que os consumidores preferem alimentos preparados com aditivos naturais ao invés dos químicos (revisto por Carocho *et al.*, 2014; Carocho *et al.*, 2015; Rasooli, 2007). No entanto, a preparação de alimentos com conservantes de origem química ainda é prática diária para alcançar vida útil suficientemente longa e elevado grau de segurança na prevenção de infeções alimentares causadas por microrganismos patogénicos. Para atender aos critérios de consumo, os fabricantes de alimentos estão à procura de novas alternativas, mais naturais, que garantam suficientemente a segurança dos seus produtos. A natureza tem sido uma fonte generosa de compostos antimicrobianos, muitos dos quais desempenham um papel importante nos sistemas de defesa ou de competição naturais de organismos vivos (variando de microrganismos a insetos, animais e plantas) (Rahman, 2007). Apesar de promissores, os aditivos naturais apresentam algumas limitações e

desvantagens (Carocho *et al.*, 2015). Uma das principais desvantagens é o facto de não poderem ser aplicados segundo a legislação alimentar em vários países (Rahaman, 2007). Também a sua verdadeira eficácia no alimento e o facto de o preço poder ser muito superior ao de um aditivo químico que produza o mesmo efeito, podem ser uma grande limitação (Carocho *et al.*, 2015).

1.3.1. Nitrito de sódio

Os nitritos (NO_2), assim como os nitratos (NO_3), são produtos químicos que podem ser encontrados naturalmente em alimentos e água (Food Safety Authority of Ireland, 2015). Nitratos e nitritos são ubíquos dentro dos sistemas ambiental, alimentar, industrial e fisiológico (revisto por Moorcroft *et al.*, 2001). O nitrito de sódio é um aditivo com o número E 250. O teor máximo permitido em carne transformada, tratada ou não termicamente, é de 150 mg/Kg, exceto em produtos à base de carne esterilizados. Para produtos à base de carne esterilizados o teor máximo permitido é 100 mg/Kg (EFSA, 2011). O nitrito de sódio é aplicado durante a cura de determinados alimentos, tais como, chouriço, presunto e bacon (Campden BRI, 2010). A utilização deste composto como um agente de cura proporciona a cor e o sabor das carnes curadas, e retarda ou impede o crescimento de agentes patogénicos bacterianos (EFSA, 2003). Este composto é utilizado em combinação com sal e baixo valor de pH para garantir a sua segurança. O nitrito impede o crescimento de *Clostridium botulinum* e pode também ter efeitos contra outras bactérias nocivas e de deterioração (Food Safety Authority of Ireland, 2015). Existem vários alvos possíveis para a inibição das células bacterianas por parte do nitrito. Os modos primários de ação são: inibição da respiração através de enzimas-chave; redução nos níveis de ATP intracelular; redução da eficácia dos sistemas de transporte ativo, bloqueando importantes vias enzimáticas; libertação de ácido nitroso e óxido nítrico, e formação de compostos S-nitroso por reação do nitrito com proteínas heme. Tal como outros conservantes, o nitrito é mais ativo em condições ácidas, que favorecem a produção de ácido nitroso não dissociado e, assim, permite a sua entrada para o interior da célula bacteriana, em que terá um maior efeito (Campden BRI, 2010). O nitrato é convertido em nitrito pelas bactérias redutoras de nitrato e foi verificado que era o nitrito que aumentava a mudança de cor e que menores quantidades eram necessárias em comparação com os nitratos (Gray & Pearson, 1984). A nitrosomioglobina é responsável pela cor vermelha de produtos curados crus e é formada pela reação de mioglobina com o óxido nítrico. O nitrito de sódio é, normalmente, a fonte de óxido nítrico. Em solução, o ião nitrito está em equilíbrio com o ácido nitroso não dissociado. O ácido nitroso, em condições levemente ácidas, gera o óxido nítrico (Campden BRI, 2010). O nitrito pode fazer parte da formação de nitrosaminas (Sebranek & Bacus, 2007). Estas são formadas a partir de reações de nitrito com aminas ou amidas normalmente presentes no corpo e são compostos cancerígenos (Campden BRI, 2010). Tem sido demonstrado que o nitrito, além de efeitos carcinogénicos, tem outros efeitos deletérios para os seres humanos, incluindo a oxidação de hemoglobina, a ferrihemoglobina, originando meta-hemoglobinemia que pode ser fatal (Cammack *et al.*, 1999).

1.4. Aditivos naturais

Desde há algumas décadas, que os aditivos alimentares naturais têm vindo a ganhar interesse tanto pelos consumidores como pelos produtores de alimentos (Carocho *et al.*, 2015). Usualmente, o público escolhe alimentos sem aditivos, mas se estes não estiverem disponíveis, o consumidor irá escolher, se possível, alimentos que contenham aditivos naturais em relação aos sintéticos (Carocho *et al.*, 2014). Os ingredientes naturais são derivados de fontes naturais como, por exemplo, a soja e o milho fornecem lecitina para manter a consistência do produto (FDA, 2014a). Também as especiarias e as ervas aromáticas são bem conhecidas por inibir bactérias, leveduras e bolores e, tradicionalmente, têm sido amplamente utilizadas na conservação de alimentos, bem como para fins medicinais (Rahman, 2007).

Os aditivos naturais mais comuns são os antioxidantes, os antimicrobianos, os corantes e os adoçantes. Quanto aos antimicrobianos naturais, estes podem ter origem em três fontes: microrganismos, animais e plantas (Carocho *et al.*, 2015). Existem vários antimicrobianos naturais presentes na lista de aditivos alimentares permitidos na União Europeia, nomeadamente, nisina, natamicina e lisozima (EFSA, 2011). Por outro lado, há outros compostos com origem natural que têm a capacidade de conservar, no entanto, não estão presentes na lista positiva de aditivos. Existem estudos que reportam efeitos antimicrobianos de propólis e quitosano em alimentos (Casquete *et al.*, 2016a; 2016b), apesar destes compostos naturais não estarem presentes na lista de aditivos (EFSA, 2011).

1.4.1. Nisina

A nisina (Figura 1) é uma bacteriocina que pertence ao grupo dos lantibióticos de classe I, que são péptidos biologicamente ativos que contêm lantionina - o aminoácido tioéter, bem como vários outros aminoácidos modificados. As bacteriocinas são produzidas por bactérias do ácido láctico (Klaenhammer, 1988) e são sintetizadas em ribossomas (Sahl *et al.*, 1995). Esta bacteriocina é um aditivo com o número E 234 (EFSA, 2011) e é a única produzida industrialmente em grande escala (Dischinger *et al.*, 2014). A nisina pode ser aplicada em pudins de semolina e tapioca e produtos similares, em queijos curados e queijos fundidos, e em *clotted cream* com concentrações máximas de 3, 12,5 e 10 mg/Kg, respetivamente (EFSA, 2011). A nisina pode substituir os conservantes sintéticos com alterações mínimas sensoriais, sendo que apresenta estabilidade térmica, não apresenta efeitos de toxicidade e tem baixa tendência para gerar resistência. Lantibióticos, tal como a nisina, usualmente atuam sobre bactérias Gram-positivo, incluindo *Listeria monocytogenes* ou *Clostridium* spp. (Dischinger *et al.*, 2014), enquanto as bactérias Gram-negativo apresentam uma resistência natural à ação destas bacteriocinas (Prudêncio, 2015a), ou seja, têm atividade de curto espetro. A nisina tem duplo mecanismo de ação (Dischinger *et al.*, 2014; Helander & Mattila-Sandholm, 2000; Prudêncio *et al.*, 2015a): i) através da formação de poros na membrana citoplasmática, com perda de eletrólitos e outros metabolitos e consequente dissipação da força motriz de prótons e ii) através da inibição da síntese da parede celular, por ligação ao lípido II, o que interfere com a biossíntese do peptidoglicano (Dischinger *et al.*, 2014). No entanto, as bactérias Gram-negativo são geralmente

resistentes à nisina devido à presença de uma membrana exterior e, principalmente, à camada de lipopolissacarídeos (LPS), que atua como uma barreira, impedindo a difusão da bacteriocina para o local de ação (Alakomi *et al.*, 2000). A atividade das bacteriocinas pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como condições ambientais e a composição química do meio. Além disso, a suscetibilidade do microrganismo alvo pode ser alterada devido a mudanças na composição celular induzida por condições ambientais (Prudêncio *et al.*, 2015a).

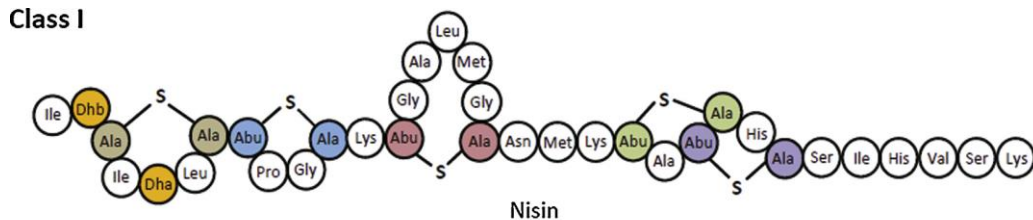


Figura 1. Estrutura da nisina (*in* Dischinger *et al.*, 2014).

1.4.2. Propólis

O propólis é uma mistura de diferentes quantidades de cera de abelhas e resinas recolhidas pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir de plantas, particularmente de flores e brotos de folhas (Casquete *et al.*, 2016a). A composição química deste antimicrobiano varia consoante a origem geográfica e das plantas das resinas, e também varia de estação para estação (Lu *et al.*, 2004). As abelhas utilizam o propólis nos seus favos para proteção, para reparar danos, para construir localidades assépticas e também como isolante térmico. Tem sido reportado que o extrato etanólico de propólis possui diversas atividades biológicas, tais como antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-hepatotóxicas, anti-tumorais, anestésico local, entre outras (Bankova *et al.*, 2000). A maioria das propriedades benéficas de propólis são atribuídas à presença de componentes fenólicos, que representam cerca de metade do seu peso (Cardoso *et al.*, 2011). As suas atividades biológicas também podem estar relacionadas com a presença de flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos diterpenóides, enzimas, vitaminas, aminoácidos, entre outros (Bryan *et al.*, 2015). O propólis não é tóxico para os seres humanos nem para os mamíferos, desde que não seja administrada uma dose muito elevada (Casquete *et al.*, 2016a). Tem sido relatado que o propólis pode ser utilizado como extrato etanólico ou aquoso (Ali, *et al.*, 2010; Cortés, 2012; Sawaya *et al.*, 2011). Contudo, o extrato aquoso tem atividade antimicrobiana mais fraca do que o extrato etanólico (Ali *et al.*, 2010). Apesar de não estarem estudados todos os mecanismos pelos quais o propólis pode inibir os microrganismos, alguns dos seus componentes, como ácidos aromáticos e ésteres, alteram as membranas das células, inibem a RNA polimerase e reduzem a motilidade bacteriana, o que contribui para a sua ação e o sinergismo com alguns antibióticos (Vargas-Sánchez *et al.*, 2013). Segundo Brayn *et al.* (2015) o propólis tem um mecanismo antibacteriano similar a péptidos líticos induzindo a morte bacteriana através de lise celular. O mesmo autor também demonstrou que um extrato etanólico de propólis russo continha compostos antibacterianos e anti-biofilme. O propólis tem múltiplas aplicações, tais como conservante em alimentos - sumos, refrigerantes, carne, peixe, frutos do mar e frutas -, em medicina veterinária e no desenvolvimento de medicamentos e cosméticos (Ali

et al., 2010; Casquete *et al.*, 2016a; Vargas-Sánchez *et al.*, 2013). A eficácia do propólis como antimicrobiano e antioxidante em produtos de carne processados também tem sido demonstrado (Ali, *et al.*, 2010; Casquete *et al.*, 2016a). As propriedades de propólis – antioxidante, antibacteriano e antifúngico – combinadas com o facto de vários dos seus componentes estarem presentes em alimentos e em aditivos alimentares e serem reconhecidos como *Generally Recognised as Safe* (GRAS) – ou Geralmente Reconhecido como Seguro –, torna-o um candidato atraente como conservante natural em novas aplicações alimentares. Ou seja, o propólis poderá ser utilizado como antioxidante e antimicrobiano natural, sendo aplicado em alimentos, tornando-os mais naturais e minimamente processados, sem conservantes químicos, que é o que os consumidores procuram (Casquete *et al.*, 2016a).

1.4.3. Quitosano

O quitosano - uma forma desacetilada da quitina - é um polissacarídeo e um componente que ocorre naturalmente no exosqueleto de crustáceos e nas paredes celulares dos fungos (Casquete *et al.*, 2016b). Este composto é um polímero constituído por uma unidade desacetilada e uma unidade acetilada (Aranaz *et al.*, 2010). É insolúvel em água (pH=7) e nos solventes orgânicos comuns, no entanto, pode ser dissolvido em solventes específicos, como hexafluoro-2-propanol, N,N-dimetilacetamida ou hexafluoroacetona (Kumirska *et al.*, 2011) e também em ácido acético (Casquete *et al.*, 2016b). Este composto demonstra ter atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos de deterioração e patogénicos relacionados com alimentos (Aider, 2010). A sua atividade antimicrobiana é influenciada por diversos fatores, tais como o tipo de quitosano (grau de desacetilação e peso molecular), o pH do meio, a temperatura, a presença de componentes alimentares (Casquete *et al.*, 2016b; Zheng & Zhu, 2003) e o microrganismo alvo (Aider, 2010). Os mecanismos exatos de ação antibacteriana do quitosano ainda são desconhecidos. No entanto, a estrutura policatiónica do quitosano é um pré-requisito para a sua atividade antibacteriana. O valor de pH do meio estar abaixo do pKa (constante de acidez) do quitosano e dos seus derivados, a interação eletrostática entre a estrutura policatiónica e os componentes predominantemente aniónicos da superfície dos microrganismos, como proteínas da superfície celular e lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativo, desempenham um papel principal na atividade anti-bacteriana (Kong *et al.*, 2010). O quitosano não é tóxico, é biodegradável e biocompatível com tecidos humanos (Aranaz *et al.*, 2010). Tem ainda atividades antioxidante e anti-tumoral, ação anti-inflamatória e tem efeito hipocolesterolemico (Kumirska *et al.*, 2011). Outra das aplicações é como quelante de metais pesados no tratamento de águas residuais (Roller *et al.*, 2001). As funções biológicas benéficas do quitosano também fazem com que este seja de interesse para a indústria alimentar (Casquete *et al.*, 2016b). Uma das aplicações do quitosano já investigadas é como bioconservante em produtos cárneos (Petrou *et al.*, 2012). No estudo de Sagoo *et al.* (2002), o quitosano foi um inibidor de crescimento microbiano eficaz em produtos de carne de porco triturada refrigerada. A maioria dos estudos realizados estão relacionados com a aplicação do quitosano na produção de filmes de base biológica ativa (Aider, 2010). Tem-se demonstrado que o quitosano aplicado isoladamente, ou em combinação com outros agentes antimicrobianos naturais, nomeadamente óleos essenciais, nisina e

enterocina, permite uma melhoria na segurança alimentar (Anacarso *et al.*, 2011; Petrou *et al.*, 2012; Roller *et al.*, 2001). Casquete *et al.* (2016b) demonstrou que a aplicação de quitosano com bactérias do ácido lático permite a redução de bactérias patogênicas em alheira. O quitosano pode ser aplicado para aumentar o tempo de vida útil de certos alimentos, tais como frutas e vegetais (Anacarso *et al.*, 2011). Este composto, além de retardar o crescimento microbiano e o tempo de vida útil dos alimentos, também aumenta a qualidade dos alimentos (Vasilatos & Savvaïdis, 2013).

1.5. Objetivos

O principal objetivo do trabalho desenvolvido em laboratório foi determinar as concentrações mínimas inibitórias de três agentes antimicrobianos naturais – extrato etanólico de propólis, quitosano e nisina – contra 38 microrganismos (21 Gram-positivo, 15 Gram-negativo e dois fungos), com o intuito de os aplicar posteriormente em produtos de charcutaria, como substituto aos conservantes químicos. A ação antimicrobiana do conservante sintético nitrito de sódio foi também determinada, individualmente e em combinação com cloreto de sódio. As concentrações mínimas inibitórias foram determinadas através dos métodos de diluição em agar e difusão da gota em agar com o intuito de comparar os dois métodos. Também se testou a atividade antimicrobiana dos compostos nas condições de pH 5, 6 e 7 e às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C, com os objetivos de simular diferentes produtos alimentares e diferentes condições de armazenamento.

2. Materiais e Métodos

2.1. Culturas microbianas

Os microrganismos utilizados nos ensaios experimentais foram 36 bactérias, 21 Gram-positivo e 15 Gram-negativo, e dois fungos (Tabela 1).

Tabela 1. Microrganismos utilizados nos ensaios experimentais.

Microrganismos	Espécies	Origem
Gram-positivo	- <i>Bacillus cereus</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus stearothermophilus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> 18N (Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> - MRSA) - <i>Staphylococcus aureus</i> 2037M1 (Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> - MSSA) - <i>Listeria monocytogenes</i> 7946 - <i>Listeria monocytogenes</i> 7947 - <i>Listeria innocua</i> 2030c - <i>Clostridium sporogenes</i> 1.31 - <i>Clostridium sporogenes</i> 1.34 - <i>Clostridium sporogenes</i> 1.61 - <i>Clostridium perfringens</i> 1.16 - <i>Clostridium perfringens</i> 1.19 - <i>Clostridium perfringens</i> 1.22	Isolados da Coleção de Culturas da Escola Superior de Biotecnologia (Porto, Portugal)
	- <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, EUA)
	- <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 12956 - <i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 13590 - <i>Enterococcus flavescens</i> DSMZ 7370 - <i>Enterococcus gallinarum</i> DSMZ 20628 - <i>Enterococcus casseliflavus</i> DSMZ 20680	Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ; Brunsvique, Alemanha)
Gram-negativo	- <i>Salmonella</i> Braenderup - <i>Salmonella</i> Enteritidis - <i>Salmonella</i> Typhimurium - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Proteus vulgaris</i> - <i>Proteus mirabilis</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Yersinia enterocolitica</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i> R - <i>Acinetobacter baumannii</i> S – 1 - <i>Acinetobacter baumannii</i> S – 2 - <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> R - <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> S	Isolados da Coleção de Culturas da Escola Superior de Biotecnologia (Porto, Portugal)
	- <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, EUA)
	- <i>Yersinia enterocolitica</i> NCTC 10406	National Collection of Type Cultures - Culture Collection of Public Health England (NCTC; Salisbúria, Reino Unido)
Fungos	- <i>Candida albicans</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Isolados da Coleção de Culturas da Escola Superior de Biotecnologia (Porto, Portugal)

S - Microrganismos sensíveis a antibióticos; R – Microrganismos resistentes a antibióticos

Os microrganismos, à exceção dos isolados de *Clostridium*, cresceram em *Trypto-casein soy agar* com extrato de levedura (0,6% m/v) (TSA-YE; Biokar diagnostics, Beauvais, França) a 37 °C, em condições de aerobiose, durante 24 h e armazenados a -20 °C em *Trypto-casein soy broth* (TSB; Laboratorios Conda S.A., Madrid, Espanha) contendo 30% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Os isolados de *Clostridium* cresceram em *Brain Heart Infusion broth* (BHIB; Biokar diagnostics) a 37 °C, em condições de anaerobiose, durante 48 h e armazenados a -20 °C em BHIB contendo 30% (v/v) de glicerol.

2.2. Preparação de solução de quitosano

A preparação da solução de quitosano foi baseada no procedimento descrito por Casquete *et al.* (2016b). Preparou-se uma solução-mãe *stock* de quitosano a 3% (m/v) (90% desacetilação, Aqua Premier Co., Tailândia) dissolvido em 3% (v/v) de ácido acético (Panreac, Barcelona, Espanha). A solução foi protegida da luz e guardada no frio. As diluições posteriores foram preparadas em água destilada estéril.

2.3. Preparação de extrato etanólico de propólis (EEP)

O propólis utilizado foi recolhido em Vila Franca, Viana do Castelo (Portugal), e mantido no escuro até ao seu processamento. O extrato etanólico foi obtido de acordo com o procedimento descrito por Casquete *et al.* (2016a), preparando-se uma solução-mãe *stock* de extrato etanólico de propólis de 0,1 g/mL. Adicionou-se 20 g de propólis em 100 mL de etanol (95% v/v; Panreac). A mistura foi protegida da luz e ficou a dissolver *overnight*, à temperatura ambiente. Depois de repousar, a solução foi filtrada com papel de filtro *Whatman* (Figura 9, em Apêndice) e guardou-se o extrato no frio. Ao propólis que ficou no filtro, adicionou-se mais 100 mL de etanol, ficando a dissolver *overnight*. Voltou-se a filtrar e adicionou-se ao extrato anterior. Conservou-se a solução a -20 °C, o que permitiu que durante a congelação houvesse a precipitação de outros compostos. O sobrenadante do EEP foi utilizado nos ensaios e as diluições posteriores foram preparadas com água destilada estéril.

2.3.1. Teor de fenólicos totais do extrato etanólico de propólis

O teor fenólico total foi determinado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu (Wettasinghe & Shahidi, 1999). Este teste baseia-se na oxidabilidade de fenóis, a pH alcalino, e o reagente de Folin-Ciocalteu (ou também chamado de reagente Folin-Denis) funciona como um agente oxidante. Em condições adequadas, o ensaio abrange monofenóis e reage com vários tipos de fenóis encontrados na natureza (Singleton *et al.*, 1999).

Juntou-se 15 µL da amostra de propólis a 10 mL de água ultrapura obtida através do aparelho EASY pure II, LF ultrapure water system (Barnstead, Dubuque, Iowa, EUA) e 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu (Scharlau, Sentmenat, Espanha) em balão volumétrico. A essa mistura adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio saturado (35% m/v; Sigma-Aldrich) e perpez-se até ao volume de 25 mL com água ultrapura. Após 1 hora de reação à temperatura ambiente, no escuro, a absorvância foi medida a 760 nm (espectrofotómetro Helios, Unicam, Inglaterra). O ácido gálico foi utilizado como o padrão para uma curva de calibração e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g de amostra). A 0,02 g de ácido gálico foram adicionados 100 mL de água ultrapura e, após completa dissolução, diferentes volumes desta solução foram retirados e seguiu-se o protocolo como descrito anteriormente, substituindo-se a amostra de propólis pelo ácido gálico. Obtiveram-se soluções padrão com as concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 15 e 17 ppm.

2.4. Preparação de soluções de nisina, de nitrito de sódio e de nitrito de sódio com cloreto de sódio

As soluções de nisina (25 µg/mL; Larbus, S.A., Madrid, Espanha), de nitrito de sódio (300 µg/mL; Merck, Darmstadt, Alemanha) e de nitrito de sódio com cloreto de sódio (150/4000 µg/mL; Panreac) foram preparadas nos dias dos ensaios, não sendo preparadas soluções *stock*. As soluções-mãe e as diluições posteriores foram preparadas com água destilada estéril.

2.5. Atividade antimicrobiana e concentração mínima inibitória (CMI)

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico de propólis e das soluções de quitosano, nisina, nitrito de sódio e de nitrito de sódio com cloreto de sódio contra os microrganismos apresentados na Tabela 1 foi determinada através de diferentes técnicas e condições experimentais.

2.5.1. Preparação do inóculo

À exceção dos isolados de *Clostridium*, todos os inóculos foram preparados a partir de uma cultura crescida em TSA-YE com 24 h a 37 °C, em condições de aerobiose, através da suspensão de colônias isoladas em solução de Ringer estéril (Biokar diagnostics), de modo a obter turbidez equivalente a 0,5 na escala de *McFarland*. Os isolados de *Clostridium* cresceram em BHIB durante 48 h a 37 °C, numa câmara de anaerobiose. Os ensaios foram realizados em duplicado.

2.5.2. Determinação de CMI por diferentes métodos e diferentes condições de pH e temperatura

Os valores de CMI dos compostos foram determinados para os vários microrganismos através de dois métodos: diluição em agar e difusão da gota em agar, com o objetivo de se compararem os resultados obtidos pelos diferentes métodos.

Para ambos os métodos foram testadas as condições de pH do meio de 5, 6 e 7. As diferentes temperaturas de incubação usadas, 4, 12, 20 e 37 °C, foram testadas, apenas, no método de difusão da gota em agar.

Os valores de pH 5 e 6 foram escolhidos porque, para compostos como o nitrito de sódio, ao contrário de um pH alcalino, um pH ácido aumenta a atividade antimicrobiana (Ryser & Marth, 1999). Além disso, também permite simular diferentes produtos alimentares com diferentes condições de pH. O valor de pH foi medido diretamente no meio de cultura TSA-YE, através do medidor de pH de modelo MicropH 2002 (Crison, Barcelona, Espanha). Para se ajustar o pH do meio para 5 e 6, utilizou-se uma solução de ácido clorídrico (HCl 0,1 M).

As temperaturas escolhidas permitiram simular diferentes condições de armazenamento dos alimentos. Os resultados foram registados após crescimento visível do microrganismo na placa com agar, exceto quando a temperatura aplicada foi de 37 °C, em que se visualizou os resultados após incubação *overnight*, à exceção de *Clostridium*, em que os resultados foram visualizados após 48h de incubação.

2.5.2.1. Método da diluição em agar

A partir das soluções-mãe, realizaram-se as diluições dos compostos em água estéril e incorporou-se 2 mL de cada solução preparada com 18 mL de meio TSA-YE (1:10). As concentrações de quitosano usadas variaram de 0,0094 a 0,35 % (m/v); as de propólis de 0,039 a 10 (mg/mL); as de nisina de 1,563 a 25 (µg/mL); as de nitrito de sódio de 9,375 a 300 (µg/mL); e as de nitrito de sódio com cloreto de sódio de 150/2000 e 150/4000 (µg/mL). A cada placa contendo determinada concentração de cada composto foram adicionados 10 µL de cada inóculo (obtido como descrito no ponto 2.5.1.). Como controlos foram usadas as quantidades correspondentes de ácido acético e de etanol para cada

concentração de quitosano e propólis, respetivamente. Meios sem composto incorporado e com inóculo foram utilizados como controlo positivo. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C, em condições de aerobiose, sendo que este método não foi aplicado para os isolados de *Clostridium*. A menor concentração do composto que resultou em não crescimento visível sobre a superfície do meio de cultura foi a selecionada como CMI do composto. A Figura 2a mostra o crescimento de vários microrganismos num meio em que foi incorporado um composto a uma dada concentração.

2.5.2.2. Método de difusão da gota em agar

Mergulharam-se zaragatoas estéreis em cada suspensão de inóculo (preparado em 2.5.1.) e inoculou-se no meio TSA-YE, fazendo-se um riscado uniforme em três direções, de forma a obter-se um crescimento em “tapete”. Depois de se realizarem as diluições dos compostos a partir das soluções-mãe, como descrito no ponto 2.5.2.1., adicionou-se 10 µL de cada diluição e de cada solução-mãe a cada “tapete” de microrganismos. Como controlos, utilizou-se a quantidade correspondente de ácido acético e de etanol a cada concentração de quitosano e propólis, respetivamente, e também água como controlo positivo. As placas foram incubadas a 4, 12, 20 e 37 °C, em condições de aerobiose, exceto para *Clostridium*, em anaerobiose. A menor concentração do composto que resultou em não crescimento visível sobre a superfície do meio de cultura foi a selecionada como CMI do composto. A Figura 2b mostra o crescimento de um microrganismo num meio onde foram aplicadas soluções de um composto com diferentes concentrações.

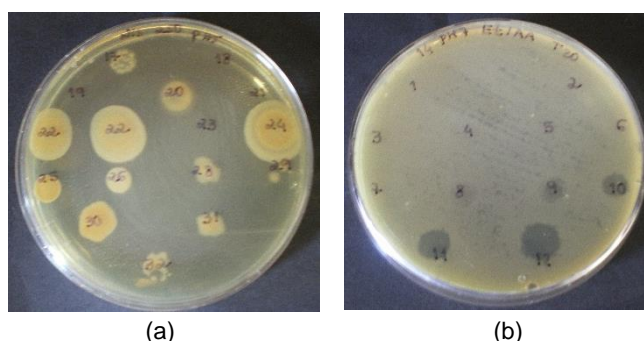


Figura 2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de um composto através de: (a) método da diluição em agar: crescimento de vários microrganismos num meio em que foi incorporado um composto numa dada concentração; (b) método da difusão da gota em agar: crescimento de um dado microrganismo no meio com agar em que foram aplicadas soluções de um composto com diferentes concentrações.

3. Resultados e Discussão

3.1. Teor de fenólicos totais do extrato etanólico de propólis

O teor de fenólicos totais do extrato etanólico de propólis obtido foi de 77 a 136 mg/g. No estudo de Casquete *et al.* (2016a), obteve-se o teor de fenólicos totais de $86,66 \pm 1,53$ mg/g para a amostra de EEP, o que é um valor próximo dos obtidos no presente estudo. O propólis utilizado por Casquete *et al.* (2016a) foi recolhido na mesma região que o propólis aplicado no presente trabalho e, provavelmente por isso, os teores de fenólicos foram similares. Além disso, o método de extração de propólis e o solvente utilizados neste trabalho foram os mesmos que no estudo de Casquete *et al.* (2016a) e é sabido que a concentração de fenóis presente também está relacionada com os

processos de extração dos compostos visto que fatores como o solvente utilizado afetam a produção do extrato de propólis (Bankova *et al.*, 2000; Sawaya *et al.*, 2011). O conteúdo de teor de fenólicos totais obtidos neste trabalho também está de acordo com o estudo de Falcão *et al.* (2013), em que amostras de propólis recolhidas de seis regiões geográficas diferentes no norte de Portugal variaram entre 1 e 256,5 mg/g. A composição fenólica do propólis depende das plantas que se encontram próximas da colmeia, das características geográficas e climáticas do local, assim como das espécies de abelhas (Bankova *et al.*, 2000).

3.2. Atividade antimicrobiana e concentração mínima inibitória (CMI)

Testou-se a atividade antimicrobiana dos vários compostos contra vários tipos de microrganismos de modo a perceber se o seu espectro de ação era alargado. A determinação de CMI dos compostos foi realizada através de dois métodos distintos. O método da diluição em agar (ou também chamado método de incorporação) envolve a incorporação de várias concentrações desejadas dos agentes antimicrobianos no meio com agar, seguido da inoculação do inóculo microbiano na superfície da placa de agar (Balouiri *et al.*, 2015). A técnica de difusão em agar é utilizada para determinação da concentração mínima inibitória em meios sólidos (Bonev *et al.*, 2008) e a difusão em agar refere-se ao movimento das moléculas através da matriz que é formada pela gelificação do agar (The Gale Group Inc, 2003). O método de difusão da gota em agar (ou também chamado método da gota) envolve a inoculação do inóculo na superfície da placa com agar, seguido da adição de várias gotas das soluções dos agentes antimicrobianos com as concentrações desejadas, difundindo-se no meio com agar e o inóculo.

As diferentes condições de pH do meio permitiram simular diferentes produtos alimentares: a pH 5 os produtos fermentados, como enchidos crus fermentados, que têm o pH entre 5 e 5,5 (FAO, 2016b), a pH 6 um fiambre ou um chouriço não fermentado (FDA, 2015a) e a pH 7 produtos como caranguejo ou camarões que têm o pH neutro (FDA, 2015a) e ainda como controlo. Se se considerar outras possíveis aplicações dos antimicrobianos, como na área da saúde, o pH de feridas crónicas está entre 7,15 e 8,9 (Gethin, 2007). O objetivo de testar a atividade antimicrobiana a diferentes temperaturas foi simular diferentes condições de armazenamento de produtos alimentares. A temperatura de 4 °C é a temperatura a que deve funcionar o frigorífico (FDA, 2015c), 12 °C é a temperatura de abuso e 20 °C é a temperatura ambiente. Também se realizaram experiências a 37 °C como controlo, visto que é a temperatura ideal de crescimento para a maioria dos microrganismos patogénicos (Adams & Moss, 1995).

