



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

ESTUDO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS DE CHARCUTARIA

por

Bruno José Duarte Dias

Dezembro 2020



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

ESTUDO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS DE CHARCUTARIA

Relatório de Estágio apresentado à *Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa* para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Bruno José Duarte Dias

Supervisor: Engenheira Sara Silva Bernardes

Orientador Escola Superior Biotecnologia: Professora Doutora Paula Cristina Maia Teixeira

Dezembro 2020

Resumo

O estudo da vida útil de um produto alimentar é fundamental para o desenvolvimento e fornecimento de alimentos seguros e com qualidade. O desperdício alimentar que resulta da rejeição de alimentos em condições para consumo e o seu impacto nas quebras financeiras de uma empresa alimentar, foi uma das bases para a realização do presente estudo. Neste trabalho, avaliou-se a possibilidade de aumentar o tempo de vida útil de dois produtos (queijo fresco de cabra e fiambre da pá) durante o período de permanência na secção de charcutaria, após abertura da embalagem original e depois de fatiados. Simularam-se as condições após abertura do produto e utilizaram-se duas temperaturas de armazenamento: 4 °C como temperatura recomendada e 10 °C como temperatura de abuso. O estudo do tempo de vida dos produtos foi feito com base nos resultados de análises microbiológicas (*Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae* e bactérias do ácido láctico), sensoriais e físico-químicas (a_w e pH) durante um período de 72 horas de armazenamento a 4°C e a 10 °C. Realizou-se também um teste de desafio (*challenge testing*) por inoculação de *L. monocytogenes* nos dois produtos, de modo a analisar o seu comportamento durante as 72 horas. Para além disso, realizou-se uma experiência laboratorial para determinar mecanismos de inibição, provenientes de bactérias do ácido láctico, dos dois produtos, no crescimento de *L. monocytogenes*. Com base nos resultados obtidos da análise sensorial, verificou-se que os produtos não apresentam qualquer alteração nas suas características organoléticas após 24 horas de armazenamento. No entanto, ao fim de 72 horas e nas amostras armazenadas a 10 °C, detetou-se um odor ácido não característico e no caso do fiambre da pá, a presença de soro em torno do produto. Relativamente às determinações físico químicas, não se verificaram alterações nos parâmetros valor de pH e a_w nos produtos após 72 horas. As análises microbiológicas de *L. monocytogenes* determinaram que não existe qualquer evidência destes microrganismos nos dois produtos. Em relação às restantes análises microbiológicas, verificou-se também que as contagens de *Enterobacteriaceae* no queijo fresco de cabra se encontram acima dos limites definidos pela autoridade de controlo. Relativamente ao crescimento de bactérias do ácido láctico isoladas dos dois produtos de charcutaria, não se registou qualquer evidência de um mecanismo de inibição no crescimento de *L. monocytogenes* por parte destes microrganismos. Verificou-se que a extensão do período de validade indicativa de 72 horas é uma possibilidade para o fiambre da pá, no entanto, no caso do queijo fresco, determinou-se que o produto não cumpre com os requisitos microbiológicos estabelecidos logo no primeiro dia de análise, o que impede a avaliação desta extensão de validade.

PALAVRAS-CHAVE: VIDA ÚTIL, PRODUTOS DE CHARCUTARIA, MICROBIOLOGIA, FIAMBRE, QUEIJO FRESCO DE CABRA

Abstract

The study of shelf life in food products has a vital role in the development and supply of safe and good quality products for consumption. The waste of food products that are safe and meet the quality standards and the financial loss that this represents on a food company, was one of the reasons for carrying out the present study. The aim of this report was to evaluate the shelf life of two charcuterie products: fresh goat cheese and dry cured pork ham after slicing and during their stay at the charcuterie section. The studies developed on these products were made considering their durability in the respective retail section of 24-hours. The experimental work was made by replicating the opening conditions of the 2 products and two storage temperatures were used: 4 °C as the recommended temperature and 10 °C as the abuse temperature. The determination of the life span of the products was based on the results of microbiological (*Enterobacteriaceae*, Lactic Acid Bacteria and *Listeria monocytogenes*), sensory and physical-chemical (a_w and pH) analyzes during a period of 72 hours and storage at 4°C and 10°C. A challenge test was also carried out by inoculation of *Listeria monocytogenes* in both products, in order to evaluate its behavior for 72 hours. It was also tested if the presence of lactic acid bacteria isolated from both products could provide some sort of inhibition mechanism against *L. monocytogenes* growth. The sensory analysis results showed that the products do not show any change in their organoleptic characteristics after 24 hours of storage. However, after 72 hours in the samples stored at 10 °C, an acidic smell was detected in both products. In the samples of dry cured ham stored at 10 °C and after 72 hours, the release of serum surrounding the the product was detected. Regarding the physical and chemical determinations, there were no changes in the pH and a_w parameters in the products after 24 hours. The data collected from the microbiological analyzes indicated that there was no evidence of growth of *L. monocytogenes* in the products. Regarding the results of the remaining microbiological analyzes, it was also found that fresh goat cheese surpasses the limits of *Enterobacteriaceae* counts defined by the quality department in charge. In the experiment performed with Lactic Acid Bacteria isolated from the two products, it was determined that the presence of these microorganisms does not have a role in the inhibition of growth of *L. monocytogenes*. With this study, it was found that the extension of the self-life of 72 hours for dry cured pork ham is a possibility, however, in the case of fresh goat cheese, it was determined that the product does not comply with the established microbiological requirements, on the first day of analysis, which prevents the evaluation of this extension of shelf life.