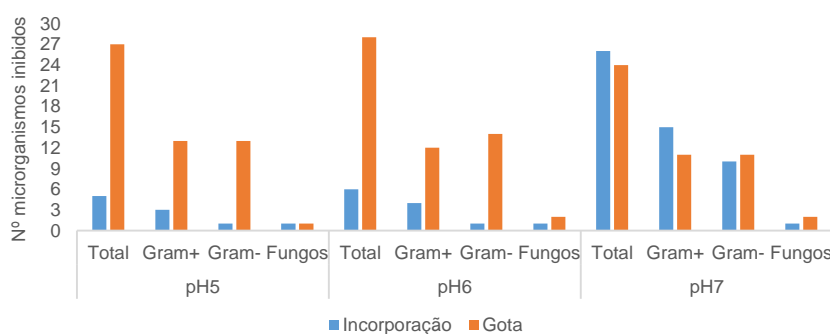
3.2.1. Atividade antimicrobiana do quitosano

O quitosano inibiu a maioria dos microrganismos testados na concentração 0,5% (m/v), tanto pelo método da gota como por incorporação, nas diferentes condições de pH (Tabela 18, em Apêndice). Os microrganismos foram inibidos pelo quitosano em, pelo menos, uma das condições testadas. O ácido acético 3% (v/v) foi utilizado como controlo e, para vários microrganismos, este composto, individualmente, teve um efeito inibitório superior relativamente à sua adição com quitosano. Ainda

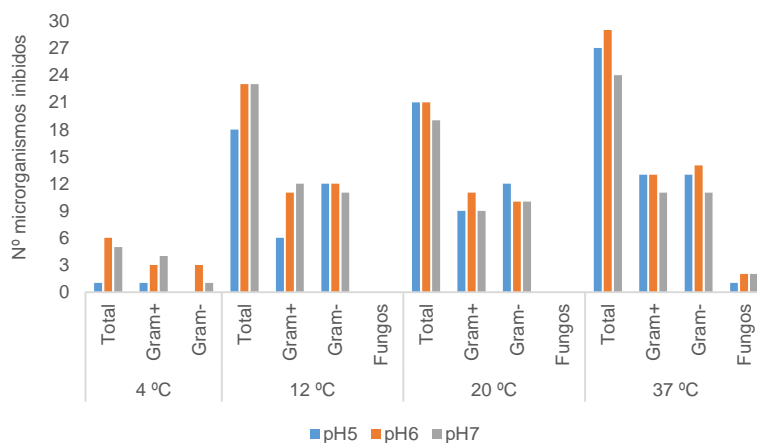
para alguns microrganismos, em certas condições de pH, o intervalo de CMI do ácido acético coincidiu com o CMI do quitosano.

Na Figura 3a e 3b é possível observar o número de microrganismos inibidos pelo quitosano através dos métodos de incorporação e de gota com o pH do meio de 5, 6 e 7 e através de incubação às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e com diferentes condições de pH do meio, respetivamente. Na Tabela 2 estão indicados os microrganismos que foram inibidos pelo quitosano através dos métodos de incorporação e da gota, com o meio a pH 5, 6 e 7 e à temperatura de 37 °C.

A pH 7 e utilizando o método de incorporação, a maioria dos microrganismos foram inibidos pela solução de quitosano (Tabela 18, em Apêndice). Nas mesmas condições de pH, mas através do método da gota, apenas não foram inibidos *B. stearothermophilus* e *Staph. aureus* 18N, nas concentrações testadas. Nestas condições, o ácido acético teve efeito inibitório contra os microrganismos *B. subtilis*, *L. monocytogenes* 7946, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* e *Ps. aeruginosa*.



(a)



(b)

Figura 3. Número de microrganismos (Total, Gram-positivo, Gram-negativo e Fungos) inibidos pelo quitosano: (a) através dos métodos de incorporação e gota nas condições de pH de 5, 6 e 7; (b) às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e com o pH do meio de 5, 6 e 7.

Quando se testou a atividade antimicrobiana de quitosano contra *Cl. sporogenes* e *Cl. perfringens* a pH 6 e à temperatura de 37 °C, verificou-se que este composto apenas inibiu *Cl. perfringens* 1.22 (Tabela 19, em Apêndice). Por outro lado, à mesma temperatura e a pH 7, o quitosano não inibiu nenhum isolado de *Cl. sporogenes* nem de *Cl. perfringens*. O facto de um isolado de *Cl. perfringens*

ser inibido a pH 6 pode dever-se ao facto de não serem as condições ideais de crescimento e o pH do meio estar a influenciar a ação do quitosano.

S. Braenderup e *S. Enteritidis* foram inibidas pelo quitosano apenas quando se aplicou a técnica da difusão da gota em agar. Com exceção das condições de pH 7 às temperaturas de 12 e 20 °C, em que o ácido acético teve ação inibitória, a bactéria *S. Enteritidis* foi sempre inibida pelo quitosano.

Comparando os dois métodos, para certos microrganismos, o valor de CMI obtido através da diluição em placa foi inferior relativamente ao método da gota, noutros casos foi superior e ainda, para vários microrganismos, os valores foram próximos, não havendo nenhum padrão de comparação. Para vários microrganismos Gram-positivo e Gram-negativo, a pH 5 e a pH 6, o quitosano não teve efeito inibitório através do método de incorporação, mas houve inibição pelo método da gota para os mesmos microrganismos.

Tabela 2. Microrganismos inibidos pelo quitosano através dos métodos de incorporação e da gota e com o pH do meio de 5, 6 e 7

	Microrganismos inibidos					
	pH5		pH6		pH7	
	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota
Gram-positivo	<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>Staph. aureus</i> 2037 M1 <i>Staph. aureus</i> 18N <i>Staph. aureus</i> 2037 M1 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>Staph. aureus</i> 2037 M1 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c
Gram-negativo	<i>Y. enterocolitica</i> (ESB)	<i>S. Braenderup</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>K. pneumoniae</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406 <i>Y. enterocolitica</i> (ESB) <i>A. baumannii</i> R <i>A. baumannii</i> S - 1 <i>A. calcoaceticus</i> R	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. Braenderup</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>K. pneumoniae</i> <i>P. vulgaris</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406 <i>Y. enterocolitica</i> (ESB) <i>A. baumannii</i> R <i>A. baumannii</i> S - 1 <i>A. baumannii</i> S - 2 <i>A. calcoaceticus</i> R <i>A. calcoaceticus</i> S	<i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>P. mirabilis</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Y. enterocolitica</i> (ESB) <i>A. baumannii</i> R <i>A. baumannii</i> S - 1 <i>A. baumannii</i> S - 2 <i>A. calcoaceticus</i> R <i>A. calcoaceticus</i> S	<i>S. Braenderup</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406 <i>Y. enterocolitica</i> (ESB) <i>A. baumannii</i> R <i>A. baumannii</i> S - 1 <i>A. baumannii</i> S - 2 <i>A. calcoaceticus</i> R <i>A. calcoaceticus</i> S
Fungos	<i>Sac. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Sac. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i> <i>Sac. cerevisiae</i>	<i>Sac. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i> <i>Sac. cerevisiae</i>

Às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C, o quitosano inibiu a maioria dos microrganismos testados através do método da gota (Tabela 19, em Apêndice). Apesar da maioria dos microrganismos a 4 °C não consiga crescer, daqueles que crescem, a maioria foi inibida pelo quitosano. A concentração de 0,65% (m/v) de quitosano inibiu a maioria dos microrganismos nas diferentes temperaturas e

condições de pH testados. Todos os microrganismos foram inibidos pelo quitosano em pelo menos uma das condições testadas, à exceção dos isolados de *Cl. sporogenes* e *Cl. perfringens* 1.16 e *Cl. perfringens* 1.22. Para cada condição de temperatura e pH, apenas se determinou a CMI para aqueles microrganismos que conseguem crescer nessas dadas condições. Ou seja, no presente trabalho, para cada condição apenas se refere os microrganismos, que são ou não inibidos, daqueles que conseguem crescer.

Quando se testou a temperatura de 20 °C e o meio a pH 5, de todos os microrganismos que conseguem crescer nestas condições, apenas não foram inibidos pelo quitosano os Gram-positivo *Ent. gallinarum* DSMZ 20628, *Staph. aureus* 18N, *Staph. aureus* 2037 M1 e o Gram-negativo *K. pneumoniae*. O ácido acético teve efeito inibitório contra *Ent. flavescens* DSMZ 7370, *Ps. aeruginosa*, *A. calcoaceticus* R e *Sac. cerevisiae*. Nas mesmas condições de temperatura e a pH 6, apenas não foram inibidos pelo quitosano o Gram-positivo *Staph. aureus* 2037 M1, os Gram-negativo *A. baumannii* R, *A. baumannii* S – 2 e a levedura *Sac. cerevisiae*. O ácido acético teve efeito inibitório contra *B. cereus*, *Ps. aeruginosa* e as estirpes de *Y. enterocolitica*. A 20 °C e com o valor de pH do meio neutro, apenas não foram inibidos pelo quitosano os Gram-positivo *Staph. aureus* 18N, *Staph. aureus* 2037 M1 (tal como não foi inibido nas outras condições de pH) e *L. monocytogenes* 7946, o Gram-negativo *A. calcoaceticus* R e o fungo *Sac. cerevisiae* (tal como não foi inibido a pH 6). O ácido acético teve efeito inibitório contra *B. cereus*, *S. Enteritidis*, *Ps. aeruginosa* e as estirpes de *Y. enterocolitica*.

Um maior número de microrganismos consegue crescer à temperatura de 12 °C, em comparação com 4 °C. A esta temperatura e a pH 5, apenas não foram inibidos pelo quitosano os microrganismos Gram-positivo *Ent. flavescens* DSMZ 7370, *Ent. gallinarum* DSMZ 20628 e *Ent. casseliflavus* DSMZ 20680. É sabido que as espécies de *Enterococcus* são bastante resistentes (McAuley *et al.*, 2012). O ácido acético teve efeito inibitório contra *L. monocytogenes* 7946. Com a mesma temperatura, mas a pH 6, apenas não foi inibida pelo quitosano a levedura *Sac. cerevisiae* e o ácido acético teve efeito inibitório contra *Staph. aureus* 2037 M1, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* e *Ps. aeruginosa*. Por outro lado, a pH 7, apenas não foram inibidos pelo quitosano um Gram-positivo *Staph. aureus* 18N (MRSA) e o fungo *Sac. cerevisiae*. O ácido acético teve efeito inibitório contra *S. Enteritidis*, *P. vulgaris* e as estirpes de *Y. enterocolitica*.

Quando se testou a atividade antimicrobiana de quitosano a 4 °C e a pH 5, apenas houve inibição da bactéria *L. monocytogenes* 7947. O ácido acético teve efeito inibitório contra os microrganismos *Ps. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* (ESB) e *A. calcoaceticus* S. Os restantes microrganismos não crescem à temperatura de 4 °C. Com a mesma temperatura, mas a pH 6, a maioria dos microrganismos, que conseguem crescer nestas condições, foram inibidos pelo quitosano. As Gram-positivo inibidas foram *Ent. faecium* DSMZ 13590, *L. monocytogenes* 7946 e, tal como a pH 5, *L. monocytogenes* 7947. As Gram-negativo inibidas foram *Ps. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* (ESB) e *A. calcoaceticus* S. O ácido acético teve efeito inibitório contra *Y. enterocolitica* NCTC 10406 e *A. calcoaceticus* R. A pH 7 a maioria dos microrganismos foram inibidos pelo quitosano, sendo que apenas *Y. enterocolitica* NCTC 10406 não foi inibida. O ácido acético teve efeito inibitório contra *Ps. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* (ESB) e *A. calcoaceticus* R.

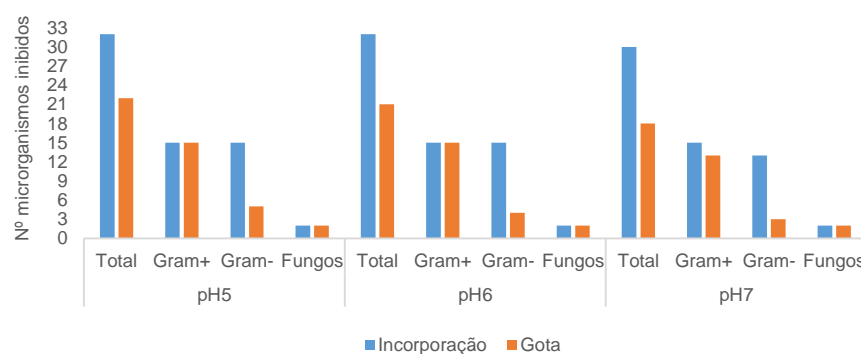
Comparando os valores de CMI obtidos para os diferentes microrganismos às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C, é possível verificar que não existe nenhum padrão de comparação para as diferentes temperaturas, mesmo para os microrganismos do mesmo gênero. No entanto, para alguns microrganismos que pertencem ao mesmo gênero, os valores de CMI obtidos às mesmas temperaturas são próximos. O mesmo acontece para microrganismos da mesma espécie. A temperatura baixa e o pH ácido são fatores que influenciam o crescimento dos microrganismos. Caso um produto tenha um pH de 5 e seja armazenado a 4 °C, a possibilidade de desenvolvimento dos microrganismos é muito baixa, sendo necessária a aplicação de uma menor concentração de antimicrobiano comparativamente a outras condições. No caso específico da aplicação do quitosano, só foi possível inibir *L. monocytogenes* 7947 à temperatura de 4 °C e a pH 5, como já referido acima. Este microrganismo consegue crescer a temperaturas de refrigeração (Adams & Moss, 1995). No entanto, apenas foi necessário aplicar 0,075% (m/v) de quitosano para o inibir. Nas condições de pH 6 e 7 à temperatura de 4 °C e de pH 5, 6 e 7 às temperaturas de 12 e 20 °C com a concentração de 0,3% (m/v), foi possível inibir a maioria dos microrganismos que crescem nestas condições de pH e temperatura.

Observando as Tabelas 18 e 19, em Apêndice, foi possível concluir que o quitosano inibiu bactérias Gram-positivo, bactérias Gram-negativo e fungos. No entanto, a atividade antimicrobiana variou entre os diferentes microrganismos. A concentração mínima inibitória do quitosano demonstrada para organismos alvo específicos é de 0,01 a 1% (Zheng & Zhu, 2003). No entanto, no presente estudo, obteve-se intervalos de CMI mais alargados. Segundo Casquete *et al.* (2016b) para *Staph. aureus*, *L. innocua*, *E. coli* e *S. Typhimurium* obteve-se os valores de CMI de 0,02, 0,2, 0,02 e 0,1%, respetivamente, através do método de incorporação de quitosano. No entanto, apenas o valor de CMI obtido para *S. Typhimurium* foi similar ao do estudo de Casquete *et al.* (2016b), tendo-se obtido o valor de 0,15%, a pH 7. Num estudo de Simpson *et al.* (1997), para se inibir *B. cereus*, num pH de 5,6 e à temperatura de 37 °C, foram necessárias concentrações de quitosano iguais ou superiores a 0,02%. No presente trabalho, através do método da gota e a pH6, foi necessário aplicar uma concentração bastante superior (0,15%) para se inibir este microrganismo. Segundo o mesmo autor, *E. coli* apresentou crescimento mínimo e inibição completa em soluções de quitosano com concentrações de 0,005% e superiores a 0,0075%. No entanto, no presente estudo obtiveram-se valores de CMI entre 0,3 e 0,35%, através do método da gota e a pH6. Contudo, os valores de pH e os métodos utilizados não foram exatamente os mesmos. Estas diferenças podem dever-se a vários fatores, entre os quais, o tipo de quitosano, o grau de desacetilação, o peso molecular e as estirpes bacterianas. Além disso, o meio também tem influência, principalmente, o valor de pH, força e presença de solutos iónicos capazes de reagir com o quitosano através de interações moleculares e bloqueio da reatividade do grupo amina e também a presença ou ausência de substâncias que interferem, assim como proteínas e lípidos (Casquete *et al.*, 2016b; Zheng & Zhu, 2003). O estudo de Arancibia *et al.* (2014) demonstrou que a atividade antimicrobiana depende fortemente do tipo de microrganismo, ao invés do tipo de quitosano. No presente estudo, percebeu-se que as diferentes temperaturas e valores de pH também influenciam a inibição por parte do quitosano.

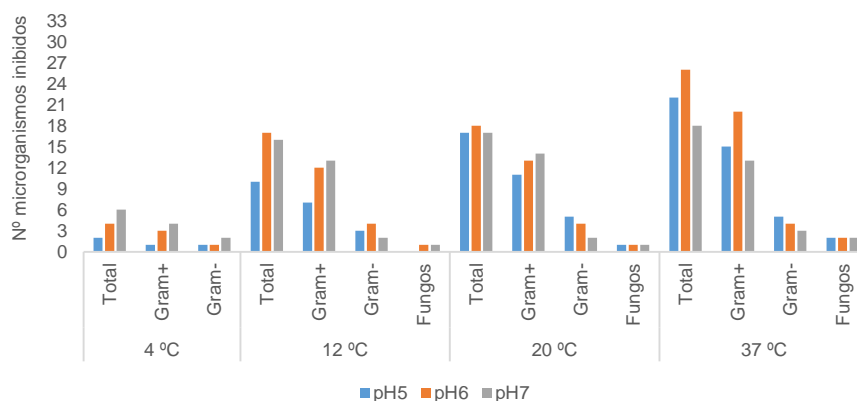
3.2.2. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de propólis (EEP)

O propólis inibiu a maioria dos microrganismos testados na concentração de 10 mg/mL, tanto pelo método de incorporação como pelo método da difusão da gota, nas diferentes condições de pH (Tabela 20, em Apêndice). Os microrganismos foram inibidos pelo propólis em, pelo menos, duas das condições testadas.

Na Figura 4a e 4b é possível observar o número de microrganismos inibidos pelo EEP através dos métodos de incorporação e de gota e com o pH do meio de 5, 6 e 7 e através de incubação às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e com diferentes condições de pH do meio, respectivamente. Na Tabela 3 estão indicados os microrganismos que foram inibidos pelo EEP através dos métodos de incorporação e da gota, com o meio a pH 5, 6 e 7 e à temperatura de 37 °C.



(a)



(b)

Figura 4. Número de microrganismos (Total, Gram-positivo, Gram-negativo e Fungos) inibidos pelo EEP: (a) através dos métodos de incorporação e gota nas condições de pH de 5, 6 e 7; (b) às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e com o pH do meio de 5, 6 e 7.

A pH 5, através do método de incorporação, todos os microrganismos testados foram inibidos pelo propólis. O pH ácido do meio poderá ajudar ao efeito da inibição. Um estudo de Lu *et al.* (2004) demonstrou que o pH ácido (pH 5) aumentou a atividade antibacteriana do EEP contra *Staph. aureus*. Nas mesmas condições de pH, mas através do método da difusão da gota em agar, a maioria dos microrganismos foram inibidos pelo propólis, sendo que apenas não foram inibidos os microrganismos Gram-negativo *S. Braenderup*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Ps. aeruginosa* e *Y. enterocolitica*. Os microrganismos Gram-

negativo têm uma membrana externa e possuem uma camada de lipopolissacarídeos, o que lhes confere uma maior resistência comparativamente com os microrganismos Gram-positivo (Prudêncio *et al.*, 2015a).

Através de incorporação de propólis e com o meio a pH 6, todos os microrganismos foram inibidos, tal como aconteceu a pH 5. Utilizando o método da gota e a pH 6, não houve inibição por propólis para os mesmos microrganismos que não foram inibidos a pH 5 pela mesma metodologia e também não ocorreu inibição de *A. baumannii* R.

Tabela 3. Microrganismos inibidos pelo EEP através dos métodos de incorporação e da gota e com o pH do meio de 5, 6 e 7

	Microrganismos inibidos					
	pH5		pH6		pH7	
	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota
Gram-positivo	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>Staph. aureus</i> 18N <i>Staph. aureus</i> 2037 M1 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>Staph. aureus</i> 18N <i>Staph. aureus</i> 2037 M1 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>Staph. aureus</i> 18N <i>Staph. aureus</i> 2037 M1 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>Staph. aureus</i> 18N <i>Staph. aureus</i> 2037 M1 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>Staph. aureus</i> 18N <i>Staph. aureus</i> 2037 M1 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956 <i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590 <i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370 <i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628 <i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680 <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>Staph. aureus</i> ATCC 29213 <i>Staph. aureus</i> 2037 M1 <i>L. monocytogenes</i> 7946 <i>L. monocytogenes</i> 7947 <i>L. innocua</i> 2030c
Gram-negativo	<i>S. Braenderup</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>K. pneumoniae</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406 <i>Y. enterocolitica</i> (ESB) <i>A. baumannii</i> R <i>A. baumannii</i> S – 1 <i>A. baumannii</i> S – 2 <i>A. calcoaceticus</i> R <i>A. calcoaceticus</i> S	<i>A. baumannii</i> R <i>A. baumannii</i> S – 1 <i>A. baumannii</i> S – 2 <i>A. calcoaceticus</i> R <i>A. calcoaceticus</i> S	<i>S. Braenderup</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>K. pneumoniae</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406 <i>Y. enterocolitica</i> (ESB) <i>A. baumannii</i> R <i>A. baumannii</i> S – 1 <i>A. baumannii</i> S – 2 <i>A. calcoaceticus</i> R <i>A. calcoaceticus</i> S	<i>A. baumannii</i> S – 1 <i>A. baumannii</i> S – 2 <i>A. calcoaceticus</i> R <i>A. calcoaceticus</i> S	<i>S. Braenderup</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>K. pneumoniae</i> <i>P. vulgaris</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Y. enterocolitica</i> (ESB) <i>A. baumannii</i> R <i>A. baumannii</i> S – 1 <i>A. baumannii</i> S – 2 <i>A. calcoaceticus</i> R <i>A. calcoaceticus</i> S	<i>A. baumannii</i> R <i>A. baumannii</i> S – 1 <i>A. calcoaceticus</i> R
Fungos	<i>C. albicans</i> <i>Sac. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i> <i>Sac. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i> <i>Sac. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i> <i>Sac. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i> <i>Sac. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i> <i>Sac. cerevisiae</i>

Pelo método de incorporação e nas condições do meio a pH 7, apenas não foram inibidos os microrganismos Gram-negativo *P. mirabilis* e *Y. enterocolitica* NCTC 10406. *L. innocua* foi inibida com 0,47 mg/mL de EEP, o que está de acordo com o estudo de Silici *et al.* (2007) em que o EEP usado foi inibitório em concentrações entre 0,25 e 0,50 mg/mL. No entanto, o EEP usado no estudo de Casquete *et al.* (2016a) inibiu *L. innocua* a partir da concentração de 0,15 mg/mL. A diferença do

presente estudo para o estudo de Casquete *et al.* (2016a) foi no meio de cultura utilizado; em vez de TSA, os autores realizaram a experiência em meio *Mueller Hinton Agar* (MH). Contudo, em experiências preliminares realizadas, verificou-se que ocorria uma reação quando o EEP era incorporado no meio MH sendo a CMI obtida para *L. innocua* de 0,23 mg/mL, ou seja, próximo do valor obtido por Casquete *et al.* (2016a). No entanto, por se observar esta reação entre o EEP e o MH, optou-se por realizar os ensaios em TSA. Através do método da gota e a pH 7, não houve inibição por EEP contra os mesmos microrganismos que não foram inibidos a pH 5 pelo mesmo método e também não ocorreu inibição dos microrganismos Gram-negativo *A. baumannii* S – 2 e *A. calcoaceticus* S e dos microrganismos Gram-positivo *B. stearothermophilus* e *Staph. aureus* 18N (MRSA). *B. cereus*, bactéria Gram-positivo, foi inibida pelo EEP com 0,47 – 2,5 mg/mL. Kim & Chung (2011) demonstraram que *B. cereus* foi inibido por propólis coreano com uma concentração de 0,036 mg/mL, bastante inferior à do presente estudo. *Staph. aureus* ATCC 29213 e *Staph. aureus* 2037 M1 (MSSA) foram inibidos pelo propólis na CMI de 5 mg/mL e 2,5 mg/mL, respetivamente, enquanto que *Staph. aureus* 18N (MRSA) não foi inibido. Para os microrganismos *L. monocytogenes* 7946 e 7947 os valores de CMI de propólis obtidos foram de 2,5 – 5 e 1,25 – 1,875 mg/mL, respetivamente. Segundo Kim e Chung (2011), o EEP coreano inibiu uma estirpe de *Staph. aureus* na CMI de 0,072 mg/mL e uma estirpe de *L. monocytogenes* na CMI de 0,14 mg/mL, sendo valores muito inferiores aos obtidos no presente estudo. No entanto, é de salientar que a origem dos propólis é diferente. As bactérias Gram-negativo *S. Typhimurium* e *E. coli* ATCC 25922 não foram inibidas pelo EEP, sendo que o mesmo foi demonstrado por Kim e Chung (2011).

Ao testar a atividade antimicrobiana de propólis contra os isolados de *Cl. sporogenes* e *Cl. perfringens* a pH 6 à temperatura de 37 °C, foi demonstrado que este composto apenas não inibiu o isolado *Cl. perfringens* 1.19. Ou seja, o pH ácido pode ajudar no efeito inibitório de propólis (Lu *et al.*, 2004). Por outro lado, à mesma temperatura e a pH 7, o propólis não inibiu nenhum isolado de *Clostridium* spp..

Através do método de incorporação do composto, nas condições do meio de pH 5 e pH 6, a concentração de propólis de 10 mg/mL (solução-mãe) permitiu inibir todos os microrganismos. A pH 7, na concentração de 10 mg/mL quase todos os microrganismos foram inibidos. Como se pode observar nas Tabelas 20 e 21, em Apêndice, através do método da gota, nas condições de pH do meio de 5 e 6, na concentração de 10 mg/mL todos os microrganismos Gram-positivo, os fungos e alguns microrganismos Gram-negativo foram inibidos. A pH 7, na concentração de 10 mg/mL, foi possível verificar a inibição dos fungos, a maioria dos Gram-positivo e alguns Gram-negativo.

Para vários microrganismos Gram-negativo, nas condições de pH 5, 6 e 7, o propólis não teve efeito inibitório através do método da gota, mas houve inibição pelo método de incorporação para os mesmos microrganismos. O etanol 95% (v/v) foi utilizado como controlo e não apresentou inibição contra a maioria dos microrganismos testados, sendo que apenas inibiu o microrganismo *K. pneumoniae* à temperatura de 12 °C a pH 6 (Tabela 21, em Apêndice). Ou seja, isto sugere que a inibição da maioria dos microrganismos deve-se ao propólis. Para alguns microrganismos, em certas condições de pH, o intervalo de CMI do etanol coincidiu com o CMI do propólis, em determinados valores.

Tal como é demonstrado na Tabela 21, em Apêndice, às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C, o propólis inibiu a maioria dos microrganismos Gram-positivo e inibiu os fungos nas condições em que estes crescem, não tendo havido inibição da maioria dos microrganismos Gram-negativo. Com a concentração máxima de 10 mg/mL de propólis inibiu-se todos os microrganismos, para os quais o propólis tem efeito inibitório, nas diferentes temperaturas testadas e nas condições de pH de 5, 6 e 7. Muitos dos microrganismos Gram-negativo não foram inibidos pelo propólis em nenhuma das condições testadas. Por outro lado, a maioria dos Gram-positivo foram inibidos em quase todas as condições.

Quando se testou a temperatura 20 °C e a pH 5, dos microrganismos Gram-positivo apenas *B. cereus* e *Staph. aureus* 18N (MRSA) não foram inibidos pelo propólis. Os isolados de *A. baumannii* e de *A. calcoaceticus* foram os únicos Gram-negativo inibidos por propólis e também o fungo *Sac. cerevisiae*. Nas mesmas condições de temperatura e a pH 6, todos os microrganismos Gram-positivo foram inibidos pelo propólis. Os Gram-negativo *Y. enterocolitica* (ESB) e, tal como a pH 5, *A. baumannii* S – 1, os isolados de *A. calcoaceticus* e ainda o fungo *Sac. cerevisiae* foram inibidos pelo antimicrobiano natural propólis. A pH 7 à temperatura de 20 °C, as bactérias Gram-positivo foram inibidas pelo propólis. Tal como a pH 5 e pH 6, *A. baumannii* S – 1, *A. calcoaceticus* S e *Sac. cerevisiae* foram inibidos. Com a temperatura de 20 °C e as condições do meio de pH 5, 6 e 7 foram necessários 10 mg/mL para inibir a maioria dos microrganismos.

Dos microrganismos que crescem a 12 °C e a pH 5, apenas os Gram-positivo *Ent. faecalis* ATCC 29212, *Ent. faecalis* DSMZ 12956, *Ent. faecium* DSMZ 13590, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* 7946 e 7947, *L. innocua* 2030c e os Gram-negativo *Y. enterocolitica* (ESB), *A. baumannii* S – 2 e *A. calcoaceticus* S foram inibidos. Nas mesmas condições de temperatura e a pH 6, dos microrganismos que crescem nestas condições de temperatura e pH, todas as bactérias Gram-positivo foram inibidas pelo propólis; *A. baumannii* R, *A. baumannii* S - 2, *A. calcoaceticus* R e *A. calcoaceticus* S, e assim como a levedura *Sac. cerevisiae*. O etanol teve efeito inibitório contra *K. pneumoniae*. Com as condições de temperatura de 12 °C e pH 7, todos os microrganismos Gram-positivo que crescem nestas condições foram inibidos pelo antimicrobiano propólis. Relativamente aos microrganismos Gram-negativo, apenas foram inibidos *A. baumannii* S - 2 e *A. calcoaceticus* R. *Sac. cerevisiae* também foi inibida pelo propólis, obtendo-se os mesmos valores de CMI que a pH 6. Com a temperatura de 12 °C foram necessários 10 mg/mL para inibir alguns dos microrganismos a pH 5 e a maioria dos microrganismos a pH 6 e a pH 7.

Nas condições de temperatura a 4 °C e pH 5, o propólis apenas inibiu *L. monocytogenes* 7947 e *A. calcoaceticus* S. Os microrganismos Gram-negativo *Ps. aeruginosa* e as estirpes de *Y. enterocolitica* não foram inibidos e os restantes microrganismos não crescem nestas condições. A 4 °C mas a pH 6, os microrganismos inibidos por propólis foram as bactérias Gram-positivo *Ent. faecium* DSMZ 13590, *L. monocytogenes* 7946 e, tal como a pH 5, *L. monocytogenes* 7947. Também foi inibido o Gram-negativo *A. calcoaceticus* R. Os microrganismos Gram-negativo *Ps. aeruginosa* e as estirpes de *Y. enterocolitica* não foram inibidos pelo propólis, tal como a pH 5, e também a bactéria *A. calcoaceticus* S. A 4 °C e a pH 7, apenas não foram inibidos pelo propólis os 3 microrganismos que não foram inibidos a 4 °C e a pH 5. Nas condições de temperatura de 4 °C e pH 5, com a concentração de 10

mg/mL de propólis foi possível inibir dois microrganismos (*L. monocytogenes* 7947 e *A. calcoaceticus* S). Por outro lado, a 4 °C e a pH6, a concentração de 5 mg/mL permitiu inibir alguns dos microrganismos. A 4 °C e a pH7, 10 mg/mL de propólis inibiu a maioria dos microrganismos.

Comparando os valores de CMI obtidos para os vários microrganismos às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C, foi possível verificar que não existe nenhum padrão de comparação para todos os microrganismos para as diferentes temperaturas. No entanto, para alguns microrganismos que pertencem ao mesmo género, os valores de CMI obtidos às mesmas temperaturas e nas mesmas condições de pH são próximos. O mesmo acontece para microrganismos da mesma espécie. Para vários microrganismos, os valores de CMI alteram-se com a alteração do pH. No entanto, existem casos em que os valores são próximos.

Portanto, observando as Tabelas 20 e 21, em Apêndice, foi possível verificar que o propólis consegue inibir bactérias Gram-positivo e Gram-negativo e fungos. No entanto, apenas foi possível inibir alguns dos Gram-negativo testados, pois a maioria não foi inibida por este antimicrobiano através da metodologia da difusão da gota. Ou seja, o propólis tem fraca atividade contra bactérias Gram-negativo, sendo que as Gram-positivo são mais sensíveis, tal como foi demonstrado por Silici *et al.* (2007) e Kim & Chung (2011). Poder-se-ia testar concentrações superiores de propólis contra os Gram-negativo que não foram inibidos. Também foi possível perceber que os resultados obtidos pelo método da incorporação são bastante diferentes do método da gota, pois quase todos os microrganismos Gram-negativo foram inibidos através do método de incorporação do composto, não acontecendo isso através da difusão da gota em agar. Para a maioria dos microrganismos os valores de CMI foram inferiores no método de incorporação comparativamente ao de difusão. A inibição pelo propólis foi influenciada pela temperatura e pelo pH. A atividade antimicrobiana e antifúngica de propólis é influenciada pela origem do produto, pela composição química, pela dose, pelo solvente de extração ou preparação (Vargas-Sánchez *et al.*, 2013) e pela provável presença de componentes não voláteis do extrato (Kim & Chung, 2011). Silici *et al.* (2007) demonstrou que são pequenas as diferenças entre amostras de propólis diferentes na atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivo.

3.2.3. Atividade antimicrobiana da nisina

A nisina inibiu a maioria dos microrganismos Gram-positivo na concentração de 25 µg/mL, tanto pelo método de incorporação como pelo método da difusão da gota em agar a 37 °C, nas diferentes condições de pH (Tabela 22 em Apêndice).

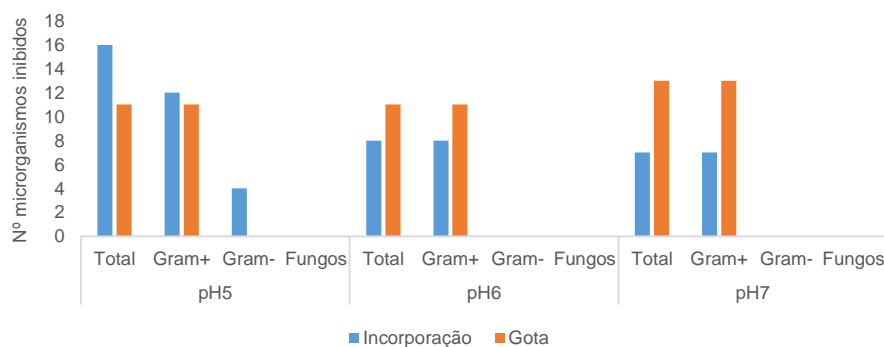
Na Figura 5a e 5b é possível observar o número de microrganismos inibidos pela nisina através dos métodos de incorporação e de gota com o pH do meio de 5, 6 e 7 e através de incubação às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C com diferentes condições de pH do meio, respetivamente. Na Tabela 4 estão indicados os microrganismos que foram inibidos pela nisina através dos métodos de incorporação e da gota, com o meio a pH 5, 6 e 7 e à temperatura de 37 °C.

Ocorreu a inibição de quatro estirpes de *Acinetobacter* a pH 5 através da técnica de incorporação do composto. Zheng *et al.* (2013) demonstraram a inibição de uma espécie de *A. calcoaceticus* por nisina a 37 °C, embora a técnica aplicada tenha sido a difusão de disco em agar.

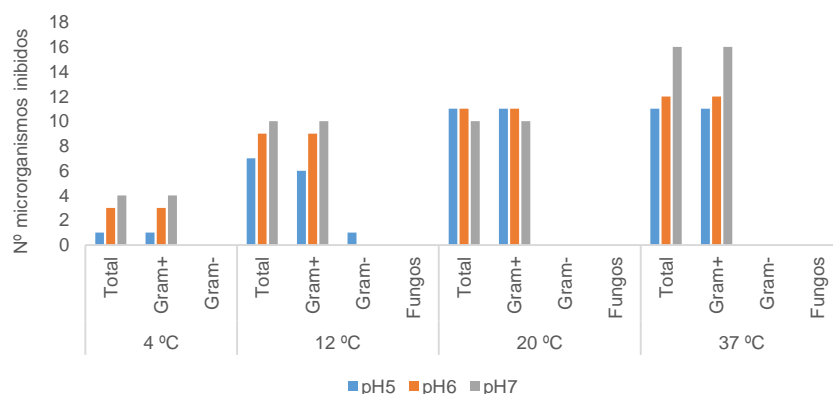
A pH 5 e no método de incorporação, apenas os Gram-positivo *Ent. faecalis* ATCC 29212, *Staph. aureus* 18N (MRSA) e *Staph. aureus* ATCC 29213 não foram inibidos pela nisina. Os fungos também não foram inibidos pela nisina. Os Gram-negativo *A. baumannii* R, *A. baumannii* S – 1, *A. calcoaceticus* R e *A. calcoaceticus* S foram inibidos pela bacteriocina.

Nas mesmas condições de pH, mas através do método da gota, de todos os Gram-positivo, apenas *Staph. aureus* 2037 M1 e aqueles que não foram inibidos através de incorporação, não foram inibidos por este método. Nestas condições, também nenhum dos fungos foi inibido.

Através de incorporação da nisina e com o meio a pH 6, apenas bactérias Gram-positivo foram inibidas, exceto *Ent. faecalis* ATCC 29212, *Bacillus* spp., *Staph. aureus* ATCC 29213, *Staph. aureus* 18N (MRSA) e *L. innocua* 2030c. A pH 6 e através do método da gota, também só foram inibidas bactérias Gram-positivo, com exceção de *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *Staph. aureus* ATCC 29213 e *Staph. aureus* 18N (MRSA).



(a)



(b)

Figura 5. Número de microrganismos (Total, Gram-positivo, Gram-negativo e Fungos) inibidos pela nisina: (a) através dos métodos de incorporação e gota nas condições de pH de 5, 6 e 7; (b) às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e com o pH do meio de 5, 6 e 7.

A pH neutro e no método de incorporação, a nisina apenas inibiu as bactérias Gram-positivo *Ent. faecalis* DSMZ 12956, *Ent. faecium* DSMZ 13590, *Ent. flavescens* DSMZ 7370, *Ent. gallinarum* DSMZ 20628, *Ent. casseliflavus* DSMZ 20680, *Staph. aureus* 2037 M1 (MSSA) e *L. monocytogenes* 7947.

Nas mesmas condições de pH, mas através da técnica de difusão da gota em agar a maioria das bactérias Gram-positivo foram inibidas, não havendo a inibição de Gram-negativo, nem de fungos. Os únicos Gram-positivo que não foram inibidos pela nisina foram *B. stearothermophilus* e *Staph. aureus* ATCC 29213.

Ao testar a atividade antimicrobiana da nisina contra os vários *Clostridium* spp., verificou-se que à temperatura de 37 °C e a pH 6, apenas *Cl. perfringens* 1.19 foi inibido. Por outro lado, à temperatura de 37 °C e a pH 7, todas as estirpes de *Cl. perfringens* foram inibidas.

Tabela 4. Microrganismos inibidos pela nisina através dos métodos de incorporação e da gota e com o pH do meio de 5, 6 e 7

Microrganismos inibidos						
	pH5		pH6		pH7	
	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota
Gram-positivo	<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212	<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212
	<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956
	<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590
	<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370
	<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628
	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Staph. aureus</i> 2037 M1	<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	<i>Staph. aureus</i> 2037 M1	<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. stearothermophilus</i> 7946	<i>B. subtilis</i> 2037 M1	<i>L. stearothermophilus</i> 7947	<i>B. subtilis</i> 2037 M1
	<i>B. stearothermophilus</i> 2037 M1	<i>B. stearothermophilus</i> 7946	<i>L. monocytogenes</i> 7947	<i>L. stearothermophilus</i> 2037 M1	<i>L. monocytogenes</i> 7947	<i>L. stearothermophilus</i> 18N
	<i>Staph. aureus</i> 2037 M1	<i>L. monocytogenes</i> 7947	<i>L. monocytogenes</i> 7947	<i>L. monocytogenes</i> 7947	<i>Staph. aureus</i> 2037 M1	<i>Staph. aureus</i> 2037 M1
	<i>L. monocytogenes</i> 7946	<i>L. innocua</i> 2030c		<i>L. monocytogenes</i> 7947	<i>L. monocytogenes</i> 7946	<i>L. monocytogenes</i> 7946
	<i>L. monocytogenes</i> 7947			<i>L. monocytogenes</i> 7947	<i>L. monocytogenes</i> 7947	<i>L. monocytogenes</i> 7947
	<i>L. innocua</i> 2030c			<i>L. innocua</i> 2030c	<i>L. innocua</i> 2030c	<i>L. innocua</i> 2030c
Gram-negativo	<i>A. baumannii</i> R	-	-	-	-	-
	<i>A. baumannii</i> S - 1					
	<i>A. calcoaceticus</i> R					
	<i>A. calcoaceticus</i> S					

- = Sem inibição de microrganismos.

Através do método de incorporação e com as condições do meio de pH 5 e 6, com a concentração de nisina de 25 µg/mL inibiu-se a maioria dos microrganismos Gram-positivo. Por outro lado, com o meio a pH 7 e com a mesma concentração inibiu-se alguns dos microrganismos Gram-positivo. A bacteriocina nisina inibiu um maior número de microrganismos a pH mais ácido através do método de incorporação. Através do método da gota, com o meio a pH 5, 6 e 7, a adição de 25 µg/mL de nisina permitiu inibir a maioria das bactérias Gram-positivo. A atividade antimicrobiana da bacteriocina é fortemente influenciada pelo pH da solução de nisina (Khan *et al.*, 2014). A maior atividade é exibida em pH ácido (2 a 3), seguido da perda drástica de atividade a um pH mais elevado (Rollema *et al.*, 1995). Como através do método de incorporação, o composto foi incorporado no meio, o contacto direto com uma solução ácida permitiu uma maior inibição de um maior número de microrganismos a pH 5 do que a pH 6 e 7. No método da difusão da gota, o mesmo não acontece, sendo similar o número de microrganismos inibido a diferentes valores de pH. Além disso, quatro bactérias Gram-negativo foram inibidas pela nisina através do método de incorporação, o que não aconteceu através do método da gota. Portanto, demonstrou-se, mais uma vez, que existem diferenças nas CMI obtidas por métodos diferentes.

Tal como é demonstrado na Tabela 23, em Apêndice, às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C, e através do método da difusão da gota em agar, a nisina inibiu a maioria dos microrganismos Gram-positivo e de uma estirpe de *Acinetobacter*, nas condições de pH e temperatura em que ocorre o seu crescimento. Contudo, não houve inibição dos restantes microrganismos Gram-negativo e dos fungos. Com a concentração máxima de 25 µg/mL de nisina inibiu-se todos os microrganismos, para os quais a nisina tem efeito antimicrobiano, nas diferentes temperaturas testadas e nas condições de pH de 5, 6 e 7. As estirpes de *Cl. sporogenes* não foram inibidas pela nisina nas condições testadas. No entanto, para a maioria dos microrganismos Gram-positivo houve inibição pela bacteriocina em quase todas as condições. Comparando os valores de CMI obtidos para os vários microrganismos às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C, foi possível verificar que não existe nenhum padrão de comparação para todos os microrganismos para as diferentes temperaturas. Para alguns microrganismos que pertencem ao mesmo género, os valores de CMI obtidos às mesmas temperaturas e nas mesmas condições de pH foram próximos. O mesmo acontece para microrganismos da mesma espécie. A atividade antimicrobiana da nisina contra alguns microrganismos aumentou com a diminuição do pH às várias temperaturas. Para outros microrganismos a CMI obtida foi próxima nas diferentes condições de pH.

Nas condições de temperatura de 20 °C e nas condições de pH 5 e 6, de todos os Gram-positivo testados, só *Staph. aureus* 18N e *Staph. aureus* 2037 M1 é que não foram inibidos pela nisina. Nas mesmas condições de temperatura, mas a pH 7, os únicos microrganismos Gram-positivo que não foram inibidos pela nisina foram os mesmos não inibidos a pH 5 e 6, e também *B. cereus* e *Staph. aureus* ATCC 29213. Com a concentração de 25 µg/mL inibiu-se a maioria dos microrganismos que crescem a 20 °C a pH 5 e 6. Na condição de temperatura de 20 °C, mas a pH neutro, utilizando a concentração de 12,5 µg/mL inibiu-se a maioria dos Gram-positivo testados.

À temperatura de 12 °C e o meio a pH 5, dos microrganismos Gram-positivo que têm crescimento nestas condições, apenas não foram inibidos pela nisina os microrganismos *Ent. flavescens* DSMZ 7370, *Ent. gallinarum* DSMZ 20628, *Ent. casseliflavus* DSMZ 20680 e *B. subtilis*. Nestas condições, a bactéria Gram-negativo *A. calcoaceticus* S foi inibida, que, por curiosidade é uma estirpe sensível a vários antibióticos. Nas mesmas condições de temperatura, com o meio a pH 6, das bactérias Gram-positivo que crescem, só não foram inibidas pela nisina as bactérias *B. cereus*, *B. subtilis* e *Staph. aureus* 2037 M1. A 12 °C e com o pH do meio neutro, de todas as Gram-positivo testadas, só não foram inibidas pela bacteriocina as bactérias *B. cereus* e *Staph. aureus* 2037 M1, tal como a pH 6, e *Staph. aureus* 18N. O microrganismo *Ent. faecalis* DSMZ 12956 foi inibido com uma concentração de nisina menor que 1,563 µg/mL. Na temperatura de 12 °C e a pH 5, com a concentração de 25 µg/mL foi possível inibir a maioria dos microrganismos Gram-positivo que têm crescimento nestas condições e ainda um microrganismo Gram-negativo. Na condição de 12 °C e de pH 6, com 12,5 µg/mL de nisina foi possível inibir a maioria dos microrganismos Gram-positivo. A esta mesma temperatura, mas a pH 7, a concentração de 25 µg/mL permitiu inibir a maioria das bactérias Gram-positivo.

Nas condições de temperatura de 4 °C e o meio a pH 5, a única bactéria Gram-positivo que cresceu nestas condições – *L. monocytogenes* 7947 – foi inibida pela nisina. Nas mesmas condições de temperatura, mas a pH 6, os microrganismos Gram-positivo com crescimento (*Ent. faecium* DSMZ

13590, *L. monocytogenes* 7946 e 7947), foram inibidos pela bacteriocina. A 4 °C e a pH 7, foram inibidos os mesmos microrganismos que a pH 5 e 6 e, ainda, *L. innocua* 2030c. Nestas condições, *Ent. faecium* foi inibido pela nisina a uma concentração bastante baixa, <1,563 µg/mL, comparativamente com os restantes microrganismos e comparativamente com o limite máximo permitido na legislação, 12,5 µg/mL. Nas condições de temperatura de 4 °C e o meio a pH 5, 6 e 7, com uma concentração de 12,5 µg/mL os microrganismos Gram-positivo testados, e que são capazes de crescer nestas condições foram inibidos.

Portanto, observando as Tabelas 22 e 23, em Apêndice, foi possível verificar que a nisina inibiu microrganismos Gram-positivo e em algumas condições, certas estirpes Gram-negativo. Segundo bibliografia, a nisina apenas inibe Gram-positivo, sendo que os microrganismos Gram-negativo apresentam uma natural resistência à bacteriocina (Prudêncio *et al.*, 2015a; Prudêncio *et al.*, 2015b; Sahl *et al.*, 1995). O mesmo não aconteceu no presente estudo em que ocorreu a inibição de bactérias Gram-negativo. A condição comum entre os microrganismos Gram-negativo que foram inibidos foi o meio a pH 5, ou seja, ácido. Isto pode ter tido como consequência a sensibilização das estirpes de *Acinetobacter* e, daí a nisina ter tido um efeito antimicrobiano, pois os valores de temperatura e pH podem alterar a atividade da bacteriocina e/ou a permeabilidade da membrana externa (Prudêncio *et al.*, 2015a). A exposição de bactérias Gram-negativo, tais como *E. coli* ou *S. Typhimurium*, a condições de baixa temperatura e baixo pH favorece a produção de um envelope celular que é mais suscetível à ação de bacteriocinas, permitindo a ação da nisina, em condições de exposição prolongada (Elliason & Tatini, 1999; Ganzle *et al.*, 1999). No entanto, caso se pretendesse inibir mais bactérias Gram-negativo, poder-se-ia combinar a nisina com agentes quelantes, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), apesar de ser uma estratégia ainda não usada comercialmente (Galvão *et al.*, 2015; Prudêncio *et al.*, 2015a). O agente quelante atua promovendo a destabilização da membrana externa, em parte através da libertação da camada LPS, permitindo que a bacteriocina aceda à membrana plasmática (Alakomi *et al.*, 2003). De um modo geral, é necessária uma baixa concentração de EDTA para sensibilizar os microrganismos Gram-negativo às bacteriocinas. No estudo de Prudêncio *et al.* (2015a) foi demonstrado que com 1,5 mM de EDTA *S. Typhimurium* se tornou suscetível à nisina. No entanto, para a aplicação num alimento, possivelmente serão necessárias maiores quantidades de EDTA e da bacteriocina, devido à ligação do quelante a catiões divalentes exógenos e de interações não específicas da nisina com componentes alimentares (Prudêncio *et al.*, 2015a). Também se poderia fazer combinações de nisina com quitosano (Anacarso *et al.*, 2011) ou com óleos essenciais (Govaris *et al.*, 2009), de modo a tornar suscetíveis estas bactérias. A CMI da nisina contra vários microrganismos foi diferente em diferentes condições, sendo influenciada pelo pH e pela temperatura. A resposta bacteriana às mudanças de temperatura e pH incluem modificações na composição dos ácidos gordos da membrana citoplasmática. Estas mudanças também podem estar relacionadas com diferenças na suscetibilidade dos microrganismos-alvo às bacteriocinas visto que alterações na fluidez da membrana citoplasmática podem modificar o processo de acoplamento/inserção da nisina (Prudêncio *et al.*, 2015a; Chihib *et al.*, 1999; Crandall & Montville, 1998). Os microrganismos *Staph. aureus* 18N e *Staph. aureus* 2037 M1 apenas foram inibidos à temperatura de 37 °C e com o valor de pH 7 e com os valores de pH de 6 e 7,

respetivamente, e à temperatura de 12 °C, *B. cereus* não foi inibido pela nisina, sendo apenas inibido a 20 e 37 °C, em certas condições de pH. A atividade bactericida de bacteriocinas, por outro lado, é favorecida em condições ideais para o crescimento, como, por exemplo, temperatura e valores de pH ótimos (Prudêncio *et al.*, 2015a; Delves-Broughton, 1993; Delves-Broughton *et al.*, 1996). Segundo Prudêncio *et al.* (2015a), ocorreu uma elevada redução do número de *S. Typhimurium* em condições de temperatura próxima de 35 °C e valores de pH próximos da neutralidade. Sob as condições de valores de pH próximos de 7, os fatores ambientais favorecem a formação de uma camada de LPS que é mais permeável e permite a ação da nisina (Prudêncio *et al.*, 2015a). Microrganismos Gram-positivo formadores de esporos, como *Bacillus* e *Clostridium* são particularmente sensíveis à nisina, sendo que os esporos são mais sensíveis do que as células vegetativas (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Russell & Gould, 2012). Além destes microrganismos, a nisina atua contra *L. monocytogenes* (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Solomakos *et al.*, 2008). Esta bactéria tem a capacidade de crescer a baixas temperaturas e pode causar doenças graves, muitas vezes fatais, em crianças, idosos, grávidas, doentes e imunocomprometidos (Batt, 2014; Delves-Broughton *et al.*, 1996) e, por isso, é importante eliminá-la. A bacteriocina também demonstra atividade antimicrobiana contra bactérias do ácido lático. Por outro lado, as leveduras são insensíveis à nisina. Por este motivo, a nisina pode ser aplicada juntamente com leveduras em fermentações para controlar o crescimento de bactérias do ácido lático (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

3.2.4. Atividade antimicrobiana do nitrito de sódio, individualmente e em combinação com cloreto de sódio

3.2.4.1. Atividade antimicrobiana do nitrito de sódio

Foi demonstrado que o nitrito de sódio não inibiu a maioria dos microrganismos testados pelo método de incorporação e não houve inibição de nenhum microrganismo pelo método da difusão da gota, nas diferentes condições de pH (dados não apresentados).

Através da metodologia de incorporação do nitrito e com o meio a pH 5, ocorreu a inibição da estirpe *Y. enterocolitica* (ESB) e das estirpes *A. baumannii* R, *A. baumannii* S – 1, *A. baumannii* S – 2, *A. calcoaceticus* R e *A. calcoaceticus* S. Portanto, com diferentes métodos resultados diferentes foram obtidos nas condições de pH ácido. Isto pode ter acontecido devido ao facto do nitrito ter uma melhor atividade antimicrobiana a pH mais baixo e, quando incorporado no meio, ocorrer mais facilmente a reação que dá origem ao ácido nitroso, permitindo a sua entrada na célula bacteriana (Campden BRI, 2010). A bactéria *Y. enterocolitica* (ESB) foi inibida com uma concentração de 200 µg/mL e as estirpes de *Acinetobacter* foram inibidas com uma concentração de 175 µg/mL de nitrito. No entanto, estas concentrações estão acima do valor permitido pela legislação, que é 150 µg/mL (EFSA, 2011).

Nas condições de temperatura de 4, 12, 20 e 37 °C, através do método da difusão da gota em agar, o nitrito de sódio não inibiu nenhum dos microrganismos (dados não apresentados). Ou seja, as diferentes temperaturas não influenciaram a atividade do nitrito. Estudos indicam que o nitrito de sódio tem atividade contra *Listeria* (Ryser & Marth, 1999), ao contrário do que se verificou no presente estudo. O comportamento da bactéria *L. monocytogenes* em alimentos, e em meios de cultura, depende de efeitos de interação de temperatura, pH, tipo de acidificante, teor em sal,

atividade de água e tipos e concentrações de aditivos alimentares que podem estar presentes no sistema (Ryser & Marth, 1999). A eficácia do nitrito de sódio como um agente anti-*Listeria* também é fortemente influenciada pelos mesmos fatores (Ryser & Marth, 1999). O estudo de McClure *et al.* (1991) demonstrou que a atividade do nitrito contra *Listeria* dependeu fortemente do pH: a pH ≥ 6 , 400 $\mu\text{g/mL}$ de nitrito teve pouca atividade contra *Listeria*, no entanto, a pH abaixo de 6, apenas 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentou atividade anti-*Listeria*. O crescimento visível deste patogênico a 20 °C foi prevenido com 50 $\mu\text{g/mL}$ de nitrito de sódio e pH $\leq 5,3$. No entanto, isso não se verificou no presente estudo. O nitrito é principalmente indicado como agente antibotulinum, embora, no presente trabalho, não tenha havido inibição de nenhuma das estirpes de *Cl. sporogenes*, um substituto do *Cl. botulinum* em testes *in vitro*.

3.2.4.2. Atividade antimicrobiana do nitrito de sódio com cloreto de sódio

No processo de cura da carne, ocorre a adição de sal (NaCl) e de nitrito. A presença de sal coloca as células sobre *stress* e os íons Na^+ precisam de ser exportados, o que requer energia. O nitrito forma óxido nítrico que perturba o sistema ferredoxina em *Clostridium* (Woods *et al.*, 1981), que é o sistema anaeróbio equivalente ao citocromo em aeróbios, ou seja, essencial para a produção de energia (Komitopoulou & Gibbs, 2012). Portanto, o NaCl e o nitrito agem sinergicamente para inibir o crescimento de *Cl. botulinum*. Woods *et al.* (1981) demonstrou que ocorria a diminuição da atividade da ferredoxina em células incubadas com nitrito. Como o nitrito funciona em conjunto com o sal, testou-se a atividade antimicrobiana da combinação de nitrito de sódio com cloreto de sódio contra vários microrganismos.

Na comparação dos valores de CMI obtidos pelos dois métodos, apenas se realizou a experiência com as estirpes de *Bacillus* e de *Listeria*. Foi demonstrado que a combinação de 150 $\mu\text{g/mL}$ de nitrito de sódio com 2000 $\mu\text{g/mL}$ de cloreto de sódio inibiu apenas os microrganismos *B. cereus* e *B. stearothermophilus* a pH 5 através do método de incorporação, não havendo inibição de mais nenhum microrganismo com esta combinação (dados não demonstrados). Mais uma vez se demonstrou que o nitrito de sódio teve atividade antimicrobiana em pH ácido e através do método de incorporação.

Nas condições de temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C, através do método da difusão da gota em agar, o nitrito de sódio, em combinação com cloreto de sódio, não inibiu nenhum dos 38 microrganismos testados. Ou seja, as diferentes temperaturas não induziram o efeito sinérgico do nitrito de sódio com o sal. Segundo Komitopoulou & Gibbs (2012), antioxidantes, como o eritorbato, aumentam a atividade do nitrito. Foi demonstrado que houve atividade antimicrobiana por parte do nitrito contra *L. monocytogenes* utilizando diferentes condições de temperatura, pH e diferentes concentrações de cloreto de sódio, em que se realizou a experiência em meio *Tryptose Phosphate Broth* (TPB) (Ryser & Marth, 1999), que é um meio diferente do que é utilizado no presente estudo. O meio TPB tem na sua constituição um antioxidante, o fosfato dissódico, ao contrário do meio TSA que não contém antioxidantes (Sigma-Aldrich, 2016). Para simular o que acontece num alimento, dever-se-ia adicionar um antioxidante, como o eritorbato de sódio ou o ascorbato, de modo a perceber se este influencia a ação do nitrito de sódio (EFSA, 2003; Komitopoulou & Gibbs, 2012).

4. Conclusões

Com o presente estudo foi possível demonstrar que o quitosano, o propólis e a nisina têm atividade antimicrobiana a diferentes condições de pH e temperatura.

O quitosano inibiu os microrganismos Gram-negativo e fungos testados e a maioria dos Gram-positivo, com exceção das estirpes de *Cl. sporogenes* e das estirpes *Cl. perfringens* 1.16 e 1.22. Com a concentração de 0,65% (m/v) de quitosano inibiu-se a maioria dos microrganismos testados às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e nas condições de pH 5, 6 e 7.

O extrato etanólico de propólis inibiu os fungos e a maioria dos Gram-positivo, com exceção de *Cl. perfringens* 1.19. No entanto, apenas inibiu alguns Gram-negativo. Com a concentração de 10 mg/mL de propólis foram inibidos os fungos, a maioria dos microrganismos Gram-positivo e alguns dos Gram-negativo, nas diferentes temperaturas testadas e nas condições de pH 5, 6 e 7.

A nisina inibiu a maioria dos Gram-positivo, com exceção de *Staph. aureus* ATCC 29213 e das estirpes de *Cl. sporogenes*. Também houve inibição de bactérias Gram-negativo (estirpes de *Acinetobacter*) quando se aplicou o método de incorporação. Com a concentração de 25 µg/mL de nisina foi possível inibir a maioria dos microrganismos Gram-positivo testados, nas várias condições de temperatura e pH. Portanto, estes antimicrobianos tiveram um melhor efeito inibitório contra bactérias Gram-positivo.

Também foi possível demonstrar que o nitrito de sódio, individualmente ou em combinação com cloreto de sódio, não inibiu a maioria dos microrganismos. Na atividade antimicrobiana do nitrito de sódio houve influência do pH, pois foi em condições acídicas que este composto inibiu alguns microrganismos.

No presente trabalho foi ainda possível perceber que a concentração mínima inibitória dos compostos contra vários microrganismos foi diferente nas duas metodologias usadas: diluição em agar e difusão da gota em agar. A interpretação dos resultados obtidos no método da difusão de agar é baseada na suposição de que o composto se difunde livremente no composto sólido, mas, em muitos casos, isso pode não acontecer, dando origem a erros (Bonev *et al.*, 2008).

CAPÍTULO 2

Melhoria da qualidade microbiológica do chouriço corrente

1. Introdução

1.1. Apresentação da empresa

O trabalho de estágio foi desenvolvido na empresa Primor Charcutaria-Prima, S.A. A Primor, fundada em 1961 por Joaquim Moreira Pinto e Ana Amélia, está situada em Gavião, na cidade de Vila Nova de Famalicão e é uma empresa de charcutaria que produz enchidos, bacon e outros produtos fumados, bem como, fiambres de suínos e aves. A empresa pertence ao Grupo Joaquim Moreira Pinto, holding gestora de empresas nos setores-chave da indústria alimentar, com unidades de produção em Portugal, Espanha e Angola. O Grupo conta com mais de 700 colaboradores e ocupa um lugar cimeiro entre as maiores empresas do setor em Portugal. A Primor foi a primeira marca de charcutaria nacional a lançar não só os produtos mais inovadores, como o Fiambre da Perna

enriquecido com ómega 3, o Perú com baixo teor de sal e gordura e o fiambre especial fibras com efeito bifidogénico, como também os formatos mais convenientes, dos quais se destacam os produtos frescos prontos a cozinhar Brudy e os Levíssimos – produto do ano em 2008 -, cuja inovadora embalagem dupla, com sistema abre e fecha e abertura fácil, foi reconhecida com o Prémio Nacional de Embalagem (Primor Charcutaria-Prima).

1.2. Enquadramento

Um dos pontos críticos do processo produtivo da Primor é o desenvolvimento de bactérias do ácido láctico num dos produtos de charcutaria, o chouriço corrente. Isto traduz-se em diversas alterações sensoriais e visuais do produto: i) a produção de ácido láctico torna o produto acidificado, alterando o seu sabor; ii) a produção de CO₂ torna a embalagem do produto opada/inchada e iii) o crescimento de bactérias na sua superfície também resulta em alterações visuais do chouriço. Além de tornar o produto não conforme para consumo, pode ocorrer a perda da sua comercialização, e, como consequência, perdas económicas para a empresa.

As bactérias do ácido láctico são capazes de crescer sob diversas condições, como na presença de sal e nitritos e a adição de hidratos de carbono fermentáveis resulta num meio nutritivo favorável (Egan, 1983; Dodds & Collins-Thompson, 1984). As bactérias do ácido láctico estão associadas com a carne fresca e também com produtos cárneos cozidos (Pothakos *et al.*, 2015), como é o caso do chouriço corrente. O facto de não ocorrer a eliminação das bactérias do ácido láctico e/ou ocorrer o seu desenvolvimento/crescimento ao longo do processo de produção de chouriço pode dever-se a várias causas, como a incorreta higienização dos equipamentos (OMAFRA, 2016), o incumprimento de Boas Práticas de Fabrico (FDA, 2014b), a aplicação de um tratamento térmico insuficiente – devido à sua elevada resistência ao calor (Giraffa, 2002) - ou a utilização de uma temperatura de armazenamento inadequada (FDA, 2014b).