KEYWORDS: SHELF LIFE, CHARCUTERIE PRODUCTS, MICROBIOLOGY, DRY CURED HAM, FRESH GOAT CHEESE

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Paula Teixeira, por todo o seu apoio, dedicação e disponibilidade durante todo o percurso da minha tese. Queria também agradecer à Engenheira Sara Bernardes Silva pela sua disponibilidade e acima de tudo pela oportunidade que me deu de poder integrar e conhecer um pouco do mundo empresarial.

Queria também agradecer à Marta Carvalho por ter sido um dos principais motores para o desenvolvimento deste projeto, pela companhia e tutoria durante toda a elaboração do meu trabalho. Ao Marcelo pela sua boa disposição e pelo constante apoio no laboratório.

Deixo também um agradecimento à coordenadora do Mestrado de Engenharia Alimentar, Professora Doutra Alcina Bernardo pelo seu profissionalismo, dedicação aos alunos e por ter permitido a realização deste estágio.

Finalmente, agradeço à minha família por todo o apoio.

Lista de gráficos

Gráfico 1 -Evolução das contagens ($\log(N/N_0)$ ufc/g) de <i>L. monocytogenes</i> em amostras inoculadas de queijo fresco de leite de cabra	37
Gráfico 2 -Evolução das contagens ($\log(N/N_0)$ ufc/g) de <i>L. monocytogenes</i> em amostras inoculadas de queijo fresco de leite de cabra armazenado a 10°C e 4°C	38
Gráfico 3 -Evolução das contagens ($\log(N/N_0)$ ufc/g) de <i>Enterobacteriaceae</i> em amostras de queijo fresco de leite de cabra armazenado a 10°C e 4°C	39
Gráfico 4 - Evolução das contagens ($\log(N/N_0)$ ufc/g) de <i>Enterobacteriaceae</i> em amostras de fiambre da pá de porco armazenadas a 10°C e 4°C	40
Gráfico 5 - Evolução das contagens ($\log(N/N_0)$ ufc/g) de BAL em amostras de queijo fresco de leite de cabra armazenado a 10°C e 4°C.....	41
Gráfico 6 -Evolução das contagens ($\log(N/N_0)$ ufc/g) de BAL em amostras de fiambre de porco da pá armazenado a 10°C	41

Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação de queijo quanto á sua matéria gorda. (Extraído de NP -1985)	14
Tabela 2 -Determinação do pH e a_w de queijo fresco de cabra a diferentes temperaturas de armazenamento (4 e 10°C)	35
Tabela 3 --Determinação do pH e a_w de fiambre da pá a diferentes temperaturas de armazenamento (4 e 10°C).....	36
Tabela 4 -Determinações de pH e a_w de queijo fresco de cabra	49
Tabela 5 -Determinações de pH e a_w de queijo fresco de cabra	50
Tabela 6 - Determinações de contagens de <i>L. monocytogenes</i> para queijo fresco de cabra	51
Tabela 7 -Determinações de contagens de <i>L. monocytogenes</i> para fiambre da pá.	51
Tabela 8 -Determinações de contagens de <i>Enterobacteriaceae</i> para queijo fresco de cabra	52
Tabela 9 -Determinações de contagens de <i>Enterobacteriaceae</i> para fiambre da pá	52
Tabela 10 -Determinações de contagens de bactérias ácido lácticas para queijo fresco de cabra.....	52
Tabela 11 - Determinações de contagens de bactérias ácido lácticas para fiambre da pá.....	52