1.3. O Chouriço corrente

Segundo a Norma NP 589:2008, o chouriço de carne é um enchido fumado, e/ou curado, de calibre estreito e formato variável, constituído por carne de suíno e gordura rija de suíno, em fragmentos macroscopicamente visíveis, adicionados de condimentos, aditivos e/ou outros ingredientes facultativos. Estão excluídos na presente definição, os enchidos que resultem de processos tecnológicos de conservação baseados na diminuição do valor do pH. O chouriço de carne pode ser classificado em chouriço de carne tradicional, chouriço de carne extra e chouriço de carne corrente. Os ingredientes essenciais são a carne de suíno e a gordura rija de suíno. Ingredientes facultativos são os couratos (permitido apenas para o chouriço de carne corrente), água, pimentão, alho, vinho, sangue e/ou hemoglobina (em quantidade estritamente necessária para reforçar a cor), sal, açúcar e/ou dextrose, especiarias, aromas (permitido apenas para o chouriço de carne corrente e para o chouriço de carne extra), fumo líquido (permitido apenas para o chouriço de carne corrente e para o chouriço de carne extra) e proteínas de origem animal e/ou vegetal (permitido apenas para o chouriço de carne corrente). No chouriço de carne corrente são permitidas tripas naturais ou semissintéticas provenientes de fibras animais reconstituídas. Este chouriço tem forma curva ou retilínea

individualizada por torção ou dupla clipsagem, com calibre compreendido entre 25 mm e 40 mm e até 50 cm em comprimento linear. O chouriço corrente tem aspeto avermelhado e brilhante denotando uma coloração e cheiro resultantes do processo de fumagem. Deve ter ainda consistência firme, invólucro sem roturas e bem aderente à massa. Após corte oblíquo, a massa é perfeitamente ligada, de aspeto marmoreado, com distribuição regular dos pedaços de carne e gordura, de cor avermelhada e branca, com cheiro e sabor característicos. O teor em proteína total deve ser, no mínimo, de 16%; a quantidade de gordura livre e de colagénio devem ser três vezes e 30% inferior, respetivamente, ao teor em proteína total e a humidade do produto desengordurado deve ser inferior a 65%. O chouriço de carne pode ser acondicionado e fechado em material plástico, próprio para produtos alimentares, sob vácuo, ou envolvido em atmosfera protetora, ou também pode ser acondicionado em recipiente metálico estanque, revestido interiormente com verniz apropriado, podendo utilizar-se como excipiente, azeite, banha ou qualquer óleo alimentar, facultativamente adicionado de especiarias e ervas aromáticas (NP 589:2008).

1.3.1. O chouriço corrente da Primor

Também chamado de chouriço de colorau, este chouriço é um enchido fumado constituído basicamente por carne e gorduras rijas de porco, em fragmentos, adicionadas de condimentos e aditivos. Tem na sua constituição água, pimentão, antioxidantes, sal, dextrose, fibra vegetal, emulsionante, especiarias e conservante (nitrito de sódio). O chouriço apresenta uma cor avermelhada devido à adição do colorau (pimentão doce) e da proteína hemoglobina. O chouriço produzido na Primor é curado, cozido e fumado, no entanto, não é fermentado. Muitos dos produtos de charcutaria, como o chouriço, são fumados para adicionar sabor (Predika, 1983). O chouriço é embalado em filme plástico termosoldado com atmosfera protetora. O chouriço chega ao consumidor pronto a ser consumido, no entanto, também pode ser cozinhado. A validade total é de 180 dias e as condições de armazenamento são em local fresco e seco.

1.4. Produção de chouriço corrente

O processo de produção do chouriço corrente é constituído por diferentes etapas, abaixo descritas. Na Figura 6 estão apresentadas as etapas principais.

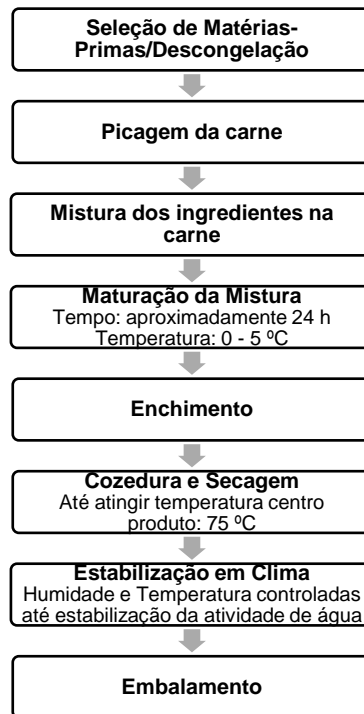


Figura 6. Principais etapas do processo de produção do chouriço corrente da Primor.

1.4.1. Receção de Matéria-Prima

A etapa de receção de matéria-prima inclui a inspeção da matéria-prima acabada de chegar. Nesta etapa é necessário assegurar que o tempo de quebra da cadeia de frio seja minimizado. Efetua-se a inserção da quantidade de matéria-prima em *stock*, através do software de gestão da empresa, e é encaminhada para a respetiva câmara de armazenagem (suíno ou aves) ou descongelação (matéria-prima congelada). Especificamente, para a produção do chouriço corrente, apenas se receciona carnes de suíno.

1.4.2. Armazenamento de Matéria-Prima

Na etapa de armazenamento de matéria-prima, a carne fresca é colocada em câmaras de refrigeração (0 – 5 °C) no sentido de limitar o crescimento microbiano. No caso da carne congelada, esta é armazenada em câmaras de congelação, de forma a manter uma temperatura menor ou igual a -18 °C. Em ambos os casos, as temperaturas estabelecidas estão de acordo com os requisitos exigidos pela legislação. Por inspeção visual, e através de *software* informático, a temperatura de todas as câmaras é monitorizada em contínuo.

1.4.3. Descongelação

A descongelação dos géneros alimentícios deve ser efetuada de forma a minimizar o risco de desenvolvimento de microrganismos patogénicos ou a formação de toxinas nos alimentos. O produto é colocado numa câmara específica para descongelação que possui um processo de monitorização para tempo e temperatura.

1.4.4. Picagem

Na etapa de picagem o produto é sujeito a um processo de picagem em pequenos pedaços, sendo que o calibre final dos pedaços varia de acordo com o produto final. Esta fase tem em conta a formulação do produto, sendo utilizadas as quantidades/tipos de matérias-primas pré-definidos em fórmula e a temperaturas controladas.

1.4.5. Mistura/ Maturação

Com o objetivo de estabilizar a massa da carne, e após se adicionarem os ingredientes que foram misturados em batedeira, a mistura fica em canastreiros durante um período de tempo pré-estabelecido, dependente do produto final. O processo de maturação inicia-se quando se adicionam os sais de cura, entre os quais o nitrito de sódio. Os sais de cura são necessários para eliminar eventuais organismos, como *Trichinella*, que se podem instalar no músculo da carne e também como *Clostridium botulinum* (Sonnenschmidt, 2009). A maioria dos restantes ingredientes adicionados vai permitir que a massa do chouriço fique mais avermelhada. Para a produção do chouriço corrente, a maturação decorre de um dia para o dia seguinte.

1.4.6. Enchimento

Após todas as fases de preparação da carne, esta é introduzida em tripa (nesse caso, uma tripa porosa) através do equipamento de enchimento. Após enchimento, o produto é colocado em ferros e, desta forma, pendurado em carros que permitem o transporte do produto para a secagem, fumagem e cozedura. A tripa com massa é torcida em volta do ferro, sendo importante manter um adequado espaçamento entre os vários chouriços, para que haja uma distribuição uniforme do calor durante o tratamento térmico.

1.4.7. Cozedura e Secagem

Depois de pesado, o produto é encaminhado para secagem, fumagem e cozedura. As sucessivas etapas são controladas por tempo e temperatura sendo os objetivos secar o produto, aplicar a fumagem pretendida, conseguir um tratamento térmico adequado (temperatura final no centro térmico definida), bem como estabelecer as características organoléticas pretendidas. A temperatura final no centro térmico do produto deve ser de 75 °C.

1.4.8. Estabilização em Clima

O produto segue o processo de estabilização através da colocação em clima, com humidade e temperatura controladas, de forma a serem embalados com a quebra pretendida. O chouriço em clima perde parte da água presente e, por isso, controla-se a atividade da água do produto durante esta fase. Para se perceber se o produto atingiu a atividade de água objetivo ($\leq 0,92$) faz-se o cálculo da quebra. A quebra é o valor de peso perdido em água no produto relativamente ao peso inicial de produto.

1.4.9. Embalamento

Antes de embalado, o produto passa por um equipamento de corte que permite dividir o produto completo em várias unidades independentes, chamada de máquina de corte de chouriço. No embalamento, o produto é colocado no tapete da embaladora, separado por número de unidades a conter em cada saco, e embalado em filme plástico por termosoldagem em ambiente constituído por aproximadamente 30% de dióxido de carbono e 70% de azoto. O gás utilizado tem como objetivo minimizar o desenvolvimento microbiológico.

1.5. Deterioração/Contaminação microbiológica da carne e produtos cárneos

A deterioração da carne é uma degradação natural que ocorre devido a fenómenos químicos e biológicos que ocorrem na carne por si só, mas também devido à contaminação por microrganismos e ao seu conseqüente crescimento. O principal interesse é regular ou controlar a degradação (Cassens, 1994). A contaminação pode ser endógena, isto é, da matéria-prima, ou exógena, a partir do processamento da carne. A contaminação exógena pode ser derivada da preparação e obtenção da carcaça, através da pele, das facas e utensílios, dos manipuladores e dos recipientes e superfícies de trabalho. Por outro lado, a contaminação exógena também pode ter origem no local de transformação, através da água de limpeza, do ar e da presença de vetores animais (Polo & Jovita, 2001). A maioria das bactérias de deterioração presentes em carnes frescas - carnes que nunca foram tratadas nem congeladas e sem adição de qualquer aditivo - são Gram-positivo e aeróbicas. Os principais bacilos Gram-positivo presentes são *Clostridium*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Lactobacillus* e *Listeria* e os principais cocos Gram-positivo presentes são *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*. Adicionalmente, a carne contém bacilos e cocos Gram-negativo, sendo que os mais comuns são *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Shigella* e *Campylobacter* (Feiner, 2006).

1.6. Bactérias do ácido láctico (BAL)

As bactérias do ácido láctico são um grupo de bactérias Gram-positivo, que não formam esporos, são catalase-negativa, desprovidas de citocromo, algumas são fastidiosas (Salminen & Wright, 2004), têm a forma de cocos ou bacilos e produzem ácido láctico como o principal produto final da fermentação dos hidratos de carbono. Assim, os produtos alimentares fermentados pelas bactérias do ácido láctico sofrem acidificação, o que inibe o crescimento de agentes de deterioração (FAO, 2016a). As BAL encontram-se em habitats com uma fonte de alimentação rica, tais como fruta e material vegetal em decomposição, assim como em alimentos e em cavidades de seres humanos e animais (König & Fröhlich, 2009). As BAL pertencem a dois principais grupos: as homofermentativas e as heterofermentativas. As bactérias homofermentativas produzem principalmente ácido láctico, através da glicólise (via Embden-Meyerhof). As bactérias heterofermentativas produzem ácido láctico, além de quantidades apreciáveis de etanol, acetato e dióxido de carbono, através da via 6-fosfogluconato/fosfocetolase (FAO, 2016a).

Durante os anos 80, o gênero *Streptococcus* foi separado em três gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. Atualmente, o grupo das BAL é constituído por 12 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Stiles & Holzapfel, 1997). Estes microrganismos conseguem usar O₂, caso esteja presente, mas também podem viver sem oxigênio. No entanto, o seu crescimento é reforçado pela presença de dióxido de carbono (Feiner, 2006). As BAL produzem uma variedade de fatores que incluem produtos finais metabólicos, substâncias semelhantes a antibióticos e proteínas bactericidas, denominadas bacteriocinas (Klaenhammer, 1988).

Dodds e Collins-Thompson (1984) estudaram a tolerância ao nitrito pelas BAL associadas a produtos cárneos curados e detetaram que algumas estirpes tinham capacidade enzimática para reduzir o nitrito. No entanto, concluíram que a presença do sistema enzimático nitrito redutase em BAL não estava relacionado com a sua resistência ao nitrito, podendo a resistência estar relacionada com a via de metabolismo da glucose.

Dos vários gêneros percententes ao grupo das BAL, *Enterococcus* estão amplamente distribuídos na natureza e são considerados potenciais microrganismos de deterioração (Garg & Mital, 1991). Diversos autores têm mencionado a resistência ao calor de enterococos (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 2002). Segundo McAuley *et al.* (2012), esta resistência é altamente variável e tem sido demonstrado que estes microrganismos podem sobreviver a temperaturas de pasteurização. No entanto, apesar desta sobrevivência ao processamento térmico em carnes processadas se traduzir em deterioração, em alguns queijos, o crescimento destes microrganismos contribui para o amadurecimento e desenvolvimento do sabor do produto. Certos *Enterococcus* de origem alimentar produzem bacteriocinas com atividade contra *Listeria* (Franz *et al.*, 1999; Barbosa *et al.*, 2014). No entanto, estas bactérias também são considerados patogênicos nosocomiais, podendo causar bacteriemia, endocardite, infeções do trato urinário e outras (Franz *et al.*, 1999; Lewis & Zervos, 1990; Murray, 1990), e têm estado relacionados com surtos de origem alimentar (Franz *et al.*, 1999). *Enterococcus* têm sido sugeridos como organismos indicadores úteis de higiene (Garg & Mital, 1991), sendo também utilizados como indicadores de contaminação fecal (Franz *et al.*, 1999). Isolados de várias espécies de *Enterococcus* são agentes patogênicos oportunistas com resistência a antibióticos intrínseca ou adquirida, que pode ser transferida para outros microrganismos patogênicos através de transposões conjugativos e de plasmídeos não-conjugativos e, por isso, são normalmente indesejáveis em produtos alimentares (Franz *et al.*, 1999; McAuley *et al.*, 2012).

Os microrganismos *Pediococcus* estão amplamente distribuídos em bebidas, alimentos fermentados e produtos lácteos. As espécies *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus* têm sido recuperadas do trato gastrointestinal de aves, patos e outros animais, e existem vários alimentos probióticos comerciais que contêm ambas as espécies (Tannock, 1997). Têm sido isolados pediocinas - compostos inibidores de uma gama de agentes patogênicos alimentares - destas espécies e de *Pediococcus damnosus* (Simpson *et al.*, 2002). As pediocinas têm elevada atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* (Cheun *et al.*, 2000).

As espécies de *Lactobacillus* ocorrem em material vegetal, produtos alimentares e também habitam no trato gastrointestinal de mamíferos saudáveis, sendo os membros mais comuns da microbiota do trato urogenital (Velraeds *et al.*, 1996). Algumas espécies de *Lactobacillus* também são utilizadas com probióticos e têm capacidade de modular o sistema imunitário e inibir o crescimento ou a invasão de bactérias patogênicas e parasitas (Hugo *et al.*, 2008). Por outro lado, algumas estirpes de *Lactobacillus* têm sido associadas a casos de septicemia, endocardite e bacteremia (Carasi *et al.*, 2014).

1.7. Fatores que interferem no crescimento microbiano em alimentos

Vários microrganismos são os principais agentes responsáveis pela deterioração dos alimentos, como consequência da sua atividade metabólica (Hamad, 2012). Por isso, é importante conhecer os fatores que estão relacionados com a inibição, ou favorecimento, do crescimento microbiano para conseguir uma melhor conservação dos alimentos. Estes fatores podem ser intrínsecos ou extrínsecos. Os vários fatores devem ser avaliados para cada alimento específico na tomada de decisão sobre a necessidade de haver controle tempo/temperatura para garantir a segurança. Esta necessidade é determinada principalmente pelo potencial de contaminação com microrganismos patogênicos preocupantes (incluindo as influências do processamento) e pelo potencial de crescimento subsequente e/ou produção de toxinas (FDA, 2015a).

Os fatores intrínsecos estão relacionados com as características do próprio alimento, enquanto os extrínsecos relacionam-se com o ambiente em que este se encontra. Os fatores intrínsecos são a atividade de água (a_w), o pH, o potencial de oxido-redução, a composição química, a presença de antimicrobianos naturais e adicionados, a estrutura biológica e a interação entre microrganismos. Os fatores extrínsecos são a temperatura ambiental, os tipos de embalagem/atmosfera, as condições de armazenamento e as etapas de processamento (FDA, 2015a). A temperatura e o pH são os principais fatores ambientais que afetam o crescimento microbiano (Rosso *et al.*, 1995).

A atividade de água é o parâmetro que mede a disponibilidade de água de um alimento. Este parâmetro representa a água que está livre, ou seja, a água que não está ligada a macromoléculas por forças físicas. Os microrganismos necessitam de água numa forma disponível para crescer em alimentos (FDA, 2015a). A atividade de água define-se como a relação entre a pressão de vapor de água do alimento em si e a pressão de vapor de água pura sob condições idênticas e varia entre 0 e 1. Um valor de a_w de 0,90 indica que a pressão de vapor do alimento é de 90% em relação à água pura. A atividade de água é calculada através da humidade relativa (HR) (%) a dividir por 100 ($a_w = HR/100$). Com o aumento da temperatura, a atividade de água também aumenta. Na generalidade, os alimentos têm uma atividade de água superior a 0,95, o que irá proporcionar humidade suficiente para suportar o crescimento de bactérias, leveduras e bolores. Ao diminuir a quantidade de humidade disponível é possível inibir o crescimento dos microrganismos (FDA, 2015b). Métodos de preservação através do aumento da acidez dos alimentos, como a fermentação ou a adição de ácidos fracos, são utilizados desde a antiguidade. No estado natural, a maioria dos alimentos, como carne, peixe e legumes são levemente ácidos, enquanto a maioria das frutas são um pouco mais ácidas do que os anteriores. O valor pH é uma função da concentração de iões de

hidrogénio no alimento: $\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+]$. No caso do pH de alimentos, este é uma função da concentração de iões de hidrogénio no alimento. Os microrganismos possuem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o seu crescimento. O pH neutro é o mais favorável para o crescimento da maioria dos microrganismos (EUFIC, 2004b; FDA, 2015a).

Alguns alimentos contêm, intrinsecamente, compostos antimicrobianos de ocorrência natural que lhes transmitem algum nível de estabilidade microbiológica. Existe um número variado de constituintes antimicrobianos à base de plantas, incluindo muitos óleos essenciais, taninos, glicosídeos e resinas, que podem ser encontrados em certos alimentos. Os condimentos possuem óleos essenciais com função antimicrobiana, como é o caso da alicina no alho (FDA, 2015a).

Os microrganismos conseguem crescer num intervalo alargado de temperaturas, desde os $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ até aos $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, à pressão atmosférica, desde que esteja presente água disponível para o seu crescimento. Consoante a temperatura ideal de crescimento dos microrganismos, estes podem ser classificados em psicrófilos, psicotróficos, mesófilos e termófilos. Os psicrófilos possuem temperatura ótima de multiplicação entre 12 e $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os psicotróficos, ou psicrófilos facultativos, crescem às mesmas baixas temperaturas que os psicrófilos, mas têm uma temperatura ótima mais elevada, entre 25 e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os mesófilos possuem temperatura ótima de crescimento entre 30 e $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde estão incluídos a maioria dos microrganismos patogénicos presentes nos alimentos. Os termófilos possuem temperatura ótima de multiplicação entre os 55 e $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que estão inseridos neste grupo os *Bacillus* e *Clostridium* (Adams & Moss, 1995). Ao considerar as taxas de crescimento de microrganismos patogénicos, para além da temperatura, o tempo é um fator importante, pois no processamento térmico o tempo é conjugado com a temperatura (FDA, 2015a).

1.8. Processamento térmico dos alimentos

Um dos principais problemas em engenharia alimentar está relacionado com a inativação dos microrganismos presentes nos alimentos, não só para evitar a sua potencial contaminação, mas também para preservar alimentos por tanto tempo quanto possível. Com o objetivo de se conseguir a inativação de esporos e células vegetativas, os alimentos são termicamente tratados dentro de recipientes, ou de forma contínua/descontínua, e depois são embalados em recipientes assépticos (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2003). A cozedura, ou cozimento, é uma operação unitária que utiliza ar, água ou vapor quente para alterar as características sensoriais de um alimento. Esta operação tem como objetivo a produção de novos produtos com as características sensoriais – aspeto, cor, sabor, aroma e/ou textura – desejadas pelo consumidor. Além disso, também tem como objetivo a conservação do produto por redução da carga microbiana, destruição de potenciais toxinas nocivas que ocorrem naturalmente ou pela presença de certos microrganismos, inativação enzimática, melhoramento da disponibilidade/digestibilidade de alguns nutrientes e, em certos casos, a diminuição da atividade de água (quando a cozedura é realizada em ar). Normalmente a maioria dos produtos submetidos a cozedura têm um tempo de vida útil relativamente curto, geralmente são embalados e refrigerados (Fellows, 2000). O processo de cozedura vai depender do meio de aquecimento, da intensidade da fonte de calor e do tempo de exposição ao calor. O forno industrial pode ter circulação forçada de ar para aumentar a transferência de calor. Os fornos dividem-se em

contínuos e descontínuos. A cozedura pode ser aplicada juntamente com outros tratamentos de conservação como a adição de aditivos alimentares, embalagem ou refrigeração (Fellows, 2000; Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2003).

1.9. Objetivos

Os principais objetivos do estágio na empresa foram o desenvolvimento de um novo tratamento térmico no chouriço corrente, a implementação de melhorias nas Boas Práticas de Fabrico ao longo do seu processo de produção e a utilização de um agente antimicrobiano natural, o quitosano, como alternativo ao nitrito de sódio, na conservação do produto de charcutaria. O desenvolvimento de um tratamento térmico alternativo ao tradicional e a implementação de melhorias nas Boas Práticas, através de maior controlo do processo de produção do chouriço corrente, foram aplicados de modo a tentar reduzir a concentração de bactérias do ácido láctico no produto, visto que é o seu principal contaminante. Desenvolveu-se um chouriço com quitosano, pois para além de se substituir um composto químico, tornando o produto alimentar mais natural, teve-se como objetivo verificar o efeito do quitosano na concentração de bactérias do ácido láctico e de microrganismos totais a 30 °C, comparativamente com o chouriço com nitrito de sódio, após o embalamento e após 14 dias. Ao longo de 77 dias, também se analisaram as características organoléticas do chouriço com quitosano, de modo a comparar com o chouriço com nitrito.

2. Metodologia

2.1. Formulação do chouriço corrente

O chouriço corrente, ou chouriço de colorau, utilizado nos ensaios foi produzido na empresa Primor Charcutaria-Prima, S.A. A fórmula técnica do chouriço está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Fórmula técnica do chouriço corrente.

Carnes
Carne de suíno Gordura de suíno
Ingredientes
Água Sal Emulsionantes Antioxidantes Açúcares Conservantes (Nitrito de sódio) Massa de Pimentão Especiarias Oleoresina Fibras

A fórmula técnica apresentada em cima foi utilizada nos ensaios de desenvolvimento de um novo tratamento térmico para o chouriço corrente.

2.2. Comparação de chouriço com embalagem opada e não opada

Com o objetivo de relacionar a presença de BAL com embalagem de chouriço opada e de identificar que tipo de BAL estavam presentes neste produto, 2 amostras com 163 dias foram analisadas

microbiologicamente, em que uma amostra tinha a embalagem opada e a outra não. Procedeu-se à contagem de BAL, segundo a norma ISO 15214:1998.

2.3. Análises microbiológicas

A análise microbiológica das várias amostras foi realizada através da contagem de bactérias do ácido láctico e de microrganismos a 30 °C nas amostras segundo as normas ISO 15214:1998 e ISO 4833-1:2013, respetivamente. Todas as análises microbiológicas foram realizadas no laboratório do CBQF. Em cada amostragem, 25 g de amostra foi pesada assepticamente para um saco *Stomacher* (VWR, Pensilvânia, EUA) estéril com 225 mL de água peptonada tamponada (BPW; Biokar diagnostics) e homogeneizada no *Stomacher* (BagMixer® 400 P, Saint Nom, França) durante 1 minuto. Foram preparadas diluições decimais seriadas em solução de Ringer (Biokar diagnostics) estéril e fez-se a incorporação de 1 mL das amostras e diluições apropriadas nas placas de Petri, com o respetivo meio de cultura. As contagens foram realizadas em *Man Rogosa Sharpe* agar (MRS; Biokar diagnostics) para BAL e em *Plate Count Agar* (PCA; Merck) para microrganismos a 30 °C. Todas as placas foram incubadas a 30 °C durante 72 h.

Após o crescimento, foi feita a confirmação das colónias obtidas em MRS. Selecionaram-se as colónias completamente individualizadas com características distintas, de modo a tentar recuperar o maior número de espécies possíveis, entre as quais escolheram-se as colónias brancas amareladas, pequenas e redondas. Após seleção, realizou-se a coloração de Gram e os testes da catalase e oxidase, a cada uma das colónias.

2.4. Desenvolvimento de um novo tratamento térmico no chouriço corrente

Foram testados três tratamentos térmicos diferentes no chouriço corrente. Na Tabela 6 estão apresentadas as condições experimentais de cozedura dos três ensaios.

Tabela 6. Condições experimentais da etapa de cozedura dos 3 ensaios.

Etapa	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Cozedura			
<i>Tempo total</i>	3h	0h40	0h40
<i>Temperatura de estufa</i>	77 °C	77 °C	77 °C
<i>Humidade Relativa</i>	100 %; Vapor de água gerado pela caldeira	100 %; Vapor de água gerado pela caldeira	100 %; Vapor de água gerado pela caldeira
<i>Chaminé da estufa</i>	Semiaberta	Fechada	Semiaberta

Os tratamentos térmicos foram realizados na estufa (Verinox, Vigolo Vattaro, Itália) da sala piloto da Primor. Posteriormente, 3 amostras de chouriço após enchimento, 3 após tratamento térmico e 3 após embalagem de cada ensaio foram analisadas microbiologicamente. As amostras obtidas após enchimento e após tratamento térmico foram transportadas para o laboratório numa mala térmica. Amostras dos ensaios 1, 2 e 3 foram guardadas para fazer contagem de BAL após 28 e 68 dias, 28 e 57 dias, e 29 e 44 dias, respetivamente. Como controlo usaram-se amostras de chouriço *standard* após enchimento e após 30 dias.

2.5. Implementação de Melhorias nas Boas Práticas de Fabrico na produção de chouriço corrente

Melhorias nas Boas Práticas de Fabrico foram implementadas de forma a verificar se o crescimento de BAL estava relacionado com o incumprimento de Boas Práticas pela população fabril. O procedimento de controlo está descrito na Tabela 7. Foi definido implementar melhorias nas Boas Práticas apenas na produção de uma remessa de carnes, sendo mencionada como remessa controlo. Os resultados da monitorização foram obtidos através da contagem de BAL. Para tal, fez-se comparação dos resultados obtidos a partir da remessa controlo com a remessa *standard* – remessa de carnes que não foi monitorizada ao longo do processo de produção. Após a etapa de enchimento do chouriço, este foi colocado em carros, de modo a serem transportados para as etapas seguintes. Posto isto, as remessas de carne controlo e *standard* deram origem a chouriços que foram colocados em carros controlo e *standard*, respetivamente, e foi feita a comparação dos resultados obtidos nas amostras dos dois carros. A concentração inicial de BAL no produto foi considerada na etapa de picagem. Desde a etapa de picagem até à etapa de enchimento, apenas foram analisadas amostras da remessa de carne controlo. A partir da etapa de enchimento até ao final do processo de produção foram realizadas análises a amostras da remessa controlo e da remessa *standard*.

O transporte da matéria cárnea após picagem e mistura foi realizado através de canastreiros. Por isso, foi importante controlar a limpeza nos canastreiros. Toda a matéria cárnea monitorizada durante o processo passou pelos equipamentos, logo após a higienização e antes de passar a matéria não monitorizada (*standard*).

De modo a avaliar rapidamente a higienização de superfícies de equipamentos e utensílios, fez-se a metodologia/procedimento ATP. Este método consiste na utilização do equipamento medidor de ATP EnSURE (luminómetro) e zaragatoas UltraSnap, da Hygiena®. A presença de ATP sobre uma superfície indica a presença de contaminação (resíduos de alimentos, alergénios e/ou bactérias), potenciando assim o crescimento bacteriano. O funcionamento deste teste rápido baseia-se num fenómeno denominado bioluminescência, que resulta de uma reação bioquímica entre a molécula luciferina e o ATP, na presença da enzima luciferase e do oxigénio, sendo a luz um produto da reação. A unidade de medida da bioluminescência é a Unidade Relativa de Luz (RLU) (Costa *et al.*, 2006).

Para analisar a qualidade do ar interior, foram realizados procedimentos para verificar a contaminação microbiológica. Para avaliar a contaminação ambiental de cada local, colocou-se uma placa com meio de cultura TSA exposta ao ar durante 15 minutos. As placas foram incubadas a 30 °C durante 72 h, para posterior contagem de colónias.

2.6. Preparação de solução de quitosano

Preparou-se uma solução-mãe de quitosano de 3% (m/v), como descrito anteriormente no ponto 2.2. do Capítulo 1. Adicionou-se 37,5 g de quitosano em 1250 mL de solução de ácido acético, sendo que esta solução foi preparada com 625 mL de vinagre de vinho branco - 6% de acidez (Auchan Portugal Hipermercados, S.A., Lisboa, Portugal) e 625 mL de água. O quitosano ficou a dissolver no agitador *overnight*. Posteriormente, esta solução foi adicionada à mistura na produção de chouriço.

Tabela 7. Procedimento de Implementação de Melhorias nas Boas Práticas durante as diferentes etapas de produção de chouriço corrente.

ETAPA	PROCEDIMENTO DE MONITORIZAÇÃO	TEMPO DA MONITORIZAÇÃO
1. SELEÇÃO DE MATÉRIAS-PRIMAS/DESCONGELAÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> - Verificar temperaturas de refrigeração (0-5 °C) e congelação (≤ -18 °C) nas câmaras. Verificar temperatura das carnes – utilizar termómetro. - Verificar que as matérias-primas estão protegidas com plástico. - Observar se os manipuladores estão com as mãos/luvas higienizadas. 	- Controlar no início e no final da etapa.
2. PICAGEM	<ul style="list-style-type: none"> - Verificar que a picadora, canastreiros e carrinhos estão limpos antes da picagem das carnes da remessa controlo. Procedimento ATP na picadora (crivos e lâminas), canastreiros e carrinhos. Observar se limpam os carrinhos na máquina de limpeza. - Observar se as mãos/luvas dos manipuladores estão higienizadas. - Verificar a temperatura após picagem (-2 a 5 °C). - Verificar que os operários registam temperatura. Observar se o termómetro é desinfetado antes da utilização. - Recolher 3 amostras de cada tipo de carne após picagem para contagem de BAL (em sacos estéreis e a vácuo). - Procedimento de contaminação ambiental na zona da picagem. <p>NOTA: No caso de peças de carne caírem no chão:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pedacos pequenos: são consideradas como subproduto. - Pedacos maiores: aparadas pelo <i>Team Leader</i> e rejeição do produto que esteve em contacto com o chão. <p>Após recolherem o produto do chão, os manipuladores devem higienizar as mãos e proceder à substituição das luvas. Verificar cumprimento desta prática, caso aplicável.</p>	- Controlar durante toda a etapa.
3. MISTURA	<ul style="list-style-type: none"> - Verificar se a batedeira e as pás foram corretamente higienizadas antes da mistura da remessa controlo. Procedimento ATP na batedeira (interior) e pás. - Observar se as mãos/luvas dos manipuladores estão higienizadas. - Verificar tempo de batedeira. - Verificar se os canastreiros não são deitados no chão. - Verificar se não utilizam as mãos para recolher restos da mistura, e sim pás/espátulas. - Verificar temperatura da mistura à saída da batedeira (0-5 °C). - Verificar que os operários registam temperatura. Observar se o termómetro é desinfetado antes da utilização. - Recolher 3 amostras de mistura da remessa controlo para contagem de BAL (em sacos estéreis e a vácuo). - Verificar que imediatamente após o final da etapa, a mistura da remessa controlo segue para a câmara de refrigeração. 	- Controlar durante toda a etapa.
4. MATURAÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> - Verificar temperatura da mistura durante a maturação (0-5 °C) – no início e no final. - Registrar tempo de maturação. - Recolher 3 amostras de mistura da remessa controlo após maturação para contagem de BAL (em sacos estéreis e a vácuo). 	- Controlar no início e no final da etapa.
5. ENCHIMENTO	<ul style="list-style-type: none"> - Limpar o carro e ferros nos quais vão ser colocados os chouriços da remessa controlo. - Verificar se a enchedora, carrinhos, carros e ferros foram corretamente higienizados antes do enchimento da remessa controlo. Procedimento ATP na enchedora (funis e interior da tubagem), carrinhos, carros e ferros. - Observar se as mãos/luvas dos manipuladores estão higienizadas e que não têm as mãos sujas com outros produtos. - Recolher 3 amostras após enchimento da remessa controlo e da remessa <i>standard</i> para contagem de BAL (em sacos estéreis e a vácuo). - Verificar que o carro cheio com o produto vai imediatamente para o corredor/câmara de frio e as portas ficam fechadas. - Verificar temperatura do corredor (0-8 °C). - Inserir <i>datalogger</i> no interior de um chouriço da remessa controlo, para posterior análise de temperatura no interior do produto durante o tratamento térmico. - Procedimento de contaminação ambiental na zona do enchimento. <p>NOTA: Caso seja necessário a tripa ser demolhada com água morna e sal, ter em atenção que os manipuladores apenas utilizem os carrinhos com água para esse fim.</p>	- Controlar durante toda a etapa.
ANTES DA COZEDURA E SECAGEM	<ul style="list-style-type: none"> - Procedimento de contaminação ambiental no corredor. - Registrar o tempo de espera do produto no corredor/câmara de frio. - No caso do tempo de espera ser longo: imediatamente antes de entrar na estufa, retirar 3 amostras de chouriço do carro controlo e do carro <i>standard</i> para contagem de BAL (em sacos estéreis e a vácuo). 	

6. COZEDURA E SECAGEM	<ul style="list-style-type: none"> - Observar se os manipuladores dos carros têm as mãos higienizadas/luvas limpas. - Procedimento de contaminação ambiental na zona das estufas. <p>Após cozedura,</p> <ul style="list-style-type: none"> - Recolher 3 amostras de chouriço do carro controlo e do carro <i>standard</i>, para contagem de BAL (em sacos estéreis e a vácuo). - Carro controlo: Utilizar máscara e luvas quando se retirar o carro da estufa. O carro deve subir e arrefecer na zona dos climas antes de dar entrada para a estabilização em clima. - Retirar <i>datalogger</i> do interior do chouriço e analisar os dados. - Analisar gráfico da estufa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Controlar durante entrada e saída dos carros na estufa.
7. ESTABILIZAÇÃO EM CLIMA	<ul style="list-style-type: none"> - Verificar o uso de máscara e luvas desinfetadas quando movimentam o carro. - Procedimento de contaminação ambiental dentro do clima e no corredor próximo do clima. - Recolher 3 amostras de chouriço do carro controlo e do carro <i>standard</i> após estabilização em clima para contagem de BAL (em sacos estéreis e a vácuo). 	<ul style="list-style-type: none"> - Controlar durante entrada e saída dos carros no clima.
8. EMBALAMENTO	<ul style="list-style-type: none"> - Verificar que a embaladora é corretamente limpa e higienizada antes do embalamento do chouriço controlo. Procedimento ATP: mesas de apoio, tesouras, máquina de corte de chouriço e tapete da embaladora. - Observar se as mãos/luvas dos manipuladores estão higienizadas. - Verificar temperatura na sala de embalagem. - Procedimento de contaminação ambiental na sala de embalagem. - Recolher 3 amostras de chouriço do carro controlo e do carro <i>standard</i> após embalamento para contagem de BAL. - Medir pH e aw do chouriço. 	<ul style="list-style-type: none"> - Controlar durante toda a etapa.

2.7. Preparação de chouriço com quitosano

Foi desenvolvido um novo chouriço com a substituição do nitrato de sódio pelo quitosano. O peso total da massa de chouriço pretendido foi de 25 Kg. A concentração de quitosano no produto final foi de 0,15% (m/m), sendo que esta alteração foi conseguida através da modificação de quantidade de água utilizada na fórmula técnica do chouriço corrente. A formulação está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8. Fórmula técnica do chouriço com quitosano.

Carnes
Carne de suíno Gordura de suíno
Ingredientes
Água Sal Emulsionantes Antioxidantes Açúcares Conservantes (Quitosano) Massa de Pimentão Especiarias Oleoresina Fibras

Sendo um chouriço constituído por um ingrediente novo e utilizada pouca quantidade de massa, a mistura foi realizada na sala piloto da Primor e as restantes etapas foram concretizadas na indústria. A mistura foi realizada numa batedeira da TecMaq (Puebla, México). Após o chouriço com quitosano ser embalado, procedeu-se à contagem de bactérias do ácido láctico e de microrganismos totais a 30 °C em 3 amostras. Como controlo, realizou-se o mesmo procedimento para 3 amostras de chouriço *standard* produzido com as carnes do mesmo lote. Novas análises microbiológicas foram realizadas após 14 dias do embalamento.

2.8. Determinação de atividade de água e pH

A atividade de água foi medida no aparelho Aqualab Dew Point Water Activity Meter 4TE (Pullman, EUA). O valor de pH foi medido diretamente no chouriço usando um medidor de pH (modelo testo 205, Testo AG, Lenzkirch, Alemanha). Os dois parâmetros foram medidos nas amostras de chouriço opada e não opada, amostras de chouriço obtidas ao longo do desenvolvimento de um novo tratamento térmico, antes da cozedura e após embalamento, amostras de chouriço obtidas durante a implementação de melhorias nas Boas Práticas do seu processo de produção, imediatamente após embalamento, e nas amostras de chouriço com quitosano, imediatamente após embalamento e após 14 dias.

2.9. Análise estatística

Foi utilizado o teste U de Mann-Whitney para determinar diferenças significativas entre os grupos de amostras de chouriço controlo e *standard*, após embalamento. A significância estatística foi fixada a $p \leq 0,05$. As análises foram realizadas utilizando IBM SPSS Statistics 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA).

3. Resultados e Discussão

3.1. Comparação de chouriço com embalagem opada e não opada

Como demonstrado na Tabela 9 a amostra de chouriço com embalagem opada teve concentrações de bactérias do ácido láctico similares à da amostra não opada.

Tabela 9. Concentração de bactérias do ácido láctico (UFC/g) nas amostras opada e não opada e características dos microrganismos presentes; valores de pH e aw das amostras

Amostra	pH	Atividade de água	Bactérias do ácido láctico (UFC/g)	Gram	Forma	Catalase	Oxidase
Opada	5,24	0,926	8,0E+07	+	Cocos	-	-
Não opada	5,26	0,926	1,3E+08	+	Cocos	-	-

Ou seja, mesmo no caso em que não se detetou a embalagem opada, provavelmente consequência da produção de CO₂ pelas BAL, houve desenvolvimento destas bactérias. No entanto, estes microrganismos podem ser homoláticos, não fazendo a fermentação heterolática, em que ocorre produção de dióxido de carbono (FAO, 2016a). Na realidade, a deterioração pode assumir várias formas e as embalagens opadas servem como um sinal de contaminação microbiana (Baldus & Deibel, 2012). Por vezes também se pode visualizar o crescimento de colónias na superfície do alimento. Ambas as amostras apresentaram concentração elevada de BAL. Contudo é de salientar que os produtos analisados tinham 163 dias, ou seja, estavam quase no final do tempo de vida útil, 180 dias. Foram recolhidas amostras com 163 dias uma vez que eram amostras em quarentena, disponíveis para analisar, e como uma das amostras estava já bastante opada, seria interessante quantificar e qualificar as bactérias do ácido láctico presentes numa análise inicial. Com a coloração de Gram e os testes da catalase e oxidase às diferentes colónias obtidas foi possível verificar que estavam presentes microrganismos em forma de cocos, Gram-positivo e com catalase e oxidase negativas. Estas características coincidem com as características de BAL. Também se visualizaram células com diferentes tamanhos, o que poderá querer dizer que diferentes géneros de bactérias do ácido láctico poderão estar presentes, como, por exemplo, *Enterococcus* ou *Pediococcus* (FAO, 2016a). Ainda na Tabela 9 é possível observar que o valor de pH das duas amostras é próximo de 5. Uma vez que, de acordo com o histórico do produto, o pH é próximo de 6, os valores de pH das amostras estão inferiores ao valor de pH habitual, tendo-se obtido valores de pH mais ácidos. Isto acontece, provavelmente, devido à produção de ácido láctico pelas bactérias do ácido láctico, através da fermentação homolática ou heterolática (FAO, 2016a). O pH normalmente ácido do chouriço é conferido pelo pH da carne; a carne de suíno atinge um pH final de 5,6 – 5,7 em, aproximadamente, 3 a 5 horas após o abate (OMAFRA, 2001). Também a adição de alguns ingredientes, como o eritorbato de sódio (pH 5,5 – 8) (FAO), a massa de pimentão (pH 3,37 – 3,85) (Elias *et al.*, 2007) e a fibra de batata (pH 5 – 7) (FDA, 2009) contribuem para o pH ácido do chouriço. Os valores de atividade de água foram iguais nas duas amostras, os quais estão próximos do limite objetivo de aw para o chouriço corrente: ≤0,92.

3.2. Desenvolvimento de um novo tratamento térmico no chouriço corrente

O objetivo do presente estudo foi ver como se comportaria microbiológica e organolepticamente o chouriço quando sujeito a um tratamento térmico idêntico ao da mortadela, no qual o produto é exposto a temperaturas X e 100% de humidade até atingir a temperatura de núcleo Y, permitindo obter resultados microbiológicos muito estáveis no fim de vida útil. A mortadela é o produto que, ao fim dos 180 dias, apresenta melhores resultados de análises microbiológicas relativamente a contagem de bactérias do ácido láctico: $<1,0E+01$ UFC/g. Pretendeu-se verificar se a alteração do tratamento térmico do chouriço permitiria uma maior redução no número de BAL comparativamente ao processamento térmico industrial (*standard*).

Na Tabela 10 estão descritas as diferenças entre o tratamento térmico dos ensaios e o tratamento térmico *standard*. Como a mortadela apenas passa por cozedura, os passos de secagem dos ensaios foram baseados na secagem do chouriço *standard*. O chouriço *standard* é submetido a um passo de pré-cozedura, que não foi realizado nos ensaios. O processamento térmico do chouriço corrente é realizado num equipamento, mais especificamente numa estufa, que utiliza vapor como fluido de aquecimento.

3.2.1. Contagens microbiológicas

Ao analisar a Tabela 10, é possível perceber que após o tratamento térmico, tanto nas amostras de ensaio como nas amostras *standard*, a concentração de BAL foi inferior a $1,0E+01$ UFC/g. Ou seja, houve a redução de microrganismos abaixo do limite de deteção da técnica de contagem. Isto indica que os tratamentos térmicos efetuados nos ensaios foram suficientes para reduzir o número de BAL presentes nas amostras, assim como na amostra *standard*. No entanto, segundo histórico da Primor, quando as matérias-primas apresentam carga microbiana mais elevada, quantidades na ordem de 10^6 UFC/g, o tratamento térmico não é suficiente para reduzir os microrganismos abaixo do limite de deteção da técnica. Contudo, caso se reduzisse na totalidade os microrganismos, quando em concentrações elevadas, o produto final seria sensorialmente inaceitável devido aos tempos de aquecimento excessivamente longos. A redução da carga microbiana ao longo do tempo em que ocorre o tratamento térmico vai depender do tipo de microrganismos presentes e da temperatura aplicada.

Como nos ensaios realizados, após o enchimento, a carga microbiana das amostras de chouriço estava entre 10^3 e 10^4 UFC/g, foi possível reduzir totalmente as BAL com o tratamento térmico.

Como a massa do chouriço antes do tratamento térmico foi comum nos ensaios e na produção industrial, a quantidade de BAL não foi indicada para o processo *standard* antes da cozedura e secagem, na Tabela 10.

No ensaio 2, após embalagem (T0), a quantidade de BAL aumentou relativamente aos resultados obtidos após o tratamento térmico (Tabela 10). Uma das hipóteses que pode justificar este aumento é o facto do produto deste ensaio, ao contrário do dos ensaios 1 e 3, não ter sido controlado no embalagem. Não se observou o crescimento de colónias no T0 do ensaio 1, nem em duas das três amostras do ensaio 3.

Tabela 10. Condições experimentais de 3 ensaios, com diferentes tratamentos térmicos, e do produto *standard*; quantidade de bactérias do ácido lático nas amostras dos ensaios e adicionalmente de microrganismos a 30 °C nas amostras *standard*

Etapa	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Standard
Após enchimento				
Concentração de BAL (UFC/g)	5,9E+04	1,4E+04 2,0E+03 9,9E+03	8,3E+04 4,7E+04 8,1E+04	- - -
Cozedura				
Tempo total	3h	0h40	0h40	Especificação X
Humidade Relativa	100%; vapor de água gerado pela caldeira	100%; vapor de água gerado pela caldeira	100%; vapor de água gerado pela caldeira	
Chaminé da estufa	Semiaberta	Fechada	Semiaberta	
Temperatura do centro térmico (objetivo: 72 °C)	73 °C	75,3 °C	73,4 °C	
Secagem (com fumo)				
Tempo total	2h	2h	2h	Especificação X
Humidade Relativa	0%	0%	0%	
Chaminé da estufa	Semiaberta	Semiaberta	Semiaberta	
Temperatura do centro térmico (final da etapa)	55,7 °C	54 °C	50,1 °C	
Secagem (sem fumo)				
Tempo total	1h	1h	1h	Especificação X
Humidade Relativa	0%	0%	0%	
Chaminé da estufa	Semiaberta	Semiaberta	Semiaberta	
Temperatura do centro térmico (final da etapa)	57,5 °C	55,7 °C	56,4 °C	
Concentração de BAL (UFC/g)	<1,0E+01	<1,0E+01 <1,0E+01 <1,0E+01	<1,0E+01 <1,0E+01 <1,0E+01	<1,0E+01 <1,0E+01 <1,0E+01
Estabilização em clima				
Tempo	40h	2h	3h	24 – 36h
Após embalamento (T0)				
Concentração de BAL (UFC/g)	<1,0E+01 <1,0E+01 <1,0E+01	9,0E+01 ⁽¹⁾ 2,1E+03 5,0E+01 ⁽¹⁾	<1,0E+01 1,0E+01 ⁽¹⁾ <1,0E+01	5,0E+01 ⁽¹⁾ 4,0E+01 ⁽¹⁾ 6,0E+01 ⁽¹⁾
T1	Após 28 dias	Após 28 dias	Após 29 dias	Após 30 dias
	Concentração de BAL (UFC/g)	Concentração de BAL (UFC/g)	Concentração de BAL (UFC/g)	Concentração de microrganismos a 30 °C (UFC/g)
	1,5E+02 ⁽¹⁾ <1,0E+01 <1,0E+01	>3,0E+05 >3,0E+05 >3,0E+05	1,3E+02 ⁽¹⁾ 2,0E+01 ⁽¹⁾ 3,6E+01 ⁽¹⁾	1,3E+02
T2	Após 68 dias	Após 57 dias	Após 44 dias	Após 60 dias
	Concentração de BAL (UFC/g)	Concentração de BAL (UFC/g)	Concentração de BAL (UFC/g)	Concentração de microrganismos a 30 °C (UFC/g)
	3,5E+02 1,1E+02 ⁽¹⁾ 4,0E+02 ⁽¹⁾	>3,0E+07 >3,0E+07 >3,0E+07	1,1E+02 ⁽¹⁾ 4,3E+02 5,5E+02 ⁽¹⁾	⁽²⁾

⁽¹⁾ Número esperado; ⁽²⁾ Sem informação disponível.

No processo *standard* também houve um aumento no número de bactérias do ácido láctico após embalagem, relativamente ao final do processamento térmico. Com estes resultados, o foco da contaminação poderá ter sido na zona de embalagem. No T1 houve um aumento do número de bactérias do ácido láctico na maioria das amostras relativamente ao T0. Apenas no ensaio 1, duas das amostras se mantiveram sem contagem de lácticas. É de salientar que no ensaio 2 ocorreu um maior aumento do T0 para o T1. Para o processo *standard*, não havia disponibilidade de dados quanto ao número de BAL no T1 e, por isso, foram utilizados os dados do número de microrganismos totais a 30 °C. Os tempos (T1 e T2) em que se fez a análise microbiológica das amostras dos 3 ensaios, foram ligeiramente diferentes porque, como se pretendia comparar a quantidade de bactérias do ácido láctico no chouriço de cada ensaio ao longo do tempo, não era importante que a amostragem fosse realizada em tempos exatamente iguais para todos os ensaios.

3.2.2. Condições experimentais dos tratamentos térmicos

O ensaio 1 foi um ensaio preliminar de modo a perceber como ficaria um chouriço passando por um longo período de cozedura e um menor período de secagem, principalmente em termos de aspeto. Durante o ensaio, o chouriço ficou a cozer durante 3h. No entanto, às 2h de cozedura alguns chouriços caíram dos ferros devido ao rompimento da tripa. Isto porque o chouriço ao ser submetido à etapa de cozedura com 100% de humidade, passa a conter muita quantidade de água, o que o torna muito pesado e impossível de ser suportado pela tripa. Contudo, após 1h de cozedura, o centro térmico do produto atingiu os 73 °C, superior à temperatura objetivo. As etapas de secagem do ensaio, tanto com e sem fumo, foram mais reduzidas do que no processo *standard*, e, por isso, o chouriço do ensaio não ficou com um aspeto tão enrugado como no chouriço *standard*, mesmo após a estabilização em clima. Nas Figuras 7a e 7b é possível visualizar o aspeto dos chouriços do processo industrial e do ensaio 1, respetivamente, após o tratamento térmico.

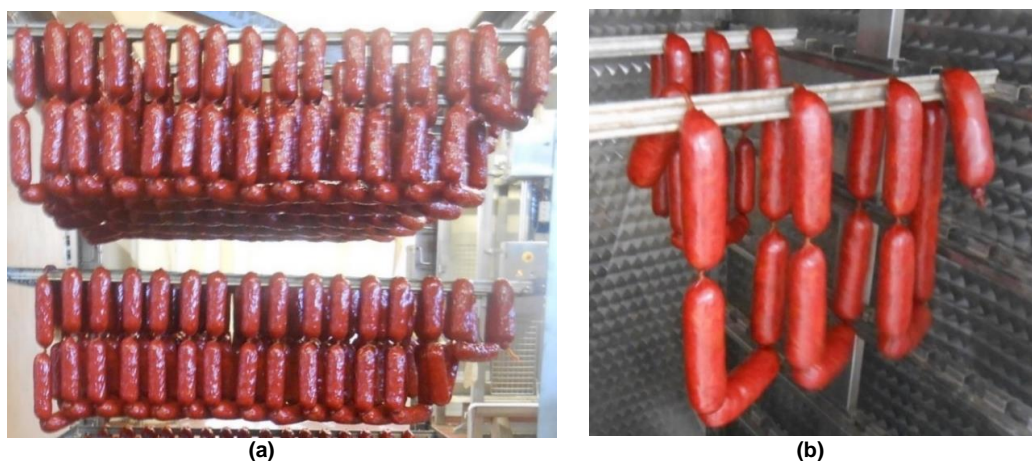


Figura 7. (a) Chouriços após tratamento térmico industrial/*standard*; (b) Chouriços do ensaio 1 após tratamento térmico.

Como após o embalagem (T0), se obteve menos de 1,0E+01 UFC/g de bactérias do ácido láctico, decidiu-se fazer mais ensaios com diferentes tratamentos térmicos, reduzindo o tempo de cozedura de modo a que não ocorresse o rompimento da tripa. No entanto, os chouriços dos ensaios seguintes ficaram com aspeto similar aos do ensaio 1.

Como o primeiro ensaio foi preliminar, a contagem de bactérias do ácido láctico apenas foi realizada para uma amostra para as etapas após o enchimento e após o tratamento térmico.

Nos ensaios 2 e 3 utilizaram-se as mesmas temperaturas de cozedura que no ensaio 1, mas com tempos diferentes. No ensaio 2 definiu-se utilizar a chaminé da estufa fechada, de modo a utilizar este parâmetro igual ao do tratamento térmico da mortadela. No entanto, nestas condições verificou-se que num curto período de tempo, pouco mais do que 40 minutos, a tripa rompia. O mesmo não aconteceu com a mortadela, porque é um tipo de produto diferente. Pelo motivo do rompimento, ficaram definidos 40 minutos como tempo de cozedura.

O chouriço *standard* passa por cozedura na estufa em que a chaminé está semiaberta e, por isso, ficou definido no ensaio 3 que esta etapa decorreria durante 40 minutos e com a chaminé da estufa semiaberta. Com estas condições, foi possível manter o chouriço intacto durante toda a etapa de cozedura. Nesta etapa, a temperatura objetivo do centro térmico para o produto dos ensaios é diferente da temperatura objetivo do produto *standard*. Para o chouriço dos ensaios foi pretendido atingir os 72 °C, enquanto no chouriço *standard* o objetivo foi 75 °C. O facto de a cozedura nos ensaios decorrer a 100% de humidade relativa faz com que se atinjam temperaturas elevadas mais rapidamente. O tempo do tratamento térmico, para permitir atingir certo grau de redução, depende da temperatura de tal forma que, quando a temperatura aumenta, o tempo necessário para atingir essa redução diminui (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2003). Por este motivo, como se diminuiu a temperatura de cozedura, aumentou-se o tempo desta etapa. Definiu-se que a secagem seria durante 2h devido ao facto de o estudo principal nos ensaios ser a cozedura, sendo que a etapa de secagem é uma etapa adicional, de modo a permitir que o chouriço dos ensaios fique próximo do chouriço corrente. Nos 3 ensaios fizeram-se variações de tempo e temperatura nas etapas de secagem e aplicação de fumo.

As temperaturas do centro térmico do produto durante a secagem foram medidas com um termómetro (Hanna) ao final de cada etapa, sendo que também foram monitorizadas ao longo do tratamento térmico através de uma sonda.

3.2.3. Estabilização em clima

O tempo de estabilização em clima variou muito do ensaio 1 para os ensaios 2 e 3, como se pode observar na Tabela 10. O tempo em clima pode variar, pois depende se o carro de transporte tem muita ou pouca quantidade de chouriço, estando mais ou menos tempo em clima, respetivamente. O mesmo acontece se no clima estiver um grande ou pequeno número de carros carregados com chouriço. No primeiro ensaio ocorreu a queda de muito produto, mas considerou-se o peso dos chouriços caídos para a determinação da quebra. No entanto, como esteve 3 h em cozedura a 100% de humidade, reteve muita quantidade de água e, por isso, esteve 40 h em clima. Nos ensaios 2 e 3 os produtos estiveram em clima 2 e 3 horas, respetivamente, pois utilizou-se pouca quantidade de chouriço e estiveram apenas 40 minutos a cozer.

3.2.4. pH e atividade de água

Na Tabela 11 estão apresentados os valores de pH e de atividade de água das amostras dos diferentes ensaios e do processo *standard* obtidas antes da cozedura e secagem, nos T0, T1 e T2, assim como o peso dos chouriços.

Tabela 11. Valores de atividade de água e pH obtidos nas amostras dos 3 ensaios e do processo *standard*, ao longo de diferentes tempos, e peso de chouriço obtidos nos ensaios e peso objetivo do chouriço na indústria

Etapa	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Standard
Antes da Cozedura e Secagem				
aw	0,964			
pH	6,06			
Após embalagem (T0)				
Peso/ chouriço (g)	87,9	107,5	105	100
aw	0,915	0,930	0,927	0,947
pH	6,32	6,19	6,24	6,26
T1				
	Após 28 dias	Após 28 dias	Após 29 dias	Após 30 dias
aw	0,936	0,934	0,931	(1)
pH	5,90	5,97	6,08	
T2				
	Após 68 dias	Após 57 dias	Após 44 dias	Após 60 dias
aw	0,960	0,964	0,964	(1)
pH	6,10	5,58	6,11	

(1) Sem informação disponível.

Foi possível perceber que nos 3 ensaios ocorreu a diminuição do pH das amostras no T1 em relação ao T0. Isto pode acontecer devido à presença de bactérias do ácido láctico homofermentativas, que produzem ácido láctico, diminuindo assim o valor de pH (FAO, 2016a). Nos ensaios 1 e 3, do T1 para o T2, o valor de pH manteve-se semelhante. No entanto, para o ensaio 2, ocorreu uma ligeira diminuição do pH, sendo que foi nas amostras deste ensaio que ocorreu um elevado crescimento de bactérias do ácido láctico. O valor de atividade de água diminuiu desde a etapa antes da cozedura até à etapa após embalagem, em todos os ensaios e no processo *standard*, pois ocorreu a estabilização em clima das amostras, havendo a perda de água. As únicas amostras que estão de acordo com o intervalo objetivo de aw ($\leq 0,92$) após embalagem são as amostras do ensaio 1, com um valor de aw igual a 0,915. No entanto, também se obteve um peso por unidade abaixo do objetivo, 100 g. Ou seja, não seriam necessárias as 40 h a estabilizar em clima. As amostras dos ensaios 2 e 3 tiveram um valor de aw próximo do valor objetivo. Por outro lado, a amostra do produto *standard* não estava dentro do intervalo pretendido. No entanto, para que as amostras ficassem dentro do intervalo objetivo, deveriam ter ficado mais tempo em clima. Caso estivessem mais tempo a estabilizar, ocorria mais perda de água e também se obteria um menor peso de chouriço e mais próximo do peso de embalagem objetivo por unidade (100 g). Nos ensaios 2 e 3, o valor de aw manteve-se desde o T0 até ao T1. No entanto, no ensaio 1, o valor de aw aumentou ligeiramente. Do T1 para o T2, ocorreu o aumento de atividade de água para as amostras de todos os ensaios.

3.2.5. Caracterização das colónias

Na Tabela 12 estão apresentados os dados acerca da caracterização das colónias, quanto à morfologia e ao Gram, presentes nas amostras analisadas e recolhidas em diferentes etapas. Como todos os microrganismos cresceram em meio MRS, eram Gram-positivo e não produtores de catalase e oxidase, confirmou-se a presença presuntiva de BAL nas amostras.

Tabela 12. Caracterização dos microrganismos (morfologia e Gram) obtidos na análise microbiológica das amostras em diferentes etapas

Etapa	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Standard
Antes da Cozedura	Bacilos, Cocos, Cocobacilos Gram+	Bacilos Gram+ Cocobacilos Gram+ Bacilos Gram+	Cocos Gram+ Cocobacilos Gram+ Cocos, Cocobacilos Gram+	-
Após cozedura	Sem colónias	Sem colónias	Sem colónias	Sem colónias
T0	Sem colónias	Bacilos, Cocos Gram+ Cocobacilos Gram+ Bacilos Gram+	Cocos Gram+	Bacilos, Cocos Gram+ Bacilos, Cocos Gram+ Cocos Gram+
T1	Cocos Gram+	Cocos Gram+ Cocos Gram+ Cocos Gram+	Bacilos, Cocos Gram+ Bacilos, Cocos Gram+ Cocos Gram+	(1)
T2	Bacilos, Cocos Gram+ Bacilos, Cocos Gram+ Bacilos, Cocos Gram+	Cocos Gram+ Cocos, Cocobacilos Gram+ Cocobacilos Gram+	Bacilos, Cocos Gram+ Cocos Gram+ Cocos Gram+	(1)

(1) Sem informação disponível.

Foi possível perceber que há uma predominância de cocos Gram-positivo. Um dos possíveis microrganismos presentes poderá ser *Enterococcus*. Estes microrganismos, em carnes processadas, podem sobreviver ao processamento térmico e causar deterioração (Franz *et al.*, 1999). No entanto, há outras bactérias do ácido láctico com a forma de cocos, como os *Lactococcus* e os *Streptococcus* (Stiles & Holzapfel, 1997). Caso as láticas presentes tenham resistido ao tratamento térmico, teriam que estar num baixo número (inferior ao limite de deteção da técnica), pois não foi possível fazer a sua contagem nas amostras após a cozedura. Mas é de salientar que o produto durante os ensaios esteve submetido a 77 °C durante 3 horas no ensaio 1 e durante 40 minutos nos ensaios 2 e 3. Por isso, caso não seja resistente a esta combinação tempo/temperatura, a contaminação do produto terá que ocorrer após o tratamento térmico.

Em suma, comparando-se os resultados ao nível da contagem de bactérias do ácido láctico, entre os ensaios e o tratamento *standard*, obteve-se um menor número de bactérias do ácido láctico nos ensaios 1 e 3, ao longo do tempo, comparativamente ao processamento térmico industrial. O passo de cozedura decorreu durante um tempo mais longo do que na cozedura *standard*. Contudo, nos ensaios decorreu a uma temperatura mais baixa. A fumagem dos ensaios decorreu a um menor tempo do que fumagem no processo industrial. O mesmo aconteceu na secagem sem fumo. Ou seja, o tratamento térmico utilizado num dos ensaios poderá ser utilizado na produção industrial de chouriço corrente, pois, para além de se obterem melhores resultados microbiológicos, é compensatório a nível monetário devido às reduções dos tempos do processamento térmico. No ensaio 3, o valor de a_w é próximo dos valor-alvo, e inferior ao obtido no produto *standard*, e tem um peso superior, por isso, é vantajoso economicamente. A única desvantagem é o aspeto do chouriço que em nenhum dos ensaios ficou enrugado como o chouriço *standard*. Os chouriços dos ensaios ficaram mais cheios/volumosos comparativamente ao *standard*. Contudo, o produto chouriço corrente tem como público-alvo consumidores com baixo poder económico; o preço de uma embalagem de chouriço corrente de 200 g ronda os 0,89 € (loja Lidl). Por isso, poderia ser feito um estudo de mercado para perceber a aceitabilidade do consumidores-alvo a um chouriço com um aspeto ligeiramente diferente. Também seria necessário fazer análises sensoriais. Além disso, ao comparar o tempo total do tratamento térmico, verifica-se que nos ensaios 2 e 3 o processamento térmico foi mais curto relativamente ao processamento *standard*. O tratamento térmico industrial é feito durante aproximadamente 5 h e o dos ensaios 2 e 3 foi de 3h40m. A fumagem nos ensaios também foi mais

reduzida comparativamente à fumagem *standard*. Ou seja, ao aplicar-se a cozedura/secagem destes ensaios, é possível reduzir cerca de mais de 1 h o tempo de tratamento térmico. Isto tem consequências a nível de poupança energética e da quantidade de acendalhas necessária. Um processamento térmico mais curto permitirá fazer mais ciclos de tratamentos térmicos por dia, havendo produção de um número mais elevado de chouriços possibilitando, assim, o aumento da produtividade da empresa. Apesar do alto rendimento do tratamento térmico proporcionado pelas estufas, a cozedura é uma operação de elevado consumo energético (Vemag, 2016). Ou seja, caso se escolhesse o tratamento térmico proposto pelo ensaio 3, com base nos dados obtidos, estar-se-ia a produzir um produto à partida com mais qualidade, em relação ao desenvolvimento de bactérias do ácido láctico, comparativamente ao produto *standard*, ao longo de aproximadamente 1 mês, e também um produto mais barato.