Lista de figuras

Figura 1 - Gráfico de composição e distribuição energética do queijo fresco (Fonte: INSA, 2020)	15
Figura 2 - Fluxograma do processo de fabrico de queijo	16
Figura 3 -Gráfico de composição e distribuição energética de fiambre de porco (Fonte: INSA, 2020) 18	
Figura 4 -Fluxograma do processo de fabrico de fiambre de porco	19
Figura 5 - Queijo fresco de leite de cabra, de produção industrial, embalado em atmosfera.....	29
Figura 6 - fiambre de pá de porco de produção industrial, hermeticamente selado e embalado.....	30
Figura 7 - a) e b) exemplo de placa com resultado negativo para teste de inibição de sobrenadante; c) e d) exemplo de placa com resultado negativo para teste de inibição de cultura contra cultura.....	42

Lista de abreviaturas

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CE – Comissão Europeia

a_w – Atividade da água

pH – Potencial hidrogénico

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

OMS – Organização Mundial da Saúde

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

ufc/g – Unidades formadoras de colónias por grama

BAL – Bactérias do ácido láctico

Índice

Abstract.....	2
Agradecimentos.....	4
Lista de gráficos.....	5
Lista de tabelas.....	5
Lista de abreviaturas.....	6
1. Introdução.....	9
2. Objetivo e justificação do presente estudo.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Conceito de Segurança Alimentar.....	11
3.2 Enquadramento legal de segurança e qualidade alimentar na indústria.....	12
3.3 Classificação do sector de charcutaria e os seus produtos.....	14
3.4 Definição e Classificação de queijo fresco.....	14
3.4.1 Ingredientes e características do queijo fresco.....	15
3.4.2 Processo produtivo de queijo fresco.....	16
3.4.3 Transporte.....	17
3.5 Fiambre de porco da pá.....	17
3.5.1 Definição e Classificação.....	17
3.5.2 Ingredientes e características do fiambre da pá.....	18
3.5.3 Processo de fabrico do fiambre da pá.....	19
3.5.4 Transporte.....	20
3.6 Alterações e perigos associados a produtos alimentares.....	20
3.7 Alterações físicas.....	21
3.8 Alterações químicas.....	21
3.9 Alterações microbiológicas.....	22
4. Tempo de vida útil dos alimentos.....	23
4.1 Conceito de tempo de vida útil ou <i>shelf life</i> de um produto alimentar.....	23
4.2 Fatores que influenciam o tempo de validade dos produtos alimentares.....	23
4.3 Determinação da vida útil.....	24
4.3.1 Análises físico-químicas.....	25
4.3.2 Análises microbiológicas.....	26
5. Material e métodos.....	29
5.1 Obtenção de amostras.....	29
5.1.1 Queijo fresco de cabra tradicional português.....	29
5.1.2 Fiambre da pá.....	30

5.2	Análises Microbiológicas	31
5.2.1	Culturas bacterianas e preparação de culturas	31
5.2.2	Preparação diluições	31
5.2.3	Análises Microbiológicas	31
5.2.4	Determinação da atividade antimicrobiana e mecanismos de inibição	32
5.2.5	Preparação de culturas de BAL e <i>L. monocytogenes</i>	32
5.3	Análises físico-químicas (pH e a_w).....	33
6.	Resultados e Discussão	34
6.1	Avaliação sensorial dos produtos	34
6.2	pH e determinação de a_w no queijo fresco de cabra.....	35
6.3	pH e determinação de a_w no fiambre da pá.....	36
6.4	Evolução do teor microbiológico.....	37
6.4.1	<i>L. monocytogenes</i>	37
6.4.2	<i>Enterobacteriaceae</i>	39
6.4.3	Bactérias do ácido lático (BAL)	40
6.5	Determinação da atividade antimicrobiana e mecanismos de inibição	42
7.	Conclusões gerais.....	43
8.	Trabalhos futuros.....	44
9.	Bibliografia.....	45
Anexos	48
	Anexo 1 - Tabelas completas de análise de pH e a_w para os produtos em estudo.	49
	Anexo 2 – Cálculos para a determinação ufc/g	51

1. Introdução

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito da disciplina de estágio curricular do Mestrado em Engenharia Alimentar. O projeto decorreu durante 6 meses no entreposto de uma multinacional sediada no Grande Porto e também nas instalações da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto. Integrado no Departamento de Controlo da Qualidade, o estágio teve como objetivo acompanhar as tarefas desenvolvidas e relacionadas com a colheita de produtos para análise microbiológica e verificação de parâmetros da qualidade e segurança relacionados com produtos alimentares na secção da charcutaria.