3.3. Implementação de Melhorias nas Boas Práticas de Fabrico na produção de chouriço corrente

Através dos resultados obtidos nos tratamentos térmicos, dos ensaios e da indústria, verificou-se que apenas houve desenvolvimento de bactérias do ácido láctico após o embalamento do chouriço, por isso, colocou-se a hipótese de haver contaminação do produto posteriormente ao tratamento térmico, visto que nesta etapa não houve contagem de bactérias do ácido láctico em nenhuma das amostras. Para testar esta hipótese, realizou-se uma implementação de melhorias nas Boas Práticas de Fabrico ao longo do processo de produção de chouriço corrente. Além de se perceber se o foco da contaminação seria após o tratamento térmico, também se iria testar a hipótese de que a utilização de metodologias de Boas Práticas mais eficazes não permitiria aumentar a quantidade de bactérias do ácido láctico ao longo do processo de produção do chouriço.

3.3.1. Contagens microbiológicas

Tal como demonstrado na Tabela 13, ocorreu redução da carga microbiana entre a picagem e a mistura. Isto está de acordo com estudos anteriormente realizados pela Primor (dados não apresentados). Na mistura ocorre a adição de vários ingredientes, entre os quais antimicrobianos e também ingredientes que diminuem a atividade de água, como o lactato de sódio (Chirife & Fontan, 1980), o que faz com que ocorra a redução de microrganismos. Além do nitrito, o lactato de sódio também tem função antimicrobiana (FBC industries, Inc., 2009).

Após a maturação, a quantidade de bactérias do ácido láctico aumentou. Durante esta produção, a maturação ocorreu durante mais horas do que o habitual, pois decorreu em dias de fim-de-semana. A maturação permite que haja a estabilização da massa da carne com os ingredientes. Se, por um lado, a maturação permite que os conservantes atuem ao longo desta etapa, por outro, caso a carga microbiana seja elevada, a quantidade de conservante pode não ser suficiente para reduzir a quantidade de bactérias do ácido láctico presentes; estas podem conseguir crescer caso sejam resistentes aos conservantes ou caso os conservantes não sejam específicos para este tipo de bactérias, visto que algumas espécies de bactérias do ácido láctico podem ser resistentes ao nitrito (Dodds & Collins-Thompson, 1984).

Tabela 13. Quantidade de bactérias do ácido láctico (UFC/g) ao longo de várias etapas da produção de chouriço; contagem de microrganismos totais a 30 °C obtidos por contaminação ambiental.

Etapa	Quantidade de bactérias do ácido láctico (UFC/g)		Contaminação ambiental
	Produção Standard	Produção Controlo	Microrganismos a 30 °C (UFC/placa)
Picagem	- - -	3,1E+06 1,2E+05 3,7E+06	6
Mistura	- - -	1,6E+05 1,5E+05 1,2E+05	-
Maturação	- - -	4,1E+06 3,6E+06 3,6E+06	-
Enchimento	1,4E+06 1,9E+06 9,3E+05	3,1E+06 2,5E+06 2,7E+06	8
Antes da Cozedura de Secagem	-	-	5
Cozedura e Secagem	4,0E+02 6,9E+02 3,1E+02	1,8E+02 1,4E+02 <1,0E+01	22
Antes da Estabilização em Clima	-	-	15
Estabilização em Clima	1,7E+02 8,2E+01 8,2E+01	2,8E+02 7,8E+02 2,3E+02	1
Embalamento	9,0E+01 6,3E+04 1,5E+02	8,0E+01 4,0E+01 2,0E+01	1
aw	0,932	0,926	
pH	6,06	6,08	

(--sem dados)

Na remessa controlo a carga de bactérias do ácido láctico manteve-se desde a maturação até ao enchimento. Observando a Tabela 13, também se pode perceber que a quantidade de bactérias do ácido láctico nas amostras da remessa *standard* foi semelhante à da remessa controlo.

Antes da passagem da remessa controlo pelos diferentes equipamentos, realizou-se o procedimento ATP para garantir a correta higienização. Ou seja, como a remessa *standard* era processada depois da remessa controlo, também passava pelos equipamentos e utensílios higienizados corretamente. Provavelmente, terá sido isto que fez com que os valores da quantidade de bactérias do ácido láctico tenham sido próximos. Também se pode perceber que entre duas remessas que sejam seguidamente enchidas, não seja necessário a higienização da enchedora entre as remessas visto que ocorre o enchimento do mesmo tipo de massa. Neste caso, obteve-se a mesma carga microbiana para as amostras das duas remessas. Isto é possível desde que nas etapas anteriores tenha ocorrido uma correta higienização dos equipamentos e a aplicação de Boas Práticas.

Após o período de espera dos carros com chouriço para dar entrada na estufa, não se fez contagem de bactérias do ácido láctico porque o tempo de espera foi inferior a 1 hora e 1 hora não será suficiente para que ocorra um elevado desenvolvimento de BAL.

Tanto no carro controlo como no carro *standard*, após o tratamento térmico, ocorreu a redução da carga microbiana. No entanto, não ocorreu a redução total de bactérias do ácido láctico. Apenas ocorreu a redução de 4 log UFC/g, havendo ainda a contagem de bactérias. Isto pode dever-se ao facto da quantidade de bactérias do ácido láctico ser elevada na matéria-prima, como se pode verificar na Tabela 13, através da quantidade de bactérias do ácido láctico nas amostras após picagem. Após

cozedura e secagem, a quantidade de bactérias do ácido láctico nas amostras do carro controlo foram próximas às do carro *standard*, apesar de numa amostra controlo não ter havido o aparecimento de colónias.

O tempo de estabilização da temperatura dos carros com chouriço para entrarem no clima foi de 1h30m. No local de estabilização, a temperatura não é controlada. O chouriço é deixado arrefecer no exterior do clima. Isto acontece para que não haja a subida de temperatura no interior do clima e para que não aumente o tempo de estabilização dos restantes chouriços, pois no clima a temperatura e humidade são controladas. Como o período de espera foi curto, não se fez contagem de lácticas antes da entrada no clima. Desde o processamento térmico até ao final da estabilização em clima, a carga de bactérias do ácido láctico manteve-se igual, tanto no carro controlo como no carro *standard*. A quantidade de bactérias do ácido láctico nas amostras controlo foram próximas às das amostras *standard*. Entre a estabilização em clima e o embalamento, ocorreu o aumento da quantidade de bactérias do ácido láctico nas amostras do carro *standard*, enquanto que nas amostras do carro controlo ocorreu redução. O aumento da quantidade de bactérias do ácido láctico nas amostras *standard* poderá ter sido devido ao manuseamento por parte dos manipuladores (McAuley *et al.*, 2012). Também se pode verificar que a quantidade de bactérias do ácido láctico nas amostras controlo foi significativamente diferente ($p \leq 0,05$) à concentração nas amostras *standard*.

3.3.2. pH e atividade de água

Os valores de pH e a_w das amostras controlo e *standard* estavam próximos, apesar de que o valor de a_w da amostra controlo estava ligeiramente mais baixo em relação ao *standard*. Ambos os valores de a_w não ficaram dentro do intervalo objetivo, mas estavam próximos. Os valores de pH dos chouriços foram baixos, o que está de acordo com o pH tipicamente ácido deste produto.

3.3.3. Contaminação ambiental

Os critérios estabelecidos pela Primor para a contaminação ambiental são: satisfatório se ≤ 10 UFC/placa; aceitável se 10 – 30 UFC/placa; e não satisfatório se >30 UFC/placa. Ao observar a Tabela 13, é possível verificar que nenhum valor de contagem de microrganismos a 30 °C, resultante da contaminação ambiental, foi não satisfatório. Na zona das estufas e no corredor dos climas os valores da contagem de microrganismos foram aceitáveis, sendo que nos restantes locais os valores foram satisfatórios. A zona das estufas e o corredor dos climas são locais não isolados. Se por um lado, uma das possíveis fontes de contaminação do produto é a contaminação ambiental, por outro, o produto tem tripa, que o protege.

3.3.4. Procedimento ATP

No procedimento ATP realizado na indústria, leituras inferiores a 100 URL indicam que a superfície está limpa, entre 101 e 150 URL que não está adequadamente higienizada e quando superior a 150 URL considera-se que a superfície está contaminada. Na sala de embalagem, leituras inferiores a 5 URL indicam que a superfície está limpa, entre 6 e 13 URL indicam que não está adequadamente

higienizada e quando superior a 13 URL considera-se que a superfície está contaminada. Sempre que as leituras davam valores de contaminação, fazia-se novamente a limpeza da superfície até se obter valores abaixo dos 150 e dos 13 URL na indústria e na sala de embalagem, respetivamente. O produto não contactou com nenhuma superfície que estivesse contaminada o que, em princípio, garantiu que não houvesse o aumento na quantidade de bactérias do ácido láctico.

3.3.5. Temperaturas das matérias e locais

Durante a monitorização da produção, também se verificou a temperatura do produto controlo e o tempo a que decorreram as várias etapas. Antes e após a picagem, uma das matérias-primas desviava-se, ligeiramente, dos valores limite de temperatura - cerca de 3 °C. A mistura decorreu durante o tempo estipulado e, após a mistura, a temperatura estava próxima dos limites (0 – 5 °C). A temperatura da massa de carne no final da maturação estava a 2,4 °C, ou seja, a uma temperatura adequada. Durante a cozedura, o interior do produto atingiu a temperatura objetivo. Na Figura 8 é possível visualizar a temperatura atingida no chouriço controlo ao longo do tratamento térmico. Este tratamento durou cerca de 5 horas, até atingir os 75 °C no interior do chouriço. A temperatura máxima atingida foi a de cozedura, em que o interior do produto esteve entre 75 e 75,5 °C durante 21 minutos. Esta combinação tempo/temperatura geralmente é suficiente para eliminar a maioria dos microrganismos (FDA, 2015a). No entanto, durante este tratamento térmico não foi possível reduzir totalmente as bactérias do ácido láctico, como já mencionado anteriormente.

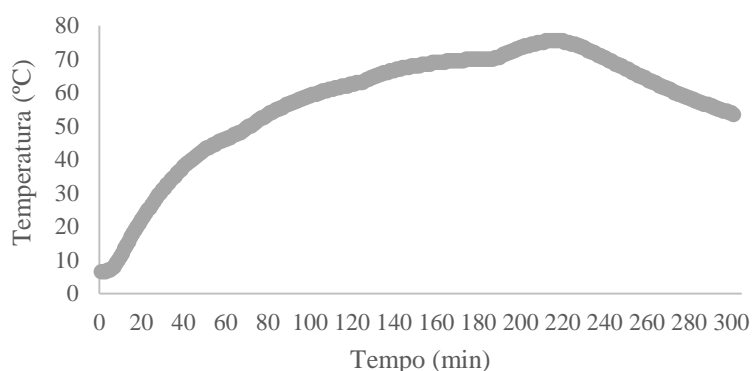


Figura 8. Temperatura (°C) atingida no interior do chouriço controlo ao longo do tratamento térmico.

Seria necessário que a cozedura ocorresse a temperaturas mais elevadas ou por um período mais longo, no entanto, adulterava as características organolépticas deste tipo de produto.

A temperatura do clima estava de acordo com a temperatura estipulada e o tempo em que o produto esteve no interior do clima foi de acordo com o tempo médio de estabilização (24 – 36h). A temperatura na sala de embalagem estava próxima dos 15 °C. No entanto, deveria estar mais baixa visto que é um local de possível contaminação pelos manipuladores e não há mais nenhuma etapa em que ocorra a eliminação dos microrganismos. A remessa *standard* era submetida às diferentes etapas logo após a remessa controlo passar nos vários equipamentos. Por isso, os tempos de espera que existiram ao longo do processo produtivo e as temperaturas a que ocorriam as várias etapas foram semelhantes para o produto *standard* e o produto controlo.

3.3.6. Comparação do protocolo de Boas Práticas vigente com o protocolo de Implementação de Melhorias nas Boas Práticas durante o embalamento

Analisando os dados da Tabela 13, percebe-se que a etapa onde houve mais diferenças entre o chouriço *standard* e o chouriço controlo foi no embalamento. Além de se terem obtido diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na quantidade de lácticas entre as amostras *standard* e controlo, também houve um aumento do número de lácticas nas amostras *standard* durante essa etapa. Portanto, fez-se uma comparação entre os procedimentos de monitorização já implementados e os aplicados durante este processo de produção de chouriço. Na Tabela 14, pode verificar-se que a média do número de bactérias do ácido láctico obtida nas amostras *standard* é superior comparativamente à média obtida nas amostras controlo. No entanto, também é de salientar que o desvio-padrão das amostras *standard* é superior ao desvio-padrão das amostras controlo.

Tabela 14. Quantidade de bactérias do ácido láctico (UFC/g) das amostras *standard* e controlo, obtidas após embalamento, com respetivas médias e desvios-padrão.

ETAPA Produto	EMBALAMENTO	
	Standard	Controlo
Concentração de bactérias do ácido láctico (UFC/g)	9,0E+01	8,0E+01
	6,3E+04	4,0E+01
	1,5E+02	2,0E+01
Média	2,1E+04	4,7E+01
Desvio-Padrão	4,E+04	3,1E+01

Uma das principais diferenças do protocolo aplicado no presente estudo é uma nova especificação na limpeza dos equipamentos, utensílios e mesas, aplicando diferentes metodologias consoante os equipamentos e utensílios. Cada utensílio ou equipamento é diferente, pois têm características distintas e, por isso, a metodologia de limpeza também terá que ser diferente. É ainda de salientar que o protocolo aplicado às tesouras, tapete da embaladora e máquina de corte de chouriço no presente estudo é mais simples do que o protocolo implementado para equipamentos, utensílios e mesas, que é um procedimento geral. O desinfetante aplicado durante o presente trabalho também foi distinto. Caso se reforce a formação aos funcionários e se façam chegar protocolos com especificações mais detalhadas para cada utensílio, talvez se consiga fazer com que haja evolução na implementação de melhorias nas Boas Práticas de Fabrico e também com que não haja contaminação por bactérias do ácido láctico. A monitorização de higiene no protocolo aplicado neste estudo também apresenta mais especificações do que no protocolo implementado. O controlador do processo deverá verificar a mudança de luvas constante e assegurar que o manipulador que transportar os carros não manuseia os chouriços.

O uso de máscara nos locais onde o chouriço está exposto ao ar, como na sala de embalagem, é um requisito que deve ser reforçado no protocolo de higiene, embora todos os trabalhadores aplicam esta prática.

Na lista de verificação de pré-requisitos não estava mencionada a temperatura de aceitação para a sala de embalagem.

Todo o procedimento de monitorização descrito na metodologia foi realizado. Será necessário repetir o procedimento realizado no presente trabalho para confirmar se o mesmo resultou na diminuição do

número de bactérias do ácido láctico no final do processo, comparativamente com a produção *standard*.

3.3.7. Caracterização das colónias

Na Tabela 15 é possível visualizar as características das colónias, relativamente à morfologia e ao Gram, presentes nas amostras analisadas da remessa *standard* e da remessa controlo, recolhidas em várias etapas. Como os microrganismos cresceram em meio MRS, são Gram-positivo e negativos para os testes da catalase e oxidase, confirmou-se a presença de BAL nas amostras. Observando a Tabela 15, percebe-se que há uma predominância de cocos Gram-positivo, principalmente nas amostras *standard*. Nas amostras controlo, em determinadas etapas, apenas se desenvolveram bacilos. Ou seja, tal como referido em 3.2.5., podem estar presentes as bactérias *Enterococcus*, como também bactérias do ácido láctico de deterioração em forma de bacilos.

Tabela 15. Caracterização dos microrganismos (morfologia e Gram) presentes nas amostras, em que se realizou análise microbiológica, nas etapas de produção de chouriço corrente

Etapa	Amostras	
	<i>Standard</i>	Controlo
Picagem	(1)	Bacilos Gram+ Bacilos Gram+ Bacilos Gram+
Mistura	(1)	Bacilos, Cocos Gram+ Cocos, Cocobacilos Gram+ Bacilos, Cocos Gram+
Maturação	(1)	Bacilos, Cocos Gram+ Cocos Gram+ Cocos Gram+
Enchimento	Cocos Gram+ Cocos Gram+ Bacilos Gram+	Bacilos Gram+ Bacilos Gram+ Cocobacilos Gram+
Cozedura e Secagem	Cocos Gram+ Cocos Gram+ Cocos Gram+	Cocos Gram+ Bacilos Gram+ Sem colónias
Estabilização em Clima	Cocos, Cocobacilos Gram+ Cocos Gram+ Cocos Gram+	Bacilos Gram+ Bacilos Gram+ Bacilos Gram+
Embalamento	Cocos, Cocobacilos Gram+ Bacilos Gram+ Cocos Gram+	Cocos Gram+ Cocos Gram+ Cocos Gram+

(1) Não se realizou amostragem

Vários estudos reportam a presença de enterococos no chouriço, assim como outros tipos de BAL. Segundo o estudo de Matos *et al.* (2013), foi detetada a presença de *Enterococcus* na flora microbiana de chouriços portugueses com características sensoriais anormais ao longo do tempo de vida útil. Num outro estudo, Matos *et al.* (2006) demonstrou a presença de *Ent. faecium* e *Ent. faecalis* em dois tipos de chouriços portugueses após o tempo de vida útil em embalagem de atmosfera modificada. Este estudo também identificou *Pediococcus* num dos tipos de chouriço. Matos *et al.* (2008), além de isolarem *Enterococcus* e *Pediococcus* de chouriços portugueses, também isolaram *Lactobacillus*. A espécie *Ent. faecalis* foi identificada num chouriço português por Ribeiro *et al.* (2011). Gonçalves (2009) isolou estirpes das espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus sakei* de um chouriço e do ambiente fabril de duas unidades de produção portuguesas. Uma grande variedade de bactérias do ácido láctico estavam presentes nas amostras e,

além de não serem totalmente eliminadas com o tratamento térmico, pode ainda ocorrer a contaminação no produto após esta etapa.

3.4. Chouriço com quitosano



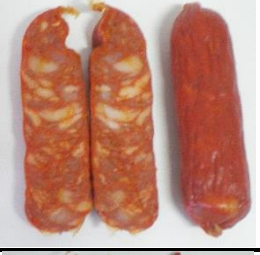



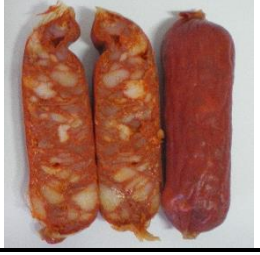



Com o objetivo de substituir os antimicrobianos químicos por antimicrobianos naturais num produto alimentar, elaborou-se um chouriço com quitosano, substituindo-se o nitrito de sódio. Além de se pretender verificar se haveria diferenças em termos de aspeto, pois o nitrito proporciona a cor de carne curada avermelhada (EFSA, 2003), pretendia-se também testar se haveria uma redução no número de bactérias do ácido láctico e microrganismos totais no chouriço com quitosano comparativamente com o chouriço *standard*. Verificou-se o efeito do quitosano nas láticas porque são dos principais microrganismos presentes no chouriço corrente e em microrganismos totais a 30 °C porque faz-se contagem destes microrganismos frequentemente em produtos da Primor e também quando se faz a validação de um novo produto. A escolha do antimicrobiano natural quitosano deveu-se à elevada atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivo, Gram-negativo e fungos (Capítulo 1). Além da capacidade antibacteriana, o quitosano possui capacidade antioxidante (Kamil *et al.*, 2002), por isso, pode retardar a oxidação de lípidos e inibir o crescimento de microrganismos de deterioração na carne durante o seu armazenamento (No *et al.*, 2007). Investigadores (Youn *et al.*, 2000, 2001) estudaram o possível papel do quitosano como agente de cura nos enchidos, em vez de nitrito de sódio, e concluíram que a adição de quitosano pode reduzir ou substituir a utilização de nitritos, sem afetar o efeito conservante e desenvolvimento de cor. Sabendo que *Clostridium* é um dos microrganismos mais preocupantes nos enchidos e que o chouriço da Primor tem o pH próximo de 6, foi usada uma concentração de quitosano de 0,15% (m/m) uma vez que o isolado *Clostridium perfringens* 1.19 foi inibido numa concentração de quitosano de 0,15% (m/v), nas condições de meio a pH 6 (Capítulo 1). Como as condições de armazenamento do chouriço corrente são em local fresco e seco, se se considerarem as temperaturas de 12 e 20 °C e o pH do meio de 6, verificou-se, pelos resultados descritos no Capítulo 1, que são vários os microrganismos a serem inibidos pelo quitosano nessa concentração. Na elaboração do chouriço com quitosano, pretendia-se apenas substituir o nitrito de sódio pelo quitosano, sem alterar as quantidades dos restantes ingredientes adicionados. Por isso, para se obter no produto final a concentração de 0,15% (m/v), foi retirada quase toda a quantidade de água utilizada na massa de chouriço *standard*. Ou seja, esta concentração de quitosano foi a concentração máxima conseguida nestas condições de formulação do produto. Caso se pretendesse utilizar uma concentração superior, teria que se ajustar as quantidades de outros ingredientes.

Após a mistura dos ingredientes, as condições do processo foram as mesmas para a produção do chouriço *standard* e do chouriço com quitosano.

3.4.1. Características organoléticas

Visualmente, o chouriço com quitosano não teve diferenças, nas características organoléticas exteriores e interiores, comparativamente com o chouriço *standard* ao longo de 77 dias de armazenamento, tal como se pode observar na Tabela 16.

Tabela 16. Imagens demonstrando o aspeto visual do chouriço *standard* e chouriço com quitosano, ao longo de 77 dias

Dias de armazenamento	Chouriço <i>standard</i>	Chouriço com quitosano
0		
21		
35		
49		
63	Chouriço com embalagem opada	
77	Chouriço com embalagem opada	

Exteriormente e interiormente, a cor e cheiro do chouriço com quitosano ficou igual à do chouriço *standard* e manteve-se ao longo dos vários dias de armazenamento. O seu aspeto era avermelhado e brilhante denotando uma coloração e cheiro típicos resultantes do processo de fumagem. Tinha ainda uma consistência firme, a tripa sem roturas e bem aderente à massa, tal como acontece com o chouriço corrente *standard*. Interiormente, o chouriço com quitosano tinha a massa perfeitamente

ligada, de aspeto marmoreado, com distribuição regular dos pedaços de carne e gordura, de cor avermelhada e branca, assim como o chouriço de carne corrente *standard*. O enchido com quitosano tinha ainda o cheiro semelhante ao do chouriço *standard* (NP 589:2008). Foi possível manter a cor avermelhada do chouriço devido, em parte, à presença de pimentão e outros agentes de cor e a adição de quitosano não provocou alteração da cor. Portanto, durante 77 dias de armazenamento não é necessário a presença do nitrito de sódio para o desenvolvimento e manutenção da cor avermelhada no chouriço corrente (Youn *et al.*, 2000, 2001).

Apesar de ambos os chouriços terem a cor e cheiro idênticos, no corte oblíquo, existe uma maior firmeza/rijeza no chouriço com quitosano comparativamente ao chouriço corrente *standard*. No entanto, não é uma característica desvantajosa para o chouriço visto que as restantes características visuais estão de acordo com o chouriço corrente. Aos 63 dias de armazenamento, o chouriço *standard* ficou com a embalagem opada (com CO₂), o que é uma indicação de contaminação por BAL (Baldus & Deibel, 2012). Por outro lado, até aos 77 dias de armazenamento, o chouriço com quitosano não estava com a embalagem opada. Dado que esta observação já ocorreu pós-estágio, não foi possível realizar análises microbiológicas que confirmem efetivamente a presença ou ausência de BAL. Ou seja, em princípio, o chouriço com quitosano não estaria contaminado com bactérias do ácido láctico ou, caso estivesse, poderia haver contaminação através de bactérias heterofermentativas em pequeno número, não ocorrendo produção de muita quantidade de dióxido de carbono ou, então, contaminado com bactérias homofermentativas, as quais não produzem este gás (FAO, 2016a). O quitosano poderá estar a ter efeito antimicrobiano nas bactérias heterofermentativas.

3.4.2. Contagens microbiológicas

Tal como se pode observar na Tabela 17, ao fim de 14 dias após o embalamento, ou seja, 14 dias de vida útil, foi demonstrado que as amostras de chouriço com quitosano tinham uma quantidade de bactérias do ácido láctico e de microrganismos a 30 °C inferiores comparativamente com amostras de chouriço *standard*.

Tabela 17. Quantidade de bactérias do ácido láctico e de microrganismos totais a 30 °C (UFC/g), valores de pH e atividade de água de amostras de chouriço *standard* e com quitosano, após embalamento e após 14 dias do embalamento

	Chouriço <i>standard</i>	Chouriço com quitosano
Após embalamento		
Quantidade de bactérias do ácido láctico (UFC/g)	8,2E+01	<1,0E+01
	4,5E+01	<1,0E+01
	8,2E+01	6,4E+01
Quantidade de microrganismos totais a 30 °C (UFC/g)	2,0E+02	1,6E+02
	4,3E+02	2,4E+02
	2,4E+02	2,5E+02
pH	6,15	5,95
Atividade de água	0,93	0,93
Após 14 dias do embalamento		
Quantidade de bactérias do ácido láctico (UFC/g)	2,5E+02	9,1E+01
	2,6E+02	1,2E+02
	5,5E+02	6,4E+01
Quantidade de microrganismos totais a 30 °C (UFC/g)	1,6E+02	<1,0E+01
	1,7E+03	1,0E+01
	2,7E+01	<1,0E+01
pH	6,07	6,08
Atividade de água	0,95	0,95

Certos compostos antimicrobianos apenas têm efeito ao longo do tempo de vida útil do produto. Assim como aconteceu no estudo de Casquete *et al.* (2016b) em que o quitosano a 0,3% reduziu a contagem de bactérias patogénicas em alheira de 2 a 3 log UFC/g durante os primeiros sete dias de armazenamento. Após o embalamento dos chouriços, a quantidade de bactérias do ácido láctico foi inferior no chouriço com quitosano comparativamente com o chouriço *standard*. Já a quantidade de microrganismos totais a 30 °C no chouriço com quitosano foi próxima do chouriço *standard*. No entanto, como o quitosano tem efeito antimicrobiano ao longo do tempo de armazenamento (Casquete *et al.*, 2016b; Sagoo *et al.*, 2002) para certos microrganismos, poderá ser esta uma hipótese para o facto da contagem após 14 dias do embalamento ter sido diferente. A quantidade de BAL no chouriço com quitosano aumentou ligeiramente desde o embalamento até aos 14 dias. Por outro lado, a quantidade de microrganismos totais a 30 °C diminuiu durante os 14 dias nas amostras do enchido com quitosano. Nas amostras de chouriço *standard*, a quantidade de lácticas aumentou ligeiramente. Também se verificou que a quantidade de microrganismos totais a 30 °C das amostras de chouriço *standard* após embalamento se manteve próxima à das amostras após 14 dias do embalamento, o que diferiu nas amostras de chouriço com quitosano em que ocorreu a diminuição da concentração. Segundo estudo de Casquete *et al.* (2016b), após adicionar quitosano (3% m/v) a uma alheira de vitela, verificaram que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) na contagem de lácticas indígenas na alheira controlo e na alheira com quitosano, ao longo do período de armazenamento. Após 5 dias de armazenamento a 4 °C, os níveis de bactérias do ácido láctico aumentaram aproximadamente 3 log UFC/g para ambas as alheiras. Estas quantidades mantiveram-se até ao final dos 60 dias de armazenamento. No presente estudo, após 14 dias de armazenamento num local fresco e seco, a carga de lácticas apenas aumentou, aproximadamente, 1 log UFC/g nas amostras de chouriço com e sem quitosano. Como não se fez contagem ao longo de mais tempo de armazenamento, não se tem informação acerca do comportamento antimicrobiano do quitosano contra lácticas no chouriço ao longo do tempo. Contudo, o tipo de carne utilizado neste trabalho é diferente do tipo de carne utilizado no estudo de Casquete *et al.* (2016b), e, por isso, o tipo de BAL presente poderá ser diferente e o efeito antimicrobiano de quitosano contra as bactérias também ser distinto. A matriz cárnica, constituída por gordura, proteínas e hidratos de carbono, também pode influenciar o efeito do quitosano (Devlieghere *et al.*, 2004). Um estudo de Roller *et al.* (2002) demonstrou que os níveis de BAL indígenas e de microrganismos totais em salsichas de porco, inoculadas com quitosano numa concentração de 0,6%, não diminuiu após 24 dias de armazenamento a 4 °C. Ao contrário do que aconteceu no presente estudo, em que a concentração de microrganismos totais no chouriço com quitosano diminuiu após 14 dias de armazenamento. Segundo estudo de Soutos *et al.* (2008), no dia 1 de armazenamento, as contagens de bactérias do ácido láctico foram, aproximadamente, 1 e 1,5 log UFC/g inferiores em amostras de salsicha de porco fresca com quitosano a 0,5% e 1%, respetivamente, do que em amostras de salsicha com nitrito com uma concentração de 150 ppm. Após 14 dias de armazenamento, as contagens de lácticas foram, aproximadamente, 1 e 2 log UFC/g inferiores em amostras com quitosano a 0,5% e 1%, respetivamente, do que em amostras com nitrito. No presente estudo, tanto após embalamento como após 14 dias de armazenamento, o nível de lácticas nas amostras com quitosano foi,

aproximadamente, 1 log UFC/g inferior comparativamente às amostras *standard* (com nitrito). Soutos *et al.* (2008) também demonstrou que após 1 e 14 dias de armazenamento, as contagens de microrganismos totais foram, aproximadamente, 1 log UFC/g inferiores em salsichas com quitosano a 0,5% e 1% do que em salsichas com nitrito. No presente trabalho, não houve diferenças nas contagens de microrganismos totais após embalagem entre o chouriço *standard* e o chouriço com quitosano, mas após 14 dias de embalagem, a carga de microrganismos totais foi, aproximadamente, 1 a 2 log UFC/g inferior no chouriço com quitosano do que no chouriço *standard*. No entanto, neste trabalho utilizou-se uma concentração de quitosano inferior às concentrações utilizadas por Soutos *et al.* (2008). Este autor também fez comparação de contagem microbiana em amostras de salsicha com nitrito e amostras sem nitrito e demonstrou que a adição de 150 ppm de nitrito não teve nenhum efeito detetável sobre o crescimento microbiano, tanto de microrganismos totais como de lácticas, em salsichas. Neste trabalho, o nitrito também não parece ter efeito contra bactérias do ácido láctico visto que ocorre o aumento da sua concentração ao longo dos 14 dias de armazenamento. As diferenças entre os resultados nos estudos podem dever-se às diferenças na formulação do produto, que pode influenciar a atividade antimicrobiana do quitosano (Devlieghere *et al.*, 2004).

3.4.3. pH e atividade de água

O pH do chouriço com quitosano teve um valor ligeiramente inferior comparativamente com o chouriço *standard*, logo após o embalagem. A solução de quitosano contém vinagre (ácido acético), o que faz com que haja a diminuição do pH. O facto do pH do chouriço com quitosano ser mais ácido é uma vantagem, pois a pH mais ácido menos microrganismos de deterioração se desenvolvem (FAO, 2016a). Além disso, já foi reportado que valores de pH mais baixos aumentam a atividade antimicrobiana do quitosano (Casquete *et al.*, 2016b). Após 14 dias de armazenamento, os valores de pH dos chouriços *standard* e com quitosano estão próximos. Segundo Casquete *et al.* (2016b), também não foram significativamente diferentes os valores de pH entre amostras de alheira com e sem quitosano. O valor de atividade de água foi igual para os dois tipos de chouriço e é um valor próximo do limite objetivo de a_w para o chouriço corrente, após embalagem. Após 14 dias de armazenamento, o valor de a_w foi igual entre o chouriço *standard* e o chouriço com adição de quitosano, e não diferiu muito com os valores de a_w obtidos logo após o embalagem, tal como acontece no estudo de Casquete *et al.* (2016b), que não se verificou diferenças de a_w entre amostras de alheira com e sem quitosano. No entanto, neste trabalho os valores de a_w não estavam dentro do valor limite objetivo para o chouriço corrente, mas não era muito discrepante.

3.4.4. Vantagens vs Desvantagens

Como apenas se fez contagem de microrganismos após embalagem e após 14 dias de armazenamento, seria necessário fazer contagens ao longo de mais dias para confirmar a hipótese de que o quitosano tem igual ou maior efeito antimicrobiano do que o nitrito contra BAL e microrganismos totais visto que o tempo de vida útil do chouriço corrente é de 180 dias. No entanto, pelos resultados obtidos, é possível concluir que o quitosano teve efeito antimicrobiano contra,

principalmente, microrganismos totais, ao contrário do nitrito. Logo após embalagem, a quantidade de bactérias do ácido láctico do chouriço com quitosano foi inferior ao do chouriço com nitrito, apesar de ter aumentado após 14 dias. Contudo, a este tempo, a carga de bactérias do ácido láctico no chouriço com quitosano foi ligeiramente inferior ao do chouriço *standard*. Por este motivo, e pelo facto de o chouriço com quitosano não ter diferenças em termos de características organoléticas visuais e odorais com o chouriço corrente, o nitrito de sódio poderá, futuramente, ser substituído pelo quitosano ou então haver redução da quantidade aplicada deste conservante químico. O quitosano tem vantagens visto que é um conservante natural, uma alternativa *clean label*. Caso houvesse a substituição dos restantes ingredientes químicos por ingredientes naturais, poder-se-ia tornar o chouriço num produto totalmente *clean label*.

Consoante as características do quitosano, como o peso molecular ou o grau de desacetilação, o preço do produto pode variar. No entanto, é possível encontrar quitosano por 20 a 50 \$/Kg (Alibaba Group, 2016a;b;c) e um produto de nitrito de sódio pode custar 0,47 a 10 \$/Kg (Alibaba Group 2016d;e;f). Ficou definido aplicar 0,05 Kg de quitosano por cada Kg de massa de produto, enquanto que a quantidade de nitrito de sódio a aplicar corresponde a aproximadamente 0,003 Kg. Considerando o produto de quitosano de 20 \$/Kg, então o custo de quitosano por cada Kg de massa é de aproximadamente 0,89 € e caso se considere que o produto de nitrito custa 0,47 \$/Kg, então o custo de nitrito por Kg de massa é de cerca de 0,0009 €. Portanto, o chouriço com quitosano ficará com um preço mais elevado. Numa embalagem de 200g, o preço aumentaria, pelo menos, 0,18 €. Também se utilizou uma quantidade superior de quitosano, substituindo-se pela água (que é um composto económico).

Uma das desvantagens de utilizar compostos naturais é o facto de poder ser necessário utilizar quantidades mais elevadas comparativamente com os compostos químicos para a obtenção dos mesmos resultados (Carocho *et al.*, 2015). No entanto, se houvesse a divulgação do chouriço como um produto sem nitritos e mais natural, poder-se-ia aumentar o número de consumidores. Por outro lado, como já referido anteriormente, os principais consumidores do chouriço corrente são pessoas com baixo poder económico e o aumento do preço do produto poderia ser uma desvantagem. Por isso, poder-se-ia experimentar substituir o nitrito pelo quitosano num produto em que o grupo de consumidores-alvo seja uma população com mais elevado poder económico, em que a diferença de preço aplicada não seja motivo para deixar de adquirir o produto. Portanto, é possível elaborar um produto mais seguro e que seja possível de entrar no mercado.

3.4.5. *Relação do consumo de quitosano e manutenção da concentração de colesterol LDL*

Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), existe uma relação de causa e efeito entre o consumo de quitosano e a manutenção da concentração normal de colesterol LDL no sangue. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) transportam o colesterol do fígado para tecidos periféricos, incluindo artérias. O elevado colesterol LDL, por convenção superior a 160 mg/dL, pode comprometer a estrutura e função normais das artérias. Portanto, a manutenção de concentrações normais no sangue do colesterol LDL é um efeito fisiológico benéfico. A fim de se obter esse efeito, 3 g de quitosano devem ser consumidas diariamente (EFSA, 2011a). Caso se

considere a adição de 50 g de quitosano por cada Kg de massa de chouriço, então num chouriço, que pese cerca de 100 g, tem-se 5 g de quitosano. Para se ingerir 3 g de quitosano, tem que se consumir 60 g de chouriço por dia, ou seja, tem que se consumir mais de metade (60%) de um chouriço. No entanto, esta quantia é bastante elevada para ser ingerida diariamente. O consumo médio de carne vermelha, por aqueles que a consomem, é de cerca de 50 a 100 g por pessoa por dia. Menos informação está disponível sobre o consumo de carne processada (Bouvard *et al.*, 2015). Contudo um estudo realizado à população adulta da cidade do Porto, pela parceria entre o Serviço de Higiene e Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, refere que o consumo mensal (entre uma a quatro vezes por mês) de fiambre, chouriço, salpicão, presunto e outros enchidos foi mencionado por 41,2% das mulheres e 38,9% dos homens (Lopes *et al.*, 2006). No entanto, segundo a Organização Mundial de Saúde, o consumo diário de 50 g de carne vermelha ou processada aumenta o risco de cancro de colorretal em 18% (World Health Organization, 2015). Portanto, para se obter o efeito de manutenção da concentração normal de colesterol LDL através do consumo diário de 3 g de quitosano, a quantidade de quitosano adicionado ao chouriço poderia ser aumentada de modo a ser necessário ingerir menos quantidade do enchido diariamente. Por outro lado, também se poderia substituir o nitrito pelo quitosano num produto constituído por carnes brancas, que não seja tão processado. Assim, o produto não é tão prejudicial para a saúde e a adição de quitosano permitirá, não só manter a concentração normal do colesterol LDL, como também fará com que o produto seja mais seguro microbiologicamente e saudável, havendo uma maior aderência dos consumidores.

3.4.6. O quitosano e a legislação

Existem vários estudos acerca da aplicação do quitosano como antimicrobiano em alimentos, no entanto, este não faz parte da lista positiva de aditivos alimentares permitidos na União Europeia (EFSA, 2011). Contudo, o quitosano poderá ser aplicado como ingrediente, visto que este composto atualmente é aplicado como um ingrediente em vários vinhos. Por outro lado, o quitosano é permitido no Japão e na Coreia (Kong *et al.*, 2010). Deste modo, é possível exportar produtos com quitosano para estes países. Adicionalmente, a Primor produz, para países diferentes, produtos com alguns ingredientes diferentes daqueles que são vendidos em Portugal.

4. Conclusões

Foi possível concluir, ao longo do presente trabalho, que, tanto em amostras de chouriço com embalagem opada como não opada, estavam presentes bactérias do ácido láctico, predominantemente em forma de cocos. Também foi possível verificar neste trabalho, que submetendo o chouriço a uma cozedura de 77 °C durante 40 minutos, com 100% de humidade e a chaminé da estufa semi-aberta, obteve-se uma menor quantidade de BAL após embalamento comparativamente com o chouriço submetido ao tratamento *standard*. Além disso, o tratamento térmico aplicado neste trabalho é uma alternativa mais económica comparativamente com o tratamento térmico *standard*. Neste estudo demonstrou-se ainda que a implementação de melhorias das Boas Práticas de Fabrico ao longo do processo de produção de chouriço, reforçando

metodologias específicas de limpeza, procedimentos de ATP e maior controle das operações de fabrico, permitiu obter um produto final com um número de BAL mais reduzido do que o produto elaborado sem monitorização. No presente trabalho demonstrou-se que o chouriço com quitosano (0,15% m/m) após 14 dias de vida útil, armazenado em local fresco e seco, teve uma quantidade de BAL e de microrganismos totais inferiores ao chouriço com nitrito de sódio. Além disso, ao longo de 77 dias de armazenamento as características organolépticas visuais e odorais do chouriço com quitosano mantiveram-se similares ao do chouriço *standard*. Após 63 dias de vida útil, a embalagem do chouriço *standard* estava opada enquanto isso não aconteceu ao chouriço com quitosano nos 77 dias de armazenamento. Com estes resultados, demonstrou-se que o quitosano poderá ser uma alternativa *clean label* do nitrito de sódio.

Conclusões gerais

Através do estudo desenvolvido no Capítulo 1, concluiu-se que o quitosano, o propólis e a nisina têm atividade antimicrobiana a diferentes condições de pH e temperatura contra vários microrganismos testados. Foi possível demonstrar que o quitosano inibiu os microrganismos Gram-negativo e fungos testados e a maioria dos Gram-positivo. Com a concentração de 0,65% (m/v) de quitosano inibiu-se a maioria dos microrganismos testados às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e nas condições de pH 5, 6 e 7. O extrato etanólico de propólis inibiu os fungos e a maioria dos Gram-positivo. No entanto, apenas inibiu alguns Gram-negativo. Com a concentração de 10 mg/mL de propólis inibiu-se os fungos, a maioria dos microrganismos Gram-positivo e os Gram-negativo, para os quais o propólis tem efeito inibitório, nas diferentes temperaturas e condições de pH. A nisina inibiu a maioria dos Gram-positivo e, através do método de incorporação, houve inibição de estirpes de *Acinetobacter*. Com a concentração de 25 µg/mL de nisina foi possível inibir a maioria dos microrganismos Gram-positivo testados, nas várias condições de temperatura e pH. Foi possível demonstrar que o nitrito de sódio individualmente ou em combinação com cloreto de sódio não inibe a maioria dos microrganismos.

A partir do trabalho desenvolvido no Capítulo 2, foi possível concluir que submetendo o chouriço a uma cozedura de 77 °C durante 40 minutos, com 100% de humidade e a chaminé da estufa semi-aberta, se obteve uma menor quantidade de bactérias do ácido láctico após embalamento comparativamente com o chouriço submetido ao tratamento *standard*. Também se demonstrou que a implementação de melhorias de Boas Práticas de Fabrico aplicado ao longo do processo de produção de chouriço permitiu obter um produto final com um número de BAL mais reduzido do que o produto elaborado sem monitorização. Foi possível concluir que o chouriço com quitosano após 14 dias de vida útil tem concentrações de bactérias do ácido láctico e de microrganismos totais inferiores ao chouriço com nitrito. Ao longo de 77 dias de armazenamento as características organolépticas visuais e odorais do chouriço com quitosano mantiveram-se similares ao do chouriço *standard*. Portanto, o quitosano, futuramente, poderá ser uma alternativa interessante aos conservantes químicos.

Trabalho futuro

Seria interessante, como trabalhos futuros, realizar:

- Elaborar análise sensorial do chouriço com quitosano e do chouriço submetido aos diferentes tempos e temperaturas de cozedura e fumagem, utilizados no presente trabalho, de modo a verificar se ocorrem alterações no sabor do produto.
- Analisar o teor de gordura, humidade, proteína e sal no chouriço com quitosano, de modo a perceber se o quitosano influencia estas propriedades no produto.
- Realizar a enumeração de BAL e de microrganismos totais no chouriço com quitosano ao longo dos 180 dias de armazenamento.
- Avaliar se o quitosano permite aumentar o tempo de vida útil do chouriço.
- Testar outras concentrações de quitosano no chouriço.
- Testar uma concentração superior de quitosano num produto de carnes brancas menos processado: aplicar 3 g de quitosano em menos de 50 g de produto, de modo a ser possível a manutenção do colesterol LDL no sangue.
- Demonstrar que o quitosano pode ser um substituto do nitrito de sódio na inibição de *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria*, entre outros, inoculando estes microrganismos no chouriço corrente e avaliando o seu efeito ao longo dos 180 dias de armazenamento.
- Fazer um estudo de mercado para analisar a aceitação do público a um chouriço com a adição de um composto natural (quitosano, propólis ou nisina) e a um chouriço com um diferente tratamento térmico, isto é, não tão enrugado como o *standard*.
- Testar o efeito antimicrobiano da combinação de propólis e nisina juntamente com quitosano no chouriço.
- Testar o propólis e a nisina no chouriço corrente para avaliar os seus efeitos no número de BAL e de microrganismos totais a 30 °C, comparativamente com o nitrito de sódio, ao longo do tempo de vida útil.
- Substituir os compostos químicos noutros produtos de charcutaria pelos compostos naturais testados no presente trabalho; avaliar o efeito dos compostos, ao longo do tempo de vida útil, em microrganismos patogénicos inoculados ou em microrganismos presentes no alimento; avaliar as características organolépticas.
- Determinar a concentração mínima inibitória de óleos essenciais contra vários microrganismos, para posterior aplicação em enchidos.

Apêndices



Figura 9. Processo de filtração do extrato etanólico de propólis (EEP).

Tabela 18. Concentração mínima inibitória (CMI) de soluções de quitosano (% m/v) contra vários microrganismos, obtida através dos métodos de incorporação e de gota e com pH do meio de 5, 6 e 7.

Microrganismos	CMI					
	pH5		pH6		pH7	
	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota
Gram-positivo						
<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212	(1)	0,3 – 0,35	0,15	0,15	0,1	0,075
<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	0,035 – 0,15 ⁽²⁾	0,075	0,08	0,075 – 0,15	0,04 – 0,065	0,15 – 0,3
<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	0,06 – 0,15 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,08	0,15	0,07	0,15
<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	0,09 – 0,15 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,15 ⁽²⁾	0,15	0,08 – 0,085 ⁽²⁾	0,075 – 0,15
<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	(1)	0,0375 – 0,075	(1)	0,15	0,15 ⁽²⁾	0,15
<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	(1)	0,3 ⁽²⁾	(1)	0,15 – 0,3	0,07 ⁽²⁾	0,075
<i>B. cereus</i>	(1)	0,075 ⁽²⁾	(1)	0,15	0,07 ⁽²⁾	0,15
<i>B. subtilis</i>	(1)	0,15 – 0,3	(1)	0,3	0,15 ⁽²⁾	(1)
<i>B. stearothermophilus</i>	(1)	0,075	(1)	>0,3 ⁽²⁾	0,065 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾
<i>Staph. aureus</i> ATCC 29213	(1)	0,3	(1)	0,3	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,3
<i>Staph. aureus</i> 18N (MRSA)	(1)	>0,3 ⁽²⁾	(1)	>0,3 ⁽²⁾	0,15	>0,3 ⁽²⁾
<i>Staph. aureus</i> 2037 M1 (MSSA)	(1)	>0,3 ⁽²⁾	(1)	>0,3 ⁽²⁾	0,15 ⁽²⁾	0,3
<i>L. monocytogenes</i> 7946	(1)	0,0375 – 0,075	(1)	0,15 – 0,3	0,08 – 0,09 ⁽²⁾	(1)
<i>L. monocytogenes</i> 7947	(1)	0,0375 – 0,075 ⁽²⁾	(1)	0,075 – 0,15	0,08 – 0,085	0,15
<i>L. innocua</i> 2030c	(1)	0,075	(1)	0,15	0,08 – 0,1 ⁽²⁾	0,15
Gram-negativo						
<i>S. Typhimurium</i>	(1)	0,15	(1)	0,15	0,15 ⁽²⁾	(1)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	0,3 – 0,35	0,15 ⁽²⁾	(1)
<i>P. mirabilis</i>	(1)	0,15 ⁽²⁾	0,1 ⁽²⁾	(1)	0,055 ⁽²⁾	0,15
<i>Ps. aeruginosa</i>	(1)	0,15 ⁽²⁾	(1)	0,3 ⁽²⁾	0,1 – 0,3 ⁽²⁾	(1)
<i>Y. enterocolitica</i> (ESB)	0,075 – 0,09 ⁽²⁾	0,15 ⁽²⁾	(1)	0,3 – 0,35 ⁽²⁾	0,075	0,3 ⁽²⁾
<i>A. baumannii</i> R	(1)	0,15 ⁽²⁾	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,08 – 0,1 ⁽²⁾	0,15 – 0,3
<i>A. baumannii</i> S – 1	(1)	0,15	(1)	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	0,08	0,075
<i>A. baumannii</i> S – 2	(1)	>0,3 ⁽²⁾	(1)	0,075 – 0,15	0,08 – 0,1 ⁽²⁾	0,15 – 0,3
<i>A. calcoaceticus</i> R	(1)	0,3 ⁽²⁾	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,08 – 0,1 ⁽²⁾	0,15 – 0,3
<i>A. calcoaceticus</i> S	(1)	(1)	(1)	0,0375 – 0,15 ⁽²⁾	0,08 – 0,095 ⁽²⁾	0,15 ⁽²⁾
Fungo						
<i>Sac. cerevisiae</i>	0,15	> 0,3 ⁽²⁾	0,15	0,35	0,02 – 0,08	0,3 – 0,5 ⁽²⁾

(1) O ácido acético individualmente tem mais efeito inibitório do que com quitosano; (2) O intervalo da concentração mínima inibitória do ácido acético é coincidente com o do quitosano, em determinados valores.

Tabela 19. Concentração mínima inibitória (CMI) de soluções de quitosano (% m/v) contra vários microrganismos, às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e com o pH do meio de 5, 6 e 7.

Microrganismos	CMI											
	4 °C			12 °C			20 °C			37 °C		
	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7
Gram-positivo												
<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	0,075 – 0,3	0,075 – 0,15	0,038 – 0,3	0,075 – 0,15	0,075 – 0,15	0,075	0,3 – 0,35	0,15	0,075
<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	-	-	-	0,075 – 0,15	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	0,038 – 0,3 ⁽²⁾	0,0375 – 0,15	0,075 – 0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,075	0,075 – 0,15	0,15 – 0,3
<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	-	0,038 – 0,15	0,0188 – 0,075	0,075	0,075 – 0,15	0,075 – 0,3	0,15	0,0375	0,15	0,075 – 0,15	0,15	0,15
<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	-	-	-	>0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	0,038 – 0,15	(1)	0,15	0,075	0,075 – 0,15	0,15	0,075 – 0,15
<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	-	-	-	>0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,038 – 0,3	>0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3	0,075 – 0,3	0,038 – 0,075	0,15	0,15
<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	-	-	-	>0,3 ⁽²⁾	0,038 – 0,15 ⁽²⁾	0,0188 – 0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,0375 – 0,15 ⁽²⁾	0,15	0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3	0,075
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	0,038 – 0,075	0,038 – 0,075 ⁽²⁾	0,075	(1)	(1)	0,075 ⁽²⁾	0,15	0,15
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	0,075 – 0,15	0,075 – 0,3	0,15	0,15	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,3	0,15 – 0,3	0,3	(1)
<i>B. stearothermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,075	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾
<i>Staph. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	-	0,075 – 0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Staph. aureus</i> 18N (MRSA)	-	-	-	-	-	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	0,3	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾
<i>Staph. aureus</i> 2037 M1 (MSSA)	-	-	-	-	(1)	0,3	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	0,3
<i>L. monocytogenes</i> 7946	-	0,038 – 0,075	0,0188 – 0,15	(1)	0,075 – 0,15	0,15	0,075	0,15	>0,3 ⁽²⁾	0,038 – 0,075	0,15 – 0,3	(1)
<i>L. monocytogenes</i> 7947	0,075	0,15	0,3	0,075	0,075 – 0,15	0,15	0,075 – 0,15	0,15	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,038 – 0,075 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,15
<i>L. innocua</i> 2030c	-	-	0,0375	0,3	0,15	0,15 – 0,3	0,075 – 0,15	0,15	(1)	0,075	0,15	0,15
<i>Cl. sporogenes</i> 1.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,3 ^{(2)*}	>0,3 ^{(2)*}
<i>Cl. sporogenes</i> 1.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,15 ^{(2)*}	>0,3 ^{(2)*}
<i>Cl. sporogenes</i> 1.61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,3 ^{(2)*}	>0,3 ^{(2)*}
<i>Cl. perfringens</i> 1.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,3 ^{(2)*}	>0,3 ^{(2)*}
<i>Cl. perfringens</i> 1.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15*	>0,3 ^{(2)*}
<i>Cl. perfringens</i> 1.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,3 ^{(2)*}	(1)*
Gram-negativo												
<i>S. Braenderup</i>	-	-	-	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,15	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,3 – 0,35 ⁽²⁾	0,3 – 0,45 ⁽²⁾
<i>S. Enteritidis</i>	-	-	-	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	0,15 ⁽²⁾	0,15	0,3 – 0,5 ⁽²⁾
<i>S. Tiphymurium</i>	-	-	-	0,15	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3	0,15	0,15	(1)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,3 – 0,35	(1)
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3	0,15 ⁽²⁾	0,15	0,3 ⁽²⁾
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,3	0,15 ⁽²⁾	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	(1)
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	0,15 – 0,3	0,075	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,15 – 0,3	0,15 ⁽²⁾	(1)	0,15
<i>Ps. aeruginosa</i>	(1)	0,15	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	0,15	(1)	(1)	(1)	0,15 ⁽²⁾	0,3 ⁽²⁾	(1)
<i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406	(1)	(1)	>0,15 ⁽²⁾	0,038 – 0,15	0,075 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,3 – 0,35 ⁽²⁾	0,3 – 0,35 ⁽²⁾
<i>Yersinia enterocolitica</i> (ESB)	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,0375 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	(1)	(1)	0,15 ⁽²⁾	0,3 – 0,35 ⁽²⁾	0,3 ⁽²⁾
<i>A. baumannii</i> R	-	-	-	-	0,038 – 0,075	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	0,075 – 0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3	0,15 ⁽²⁾	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3
<i>A. baumannii</i> S – 1	-	-	-	-	0,0188 – 0,038	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	0,075	0,075 – 0,15	0,15	0,075 – 0,15 ⁽²⁾	0,075
<i>A. baumannii</i> S – 2	-	-	-	0,075	0,0375	0,075 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3	>0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,3	>0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,15 – 0,3
<i>A. calcoaceticus</i> R	-	(1)	(1)	-	0,075 – 0,15	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	(1)	0,15 – 0,3	>0,3 ⁽²⁾	0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3 ⁽²⁾	0,15 – 0,3
<i>A. calcoaceticus</i> S	(1)	0,075 – 0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,3 ⁽²⁾	0,038 – 0,075	0,075	0,075 – 0,3	0,075 – 0,3 ⁽²⁾	0,075 – 0,15	0,075 – 0,3	(1)	0,038 – 0,15 ⁽²⁾	0,15 ⁽²⁾
Fungos												
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,65	0,55	0,4
<i>Sac. cerevisiae</i>	-	-	-	-	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	(1)	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	>0,3 ⁽²⁾	0,35	0,3 – 0,5 ⁽²⁾

(1) O ácido acético individualmente tem mais efeito inibitório do que com quitosano; (2) O intervalo da concentração mínima inibitória do ácido acético coincide com o do quitosano, em determinados valores; - = sem crescimento; * = Apenas foi realizada uma réplica da experiência.

Tabela 20. Concentração mínima inibitória (CMI) de extrato etanólico de propólis (mg/mL) contra vários microrganismos, obtida através dos métodos de incorporação e de gota e com pH do meio de 5, 6 e 7.

Microrganismos	CMI					
	pH5		pH6		pH7	
	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota
Gram-positivo						
<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212	0,078	1,25 – 2,5	0,156 – 0,625	2	0,94	0,47
<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	0,078	2,5	0,156 – 0,625	2,5 – 3,5	0,63	1,25 – 5
<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	0,078	1,25 – 2,5	0,156 – 0,625	2,5	0,47 – 1,25	1,25 – 2,5
<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	0,078	0,94 – 2,5	0,233 – 0,625	1,25	0,94	5
<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	0,31	0,625 – 0,94	0,233 – 0,625	1,25 – 2	1,25 – 1,875	2
<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	0,078	0,625 – 0,94	0,233 – 0,625	0,94 – 2,5	1,25	1,875
<i>B. cereus</i>	<0,039	0,156	0,059	0,625	0,156 – 0,625	0,47 – 2,5
<i>B. subtilis</i>	0,078	1,25 – 1,875	0,233 – 0,625	1,25 – 2,5	1,25	1,25
<i>B. stearothermophilus</i>	<0,039 ⁽¹⁾	5	<0,039	5 – 10	0,156 – 0,625	>10 ⁽¹⁾
<i>Staph. aureus</i> ATCC 29213	0,078	1,25	0,078	1,25 – 2,5	0,47	5
<i>Staph. aureus</i> 18N (MRSA)	0,078	2,5	0,078	2,5 – 5	0,31 – 0,625	>10 ⁽¹⁾
<i>Staph. aureus</i> 2037 M1 (MSSA)	0,117	1,25 – 2,5	0,078	1,25 – 2,5	0,31 – 0,625	2,5
<i>L. monocytogenes</i> 7946	0,117	0,31	0,117	1,25	0,47	2,5 – 5
<i>L. monocytogenes</i> 7947	0,078	0,625 – 0,94	0,117	0,94 – 2,5	0,47	1,25 – 1,875
<i>L. innocua</i> 2030c	0,156	0,625 – 1,25	0,117 – 0,625	1,875	0,47	2,5 – 3,5
Gram-negativo						
<i>S. Braenderup</i>	4,5 – 10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾	3 – 10	>10 ⁽¹⁾	10	>10 ⁽¹⁾
<i>S. Enteritidis</i>	4,5 – 10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾	3 – 10	>10 ⁽¹⁾	10	>10 ⁽¹⁾
<i>S. Typhimurium</i>	3,5	>10 ⁽¹⁾	2 – 10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾	10	>10 ⁽¹⁾
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,5	>10 ⁽¹⁾	4 – 10	>10 ⁽¹⁾	10	>10 ⁽¹⁾
<i>K. pneumoniae</i>	5 – 10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾	3 – 10	>10 ⁽¹⁾	10	>10 ⁽¹⁾
<i>P. vulgaris</i>	4,5 – 10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾	3 – 10	>10 ⁽¹⁾	10	>10 ⁽¹⁾
<i>P. mirabilis</i>	5 – 5,5	>10 ⁽¹⁾	5,5	>10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾
<i>Ps. aeruginosa</i>	4,5	>10 ⁽¹⁾	3 – 10	>10 ⁽¹⁾	6,5	>10 ⁽¹⁾
<i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406	10	>10 ⁽¹⁾	5	>10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾
<i>Y. enterocolitica</i> (ESB)	0,078 – 1,25	>10 ⁽¹⁾	0,233 – 5	>10 ⁽¹⁾	0,47 – 5	>10 ⁽¹⁾
<i>A. baumannii</i> R	2 – 5	5 – 10	2,5 – 5	>10 ⁽¹⁾	5 – 10 ⁽¹⁾	10
<i>A. baumannii</i> S – 1	0,63	3	2 – 5	10	4,5 – 10	10
<i>A. baumannii</i> S – 2	2 – 5	5 – 10	2,5 – 5	3	5,5	>10 ⁽¹⁾
<i>A. calcoaceticus</i> R	0,47	0,63 – 5	2 – 5	4	4,5 – 10 ⁽¹⁾	10
<i>A. calcoaceticus</i> S	0,31 – 1,25	5 – 10	2 – 5	5 – 10	4,5 – 10 ⁽¹⁾	>10 ⁽¹⁾
Fungos						
<i>C. albicans</i>	0,233 – 0,625	1,25	0,63	2,5	0,47 – 1,25	1,25 – 2,5
<i>Sac. cerevisiae</i>	0,117	0,625 – 1,25	0,117	0,47	0,31 – 0,625	0,625 – 1,25

⁽¹⁾ O intervalo da concentração mínima inibitória do etanol é coincidente com o do propólis, em determinados valores.

Tabela 21. Concentração mínima inibitória (CMI) de extrato etanólico de propólis (mg/mL) contra vários microrganismos, às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e com o pH do meio de 5, 6 e 7.

Microrganismos	CMI											
	4 °C			12 °C			20 °C			37 °C		
	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7
Gram-positivo												
<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	1,25 – 10	1,25 – 2,5	0,625	1,25 – 2,5	1,25	0,625 – 1,25	1,25 – 2,5	2	0,47
<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	-	-	-	1,25	1,25	0,625 – 2,5	2,5 – 5	1,25 – 2,5	1,25 – 5	2,5	2,5 – 3,5	1,25 – 5
<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	-	1,25	2,5 – 5	10	1,25 – 2,5	2,5 – 10	0,625 – 2,5	1,25	2,5	1,25 – 2,5	2,5	1,25 – 2,5
<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	-	-	-	>10 ⁽²⁾	1,25	2,5 – 5	0,625	1,25	2,5 – 5	0,94 – 2,5	1,25	5
<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	-	-	-	>10 ⁽²⁾	1,25	1,25	1,25	0,625 – 1,25	2,5	0,625 – 0,94	1,25 – 2	2
<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	-	-	-	>10 ⁽²⁾	1,25	1,25	0,625 – 10	0,625 – 1,25	0,625 – 2,5	0,625 – 0,94	0,94 – 2,5	1,875
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	0,625 – 1,25	0,625	>10 ⁽²⁾	0,625	2,5	0,156	0,625	0,47 – 2,5
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	0,625 – 1,25	1,25	0,625	1,25 – 2,5	1,25 – 5	1,25 – 5	1,25 – 1,875	1,25 – 2,5	1,25
<i>B. stearothermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5 – 10	>10 ⁽²⁾
<i>Staph. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1,25	1,25 – 2,5	5
<i>Staph. aureus</i> 18N (MRSA)	-	-	-	-	-	1,25 – 2,5	>10 ⁽²⁾	2,5	2,5 – 10	2,5	2,5 – 5	>10 ⁽²⁾
<i>Staph. aureus</i> 2037 M1 (MSSA)	-	-	-	-	1,25 – 5	1,25	1,25	1,25 – 2,5	1,25 – 2,5	1,25 – 2,5	1,25 – 2,5	2,5
<i>L. monocytogenes</i> 7946	-	0,625 – 1,25	0,625 – 2,5	0,625	1,25	0,625 – 1,25	0,625 – 10	1,25	0,625 – 1,25	0,31	1,25	2,5 – 5
<i>L. monocytogenes</i> 7947	2,5	1,25 – 2,5	0,625 – 5	1,25	1,25 – 2,5	1,25 – 5	1,25 – 2,5	0,625 – 1,25	1,25 – 5	0,625 – 0,94	0,94 – 2,5	1,25 – 1,875
<i>L. innocua</i> 2030c	-	-	1,25 – 5	1,25	2,5 – 10	5	1,25 – 2,5	0,625 – 1,25	2,5 – 5	0,625 – 1,25	1,875	2,5 – 3,5
<i>Cl. sporogenes</i> 1.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,625 *	>10 ⁽²⁾ *
<i>Cl. sporogenes</i> 1.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,625 *	>10 ⁽²⁾ *
<i>Cl. sporogenes</i> 1.61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,625 *	>10 ⁽²⁾ *
<i>Cl. perfringens</i> 1.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,25 *	>10 ⁽²⁾ *
<i>Cl. perfringens</i> 1.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>10 ⁽²⁾ *	>10 ⁽²⁾ *
<i>Cl. perfringens</i> 1.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,625 *	>10 ⁽²⁾ *
Gram-negativo												
<i>S. Braenderup</i>	-	-	-	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>S. Enteritidis</i>	-	-	-	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	>10 ⁽²⁾	(1)	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>Ps. aeruginosa</i>	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>Y. enterocolitica</i> (ESB)	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	2,5 – 10	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	10	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾
<i>A. baumannii</i> R	-	-	-	-	10	>10 ⁽²⁾	10	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	5 – 10	>10 ⁽²⁾	10
<i>A. baumannii</i> S – 1	-	-	-	-	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	10	5 – 10	10	3	10	10
<i>A. baumannii</i> S – 2	-	-	-	2,5	5 – 10	10	2,5 – 5	>10 ⁽²⁾	>10 ⁽²⁾	5 – 10	3	>10 ⁽²⁾
<i>A. calcoaceticus</i> R	-	5	5 – 10	-	2,5 – 10	2,5 – 10	2,5 – 5	5 – 10	2,5 – 10	0,63 – 5	4	10
<i>A. calcoaceticus</i> S	2,5 – 10	>10 ⁽²⁾	10	2,5	5 – 10	>10 ⁽²⁾	2,5 – 5	5 – 10	>10 ⁽²⁾	5 – 10	5 – 10	>10 ⁽²⁾
Fungos												
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,25	2,5	1,25 – 2,5
<i>Sac. cerevisiae</i>	-	-	-	-	0,625 – 1,25	0,625 – 1,25	0,625 – 1,25	0,625	0,625 – 1,25	0,625 – 1,25	0,47	0,625 – 1,25

(1) O etanol individualmente tem mais efeito inibitório do que com propólis; (2) O intervalo da concentração mínima inibitória do etanol coincide com o do propólis, em determinados valores; - = sem dados; * = Apenas foi realizada uma réplica da experiência.

Tabela 22. Concentração mínima inibitória (CMI) de solução de nisina ($\mu\text{g/mL}$) contra vários microrganismos, obtida através dos métodos de incorporação e de gota e com o pH do meio de 5, 6 e 7.

Microrganismos	CMI					
	pH5		pH6		pH7	
	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota	Incorporação	Gota
Gram-positivo						
<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212	>25	>25	>25	12,5	>20 *	5
<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	12,5	6,25 – 12,5	15	12,5	12,5 – 25	5
<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	12,5	6,25 – 12,5	25	6,25 – 12,5	12,5 – 25	5
<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	12,5	3,125 – 6,25	5 – 25	12,5	25	8
<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	3,125	6,25 – 12,5	3,125	10	5	12,5
<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	<1,563	6,25	6,25 – 12,5	8	6,25	12,5
<i>B. cereus</i>	5 – 25	25	>25	>25	>20 *	12,5 – 25
<i>B. subtilis</i>	12,5 – 25	25	>25	10	>20 *	8
<i>B. stearothermophilus</i>	5 – 25	25	>25	>25	>20 *	>25
<i>Staph. aureus</i> ATCC 29213	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>Staph. aureus</i> 18N (MRSA)	>25	>25	>25	>25	>20 *	25
<i>Staph. aureus</i> 2037 M1 (MSSA)	15	>25	20	25	8 – 25	20
<i>L. monocytogenes</i> 7946	6,25	12,5	12,5 – 15	8	>25	10 – 25
<i>L. monocytogenes</i> 7947	6,25	6,25 – 12,5	15	5	20 *	10
<i>L. innocua</i> 2030c	5 – 25	10	>25	5	>20 *	12,5 – 25
Gram-negativo						
<i>S. Braenderup</i>	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>S. Enteritidis</i>	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>S. Typhmuriium</i>	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>K. pneumoniae</i>	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>P. vulgaris</i>	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>P. mirabilis</i>	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>Ps. aeruginosa</i>	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>Y. enterocolitica</i> (ESB)	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>A. baumannii</i> R	12,5 – 25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>A. baumannii</i> S – 1	8 – 25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>A. baumannii</i> S – 2	>20	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>A. calcoaceticus</i> R	12,5 – 25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>A. calcoaceticus</i> S	5 – 25	>20	>25	>25	>20 *	>25
Fungos						
<i>C. albicans</i>	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25
<i>Sac. cerevisiae</i>	>25	>25	>25	>25	>20 *	>25

* = Apenas foi realizada uma réplica da experiência.

Tabela 23. Concentração mínima inibitória (CMI) de solução de nisina (µg/mL) contra vários microrganismos, às temperaturas de 4, 12, 20 e 37 °C e com o pH do meio de 5, 6 e 7.

Microrganismos	CMI											
	4°C			12°C			20°C			37°C		
	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7
Gram-positivo												
<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	6,25 – 12,5	3,125 – 6,25	6,25 – 25	6,25 – 12,5	6,25	6,25 – 12,5	>25	12,5	5
<i>Ent. faecalis</i> DSMZ 12956	-	-	-	3,125	12,5	<1,563	6,25 – 12,5	3,125 – 6,25	6,25	6,25 – 12,5	12,5	5
<i>Ent. faecium</i> DSMZ 13590	-	3,125 – 12,5	<1,563	3,125 – 6,25	<1,563	6,25	<1,563	<1,563	6,25	6,25 – 12,5	6,25 – 12,5	5
<i>Ent. flavescens</i> DSMZ 7370	-	-	-	>25	6,25 – 12,5	12,5	6,25	6,25 – 12,5	6,25 – 12,5	3,125 – 6,25	12,5	8
<i>Ent. gallinarum</i> DSMZ 20628	-	-	-	>25	6,25 – 12,5	6,25	12,5	6,25 – 12,5	6,25 – 12,5	6,25 – 12,5	10	12,5
<i>Ent. casseliflavus</i> DSMZ 20680	-	-	-	>25	6,25 – 12,5	12,5	6,25 – 12,5	6,25 – 12,5	12,5	6,25	8	12,5
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	>25	>25	6,25 – 25	25	>25	25	>25	12,5 - 25
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	>25	>25	6,25	12,5 – 25	12,5	6,25	25	10	8
<i>B. stearothermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	>25	>25
<i>Staph. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	-	>25	>25	>25	>25
<i>Staph. aureus</i> 18N (MRSA)	-	-	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25
<i>Staph. aureus</i> 2037 M1 (MSSA)	-	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	20
<i>L. monocytogenes</i> 7946	-	3,125 – 6,25	12,5	6,25 – 12,5	6,25 – 12,5	3,125 – 12,5	12,5 – 25	12,5	12,5	12,5	8	10 – 25
<i>L. monocytogenes</i> 7947	12,5	12,5	12,5	6,25	3,125	6,25 – 12,5	6,25 – 12,5	3,125	12,5	6,25 – 12,5	5	10
<i>L. innocua</i> 2030c	-	-	6,25	12,5	3,125	6,25 – 12,5	12,5	6,25	12,5	10	5	12,5 – 25
<i>Cl. sporogenes</i> 1.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>25 *	>25 *
<i>Cl. sporogenes</i> 1.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>25 *	>25 *
<i>Cl. sporogenes</i> 1.61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>25 *	>25 *
<i>Cl. perfringens</i> 1.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>25 *	12,5 *
<i>Cl. perfringens</i> 1.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,25 *	12,5 *
<i>Cl. perfringens</i> 1.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>25 *	25 *
Gram-negativo												
<i>S. Braenderup</i>	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>S. Enteritidis</i>	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>Ps. aeruginosa</i>	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>Y. enterocolitica</i> NCTC 10406	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>Y. enterocolitica</i> (ESB)	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>A. baumannii</i> R	-	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>A. baumannii</i> S – 1	-	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>A. baumannii</i> S – 2	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>A. calcoaceticus</i> R	-	>25	>25	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>A. calcoaceticus</i> S	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
Fungos												
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>25	>25	>25
<i>Sac. cerevisiae</i>	-	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25

- = sem dados; * = Apenas foi realizada uma réplica da experiência

Bibliografía

- Adams, M. R., Moss, M. O. 1995. Food Microbiology. University of Surrey, Guilford, UK, pp. 398.
- Aider, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology* **43** (6): 837 – 842.
- Alakomi, H.-L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, M. 2000. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (5): 2001 – 2005.
- Alakomi, H.-L., Saarela, M., Helander, I.M. 2003. Effect of EDTA on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium involves a component not assignable to lipopolysaccharide release. *Microbiology* **149**: 2015 – 2021.
- Ali, F.H., Kassem, G.M., Atta-Alla, O.A. 2010. Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria italiana* **46** (2): 167 – 172.
- Alibaba Group. 2016a. “Chitosan food grade”. Disponível: https://www.alibaba.com/product-detail/Chitosan-food-grade_1433098372.html?spm=a2700.7724838.0.0.9u6FDD [data da consulta: 8/28/16].
- Alibaba Group. 2016b. “Food Grade Chitosan Powder”. Disponível: https://www.alibaba.com/product-detail/Food-Grade-Chitosan-Powder_60073116605.html?spm=a2700.7724838.0.0.9u6FDD&s=p [data da consulta: 8/28/16].
- Alibaba Group. 2016c. “Degree 90% deacetylated chitosan”. Disponível: https://www.alibaba.com/product-detail/degree-90-deacetylated-chitosan_60533421646.html?spm=a2700.7724838.0.0.9u6FDD&s=p [data da consulta: 8/28/16].
- Alibaba Group. 2016d. “Sodium Nitrite”. Disponível: https://www.alibaba.com/product-detail/Sodium-Nitrite_60506526045.html?spm=a2700.7724838.0.0.hBuGFT [data da consulta: 8/28/16].
- Alibaba Group. 2016e. “Provide high quality low price sodium nitrite”. Disponível: https://www.alibaba.com/product-detail/provide-high-quality-low-price-sodium_1194528262.html?spm=a2700.7724838.0.0.aap390 [data da consulta: 8/28/16].
- Alibaba Group. 2016f. High Quality 99% Sodium Nitrite. Disponível: https://www.alibaba.com/product-detail/High-Quality-99-Sodium-Nitrite_60350390936.html?spm=a2700.7724838.0.0.hBuGFT [data da consulta: 8/28/16].
- Anacarso, I., de Niederhäusern, S., Iseppi, R., Sabia, C., Bondi, M., Messi, P. 2011. Anti-listerial activity of chitosan and Enterocin 416K1 in artificially contaminated RTE products. *Food Control* **22**: 2076 – 2080.
- Aranaz, I., Harris, R., Heras, A. 2010. Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. *Current Organic Chemistry* **14**: 308 – 330.
- Arancibia, M.Y., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Fernández-García, M., Fernández-Martín, F., Montero, P. 2014. Antimicrobial and rheological properties of chitosan as affected by extracting conditions and humidity exposure. *LWT - Food Science and Technology* **60**: 802 – 810.

ASAE. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. 2016. “Segurança Alimentar - Aditivos Alimentares”. Disponível: <http://www.asae.pt/> [data da consulta: 9/1/2016].

Baldus, K., Deibel, V. 2012. “Flavors Should Burst, Not Packages”. Disponível: <http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/junejuly-2012/flavors-should-burst-not-packages/> [data da consulta: 7/29/16].

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. 2015. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6**: 71 – 79.

Bankova, V.S., De Castro, S.L., Marcucci, M.C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**: 3 – 15.

Barbosa, J., Borges, S., Teixeira, P. 2014. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. *International Journal of Food Microbiology* **191**: 144 – 148.

Batt, C.A. 2014. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2ª Edição. Academic Press, EUA, pp. 3248.

Bonev, B., Hooper J., Parisot, J. 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**: 1295 – 1301.

Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K.Z., Grosse, Y., Ghissassi, F.E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K. 2015. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology* **16** (16): 1599 – 1600.

Branen, A.L., Haggerty, R.J. 2002. Introduction to Food Additives. In: *Food Additives* (Eds. Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. & Thorngate, J.H.), Marcel Dekker, Nova Iorque. pp. 1-9.

Bryan, J., Redden, P., Traba, C. 2015. The Mechanism of Action of Russian Propolis Ethanol Extracts Against Two Antibiotic Resistant Biofilm Forming Bacteria. *Letters in Applied Microbiology* **62** (2): 192 – 198.

Cammack, R., Joannou, C.L., Cui, X.-Y., Martinez, C.T., Maraj, S.R., Hughes, M.N. 1999. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**: 475 – 488.

Campden BRI. 2010. “Alternatives to nitrates and nitrites in organic meat products”. Disponível: http://www.bmpa.uk.com/_attachments/resources/2567_s4.pdf [data da consulta: 9/1/16].

Carasi, P., Díaz, M., Racedo, S.M., Antoni, G., Urdaci, M.C., Serradell, M. 2014. Safety Characterization and Antimicrobial Properties of Kefir-Isolated *Lactobacillus kefir*. *BioMed Research International* **2014**: 1 – 7.

Cardoso, S.M., Ribeiro, M., Ferreira, I.L., Rego, A.C. 2011. Northeast Portuguese propolis protects against staurosporine and hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons. *Food and Chemical Toxicology* **49**: 2862 – 2868.

Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. 2014. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**: 377 – 399.

Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. 2015. Natural food additives: *Quo vadis?*, *Trends in Food Science & Technology* **45** (2): 284 – 295.

Casquete, R., Castro, S.M., Jácome, S., Teixeira, P. 2016a. Antimicrobial activity of ethanolic extract of própolis in “Alheira”, a fermented meat sausage. *Cogent Food & Agriculture* **2**: 7.

Casquete, R., Castro, S.M., Texeira, P. 2016b. Evaluation of the Combined Effect of Chitosan and Lactic Acid Bacteria in *Alheira* (Fermented Meat Sausage) Paste. *Journal of Food Processing and Preservation* **00**: 1 – 8.

Cassens, R.G. 1994. Meat preservation: Preventing losses and assuring safety. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, EUA, pp. 133.

Cheun, H., Makino, S., Shirahata, T., Mikami, M. 2000. The Practical Application of Pediocin Produced by *Pediococcus acidilactici* in Food. *Bioscience Microflora* **19** (1): 47 – 50.

Chihib, N.-E., Crepin, T., Delattre, G., Tholozan, J.-L. 1999. Involvement of cell envelope in nisin resistance of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium naturally sensitive to nisin. *FEMS Microbiology Letters* **177**: 167 – 175.

Chirife, J., Fontan, C.F. 1980. Prediction of water activity of aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods: experimental investigation of the aw lowering behavior of sodium lactate and some related compounds. *Journal of Food Science* **45** (4): 802 – 804.

Codex Alimentarius. 2016. “Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Online Database”. Disponível: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gsfa/en/> [data da consulta: 7/28/16].

Cortés, C.G. 2012. Evaluación del efecto de propoleos como biopreservante en chorizo [Ph.D.]. Universidad Nacional de Colombia: Colombia, 134 pp. Disponível: Universidad Nacional de Colombia.

Costa, P.D., Andrade, N.J., Brandão, S.C.C., Passos, F.J.V., Soares, N.F.F. 2006. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**: 345 – 349.

Crandall, A.D., Montville, T.J. 1998. Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 Is a Complex Phenotype. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 231 – 237.

Delves-Broughton, J. 1993. The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards Gram-negative bacteria. **32**: 87 – 97.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoe* **69**: 193 – 202.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* **21**: 703 – 714.

Dischinger, J., Chipalu, S.B., Bierbaum, G. 2014. Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. *International Journal of Medical Microbiology* **304** (1): 51 – 62.

Dodds, K.L., Collins-Thompson, D.L. 1984. Nitrite tolerance and nitrite reduction in lactic acid bacteria associated with cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* **1**: 163 – 170.

EFSA. European Food Safety Authority. “Food Additives”. Disponível: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives> [data da consulta: 7/22/16].

EFSA. European Food Safety Authority. 2003. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. *The EFSA Journal* **14**: 1 – 34.

EFSA. European Food Safety Authority. 2011a. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to chitosan and reduction in body weight (ID 679, 1499), maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4663), reduction of intestinal transit time (ID 4664) and reduction of inflammation (ID 1985) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* **9** (6): 1 – 21.

EFSA. European Food Safety Authority, Regulamento n.º 1333/2008. Disponível: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32008R1333&from=EN> [data da consulta: 9/22/15].

EFSA. European Food Safety Authority, Regulamento n.º 1129/2011. Disponível: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:PT:PDF> [data da consulta: 9/1/16].

Egan, A.F. 1983. Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek* **49** (3): 327 – 336.

Elias, M., Santos, A.C., Raposo, B. 2007. Caracterização de matérias-primas subsidiárias usadas no fabrico de paio de porco alentejano. *Revista de Ciências Agrárias* **30** (1): 424 – 438.

Elliason, D.J., Tatini, S.R. 1999. Enhanced inactivation of *Salmonella typhimurium* and verotoxigenic *Escherichia coli* by nisin at 6.5°C. *Food Microbiology* **16**: 257 – 267.

EUFIC. European Food Information Council. 2004a. “Preservatives to keep foods longer – and safer”. Disponível: <http://www.eufic.org/article/en/food-safety-quality/food-additives/artid/preservatives-food-longer-safer/> [data da consulta: 8/9/16].

EUFIC. European Food Information Council. 2004b. “Reguladores de acidez – Produtos multiuso”. Disponível: <http://www.eufic.org/jarticle/pt/artid/Reguladores-de-acidez-Produtos-multiuso/> [data da consulta: 8/10/16].

EUFIC. European Food Information Council. 2013. “Resistência antimicrobiana: uma responsabilidade partilhada”. Disponível: http://www.eufic.org/article/pt/artid/Antimicrobial_resistance_a_shared_responsibility/ [data da consulta: 9/1/16].

EUFIC. European Food Information Council. 2015. “Food additives”. Disponível: <http://www.eufic.org/article/en/food-safety-quality/food-additives/expid/basics-food-additives/> [data da consulta: 8/14/16].

Falcão, S.I., Tomás, A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C., Vilas-Boas; M. 2013. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products* **49**: 805 – 812.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. “Sodium erythorbate”. Disponível: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-404.pdf> [data da consulta: 31/8/16].

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016a. “Bacterial Fermentations”. Disponível: <http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e10.htm> [data da consulta: 6/10/16].

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016b. "Raw-Fermented Sausages". Disponível: <http://www.fao.org/docrep/010/ai407e/AI407E11.htm> [data da consulta: 7/29/16].

FBC industries, Inc. 2009. "Sodium Lactate". Disponível: http://www.fbcindustries.com/Sodium_Lactate.aspx [data da consulta: 8/31/16].

FDA. Food and Drug Administration of the United States of America. 2009. Disponível: <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm269477.pdf> [data da consulta: 9/1/16].

FDA. Food and Drug Administration of the United States of America. 2014a. "Overview of Food Ingredients, Additives & Colors". Disponível: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm094211.htm#foodadd> [data da consulta: 9/18/15].

FDA. Food and Drug Administration of the United States of America. 2014b. "Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods - Chapter 4. Analysis of Microbial Hazards Related to Time/Temperature Control of Foods for Safety". Disponível: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094147.htm> [data da consulta: 8/24/16].

FDA. Food and Drug Administration of the United States of America. 2015a. "Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods - Chapter 3. Factors that Influence Microbial Growth". Disponível: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm> [data da consulta: 7/6/16].

FDA. Food and Drug Administration of the United States of America. 2015b. "Water Activity (aw) in Foods". Disponível: <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/InspectionTechnicalGuides/ucm072916.htm> [data da consulta: 3/25/16].

FDA. Food and Drug Administration of the United States of America. 2015c. "Are You Storing Food Safely?". Disponível: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm093704.htm> [data da consulta: 8/16/16].

FDA. Food and Drug Administration of the United States of America. 2016. "Premarket Approval (PMA)". Disponível: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/HowtoMarketYourDevice/PremarketSubmissions/PremarketApprovalPMA/ucm2007514.htm> [data da consulta: 9/20/16].

Feiner, G. 2006. Meat products handbook: Practical science and technology, 7ª Edição. CRC Press, EUA, pp 648.

Fellows, P. 2000. Food Processing Technology – Principles and Practice, 2ª Edição. CRC Press LLC, Boca Raton, EUA, pp. 575.

Food Safety Authority of Ireland. 2015. "Use and Removal of Nitrite in Meat Products". Disponível: https://www.fsai.ie/faq/use_and_removal_of_nitrite.html#what_are_nitrates [data da consulta: 9/1/16].

- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* **47**: 1 – 24.
- Galvão, M.F., Prudêncio, C.V., Vanetti, M.C.D. 2015. Stress enhances the sensitivity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to bacteriocins. *Journal of Applied Microbiology* **118**: 1137 – 1143.
- Ganzle, M.G., Hertel, C., Hammes, W.P. 1999. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. *International Journal of Food Microbiology* **48**: 37 – 50.
- Garg, S.K., Mital, B.K. 1991. Enterococci in Milk and Milk Products. *Critical Reviews in Microbiology* **18** (1): 15 – 45.
- Gethin, G. 2007. The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds UK* **3** (3): 52 – 56.
- Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 163 – 171.
- Gonçalves, S.M.L. 2009. Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril [Mestrado]. Universidade Técnica de Lisboa: Lisboa, 80 pp. Disponível: Universidade Técnica de Lisboa.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P.S. 2009. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* **137**: 175 – 180.
- Gray, J.I., Pearson, A.M. 1984. Cured Meat Flavor. *Advances in Food Research* **29**: 1 – 86.
- Hamad, S.H. 2012. Factors Affecting the Growth of Microorganisms in Food. In: Progress in Food Preservation (Eds. Bhat, R., Alias, A.K., Paliyath, G.), Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Helander, I.M., Mattila-Sandholm, T. 2000. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology* **60**: 153 – 161.
- Hugo, A.A., Kakisu, E., Antoni, G.L., Pérez, P.F. 2008. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Letters in Applied Microbiology* **46** (6): 613 – 619.
- Ibarz, A., Barbosa-Cánovas, G.V. 2003. Unit Operations in Food Engineering. CRC Press LLC, Boca Raton, EUA, 873.
- ISO 4833-1 (2013). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. Suíça.
- ISO 15214 (1998). Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles – Technique par comptage des colonies à 30 °C.
- Kamil, J.Y.V.A., Jeon, Y.J., Shahidi, F. 2002. Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry* **79**: 69 – 77.
- Khan, A., Vu, K.D., Riedl, B., Lacroix, M. 2014. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. *LWT - Food Science and Technology* **61**: 124 – 129.
- Kim, YH, Chung, HJ. 2011. The effects of Korean propolis against foodborne pathogens and transmission electron microscopic examination. *New Biotechnology* **28** (6): 713 – 718.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70** (3): 337 – 349.
- Komitopoulou, E., Gibbs, P. 2012. Understanding the preservation of meat and meat products. *International Meat Topics* **3** (5): 19 – 21.

- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* **144**: 51 – 63.
- König, H., Fröhlich, J. 2009. Lactic Acid Bacteria. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (Eds. König, H., Unden, G. & Fröhlich, J.), Springer, Heidelberg. pp 3 – 29.
- Kumirska, J., Weinhold, M.X., Thöming, J., Stepnowski, P. 2011. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials — Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers* **3**: 1875 – 1901.
- Lewis, C.M., Zervos, M.J. 1990. Clinical Manifestations of Enterococcal Infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **9** (2): 111 – 117.
- Lopes, C., Oliveira, A., Santos, A.C., Ramos, E., Gaio, A.R., Severo, M., Barros, H. Serviço de Higiene e Epidemiologia - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. 2006. “Consumo alimentar no Porto”. Disponível: <http://higiene.med.up.pt/consumoalimentarporto/home.php?var=mensagem> [data da consulta: 9/1/16].
- Lu, L.C., Chen, Y.W., Chou, C.C. 2004. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* **102**: 213 – 220.
- Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. 2010. Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes? *Toxicology in Vitro* **24**: 790 – 794.
- Matos, J.S.T, Bruno-Soares, A., Azevedo, A.A. 2013. Microbial spoilage of portuguese chouriço along shelf life period. *Brazilian Journal of Microbiology* **44** (1): 105 – 108.
- Matos, J.S.T, Bruno-Soares, A., Jensen, B.B., A.S. Barreto, A.S., Hojberg, O. 2008. Growth inhibition of bacterial isolates recovered from two types of Portuguese dry smoked sausages (chouriço). *Meat Science* **80**: 1352 – 1358.
- Matos, J.S.T., Jensen, B.B., Barreto, S.F.H.A., Hojberg, O. 2006. Spoilage and pathogenic bacteria isolated from two types of portuguese dry smoked sausages after shelf-life period in modified atmosphere package. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria* **5** (3): 165 – 174.
- McClure, P.J., Kelly, T.M., Roberts, T.A. 1991. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **14** (1): 77 – 91.
- Moorcroft, M.J., Davis, J., Compton, R.G. 2001. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta* **54**: 785 – 803.
- Murray, B.E. 1990. The Life and Times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews* **3** (1): 46 – 65.
- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z. 2007. Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science* **72** (5): 87 – 100.
- NP 589 (2008). IPQ, Instituto Português da Qualidade. Chouriço de carne: definição, classificação, características e acondicionamento. IPQ. Caparica.
- OMAFRA. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2001. “Meat pH and Pork Quality”. Disponível: http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/swine/facts/info_qs_meatph.htm [data da consulta: 8/31/16].

OMAFRA. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2016. "Foods of Plant Origin: Cleaning and Sanitation Guidebook". Disponível: http://www.omafra.gov.on.ca/english/food/inspection/fruitveg/sanitation_guide/cs-guidebook.htm [data da consulta: 8/24/16].

Parke, D.V, Lewis, D.F.V. 2009. Safety aspects of food preservatives. *Food Additives & Contaminants* **9** (5): 561 – 577.

Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N. 2012. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology* **156**: 264 – 271.

Polo, M.E.B., Jovita, M.M.R. 2001. Contaminação microbiana de la carne. In: Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos (Bejarano, M. S.), Ediciones Martin & Macías, Madrid, Espanha.

Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., Ercolini, D. 2015. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science* **109**: 66 – 74.

Predika, J. 1983. The Sausage-making Cookbook. Stackpole Books, Harrisburg, pp 182.

Primor Charcutaria-Prima. "Quem Somos". Disponível: <http://www.primor.pt/pt/go/quem-somos> [data da consulta: 7/24/16].

Prudêncio, C.V., Mantovani, H.C., Cecon, P.R., Prieto, M., Vanetti, M.C.D. 2015a. Temperature and pH influence the susceptibility of *Salmonella* Typhimurium to nisin combined with EDTA. *Food Control* **61**: 248 – 253.

Prudêncio, C.V., dos Santos, M.T., Vanetti, M.C.D. 2015b. Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. *Journal of Food Science and Technology* **52** (9): 5408 – 5417.

Rahman, M.S. 2007. Handbook of Food Preservation, 2ª Edição. CRC Press, Boca Raton, EUA, pp. 1088.

Rasooli, I. 2007. Food preservation—a biopreservative approach. *Food* **1** (2): 111 – 136.

Ribeiro, T., Oliveira, M., Fraqueza, M.J., Lauková, A., Elias, M., Tenreiro, R., Barreto, A.S., Semedo-Lemsaddek, T. 2011. Antibiotic Resistance and Virulence Factors among Enterococci Isolated from Chouriço, a Traditional Portuguese Dry Fermented Sausage. *Journal of Food Protection* **74** (3): 465 – 469.

Rollema, H.R., Kuipers, O.P., Both, P., De-Vos, W.M., Siezen, R.J. 1995. Improvement of Solubility and Stability of the Antimicrobial Peptide Nisin by Protein Engineering. *Applied and Environmental Microbiology* **61** (8): 2873 – 2878.

Roller, S., Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* **47**: 67 – 77.

Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M., Fletcher, H. 2001. Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science* **62**: 165 – 177.

Rosso, L. Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P. 1995. Convenient Model to Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Applied and environmental microbiology* **61** (2): 610 – 616.

- Russell, A.D. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Microbiology* **71** (3): 191 – 201.
- Russell, N.J., Gould, G.W. 2012. Food Preservatives, 2ª Edição. Springer Science & Business Media, Nova Iorque, EUA, pp. 380.
- Ryser, E.T., Marth, E.H. 1999. Listeria: Listeriosis, and Food Safety, 2ª Edição. CRC Press, EUA, pp. 750.
- Sagoo, S., Board, R., Roller, S. 2002. Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbiology* **19**: 175 – 182.
- Sahl, H.G., Jack, R.W., Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry* **230** (3): 827-853.
- Salminen, S., Wright, A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3ª Edição. CRC Press, Nova Iorque, EUA, pp. 656.
- Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B.S.C., Marcucci, M.C. 2011. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal* **5** (27): 1 – 10.
- Sebranek, J.G., Bacus, J.N. 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science* **77**: 136 – 147.
- Sigma-Aldrich, 2016. “Tryptic Soy Agar”. Disponível: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/22091?lang=pt®ion=PT&gclid=CO6T6Mzw984CFdQ_Gwod9egDRw [data da consulta: 9/3/16].
- Silici, S., Ünlü, M., Vardar-Ünlü, G. 2007. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23** (12): 1797 – 1803.
- Simpson, B.K., Gagné, N., I.N.A. Ashie, I.N.A., Noroozi, E. 1997. Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Biotechnology* **11** (1): 25 – 44.
- Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. 2002. Genomic Diversity within the Genus *Pediococcus* as Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (2): 765 – 771.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152 – 178.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology* **25**: 120 – 127.
- Sonnenschmidt, F.H. 2009. Charcuterie: Sausages, Pates and Accompaniments. Cengage Learning, Nova Iorque, EUA, pp. 320.
- Soultos, N., Tzikas, Z., Abraham, A., Georgantelis, D., Ambrosiadis, I. 2008. Chitosan effects on quality properties of Greek style fresh pork sausages. *Meat Science* **80**: 1150 – 1156.
- Stiles, M.E., Holzapel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36** (1): 1 – 29.

Tannock, G.W. 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in Biotechnology* **15** (7): 270 – 274.

The Gale Group Inc. 2003. “Agar Diffusion”. Disponível: <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3409800016.html> [data da consulta: 7/31/16].

USDA. United States Department of Agriculture. 2015. “Additives in Meat and Poultry Products”. Disponível: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/food-labeling/additives-in-meat-and-poultry-products/additives-in-meat-and-poultry-products> [data da consulta: 9/21/15].

Vargas-Sánchez, R.D., Torrescano-Urrutia, G.R., Sánchez-Escalante, A. 2013. El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. *Inteciencia* **38** (10): 705 – 711.

Vasilatos, G.C., Savvaidis, I.N. 2013. Chitosan or rosemary oil treatments, singly or combined to increase turkey meat shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* **166**: 54 – 58.

Velraeds, M.M.C., Mei, H.C.V.D., Reid, G., Busscher, H.J. 1996. Inhibition of Initial Adhesion of Uropathogenic *Enterococcus faecalis* by Biosurfactants from *Lactobacillus* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (6): 1958 – 1963.

Vemag. 2016. “Produtos e Salsichas em Porções”. Disponível: <http://www.vemag.de/br/aplicacoes/produtos-e-salsichas-em-porcoes/> [data da consulta: 9/4/16].

Wettasinghe, M., Shahidi, F. 1999. Evening Primrose Meal: A Source of Natural Antioxidants and Scavenger of Hydrogen Peroxide and Oxygen-Derived Free Radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (5): 1801-1812.

Woods, L.F.J., Wood, J.M., Gibbs, P.A. 1981. The Involvement of Nitric Oxide in the Inhibition of the Phosphoroclastic System in *Clostridium sporogenes* by Sodium Nitrite. *Journal of General Microbiology* **125**: 399 – 406.

World Health Organization. 2015. “IARC monographs evaluate red and processed meats”. Disponível: <http://www.emro.who.int/noncommunicable-diseases/highlights/red-and-processed-meats-cause-cancer.html> [9/1/16].

Youn, S.K., Park, S.M., Ahn, D.H. 2000. Studies on the improvement of storage property in meat sausage using chitosan. II Difference of storage property by molecular weight of chitosan. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **29** (5): 477 – 481.

Youn, S.K., Park, S.M., Ahn, D.H. 2001. Studies on substitution effect of chitosan against sodium nitrite in pork sausage. *Korean Journal of Food Science and Technology* **33** (5): 551 – 559.

Zheng, L., Bae, Y.-M., Jung, K.-S., Heu, S., Lee, S.-Y. 2013. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. *Food Control* **32** (2): 665 – 672.

Zheng, L.-Y., Zhu, J.-F. 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers* **54**: 527 – 530.