O objetivo do estudo passou por validar o tempo de vida útil de dois produtos de charcutaria após abertura da embalagem original: queijo fresco de cabra e fiambre da pá. As análises destes produtos foram feitas tendo em conta a sua validade indicativa na secção de charcutaria de 24 horas e a sua conservação a duas temperaturas de armazenamento (4 e 10 °C).

No decurso do trabalho realizado foram efetuadas visitas a lojas de retalho alimentar, pertencentes à multinacional que acolheu este estágio, não só para recolha de amostras para análise, mas também para aprendizagem e conhecimento de todo o processo produtivo inserido nestas.

No laboratório, o principal objetivo do estudo foi a análise sensorial, físico-química e microbiológica dos produtos com vista à validação do tempo de validade após abertura da embalagem. Estas análises pretendem visar os da qualidade e segurança, bem como perceber qual e, de que modo, ocorre o crescimento microbiano ao longo do tempo e sob diferentes condições de armazenamento.

A análise e discussão dos resultados, bem como as conclusões associadas a este estudo representam o principal objetivo da presente dissertação.

2. Objetivo e justificação do presente estudo

O fornecimento de produtos com qualidade e que não comprometam a saúde da população, são uns dos principais compromissos legais e morais das empresas com o consumidor. Nestas empresas, é notório que existe uma crescente preocupação e trabalho de modo a garantir a segurança e qualidade dos seus produtos, não só pelo seu compromisso legal, mas também do ponto de vista de competição no mercado. Atualmente, todas as empresas de distribuição procuram ser a primeira escolha da população e, por esta razão, é importante que as exigências e preocupações dos seus consumidores sejam correspondidas.

Com o avanço da ciência e das novas tecnologias, os padrões de exigência adaptam-se e evoluem. Por esta razão, o Controlo da Qualidade e segurança alimentar encontram-se em constante adaptação e evolução de modo a desenvolver novas metodologias que permitam não só, corresponder às exigências do seu público, mas também colocar as empresas numa melhor posição no mercado face aos seus concorrentes.

A charcutaria destaca-se como uma das áreas de maior diversidade e venda de produtos prontos a comer nas lojas de retalho. Para além da comercialização de produtos embalados nesta secção, destaca-se também a venda de fatiados onde se inserem os produtos alvo deste estudo. Nesta área de retalho, são fatiados inúmeros produtos de diferente carácter, critérios de manuseamento e higiene. Devido ao tipo de produtos comercializados nesta secção, é importante que os padrões da qualidade e segurança alimentar sejam aplicados.

O tempo de vida útil para cada produto que é processado na charcutaria está determinado com uma validade indicativa. Estas validades servem para garantir a qualidade que o consumidor procura se, mantem, mas também para evitar desperdícios alimentares que se refletem em grandes quebras por parte da empresa. Deste modo, determinou-se a tarefa de avaliar microbiologicamente e sensorialmente a evolução da qualidade dos seus produtos ao longo da sua vida útil após abertura da embalagem original. Os produtos apresentados neste estudo foram adquiridos numa loja de retalho diretamente da secção da charcutaria. Por motivos de confidencialidade, as suas marcas bem como o local do presente estágio não estão declaradas no relatório, no entanto, toda a informação sobre os mesmos foi adquirida com o acesso às suas respetivas fichas

técnicas e troca de informação com a entidade responsável pelo seu Controlo da Qualidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Conceito de Segurança Alimentar

O conceito de segurança alimentar teve a sua origem durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918). Nesta época, o significado de segurança alimentar, relaciona-se com o conceito de segurança nacional e de autonomia de produção alimentar de cada país. Com o clima tumultuoso da época a nível político e militar, a proteção dos serviços alimentares era algo fundamental e, por esta razão, a segurança alimentar adquire um novo papel na sociedade (Burity et al., 2010).

Nesta época, a falta de autossuficiência alimentar na grande maioria dos países europeus, leva à implementação do princípio de suficiência no conceito de Segurança alimentar. Neste sentido, foram estudadas alternativas, de forma a aumentar a produção alimentar, não só na comunidade europeia, mas também fora desta.

Conhecida como a “Revolução Verde”, foi lançada uma estratégia para aumentar a produtividade de alguns alimentos, utilizando novas variedades genéticas altamente dependentes de fertilizantes e pesticidas. Na década de 70, realiza-se a Conferência Mundial da Alimentação onde é discutida a crise mundial de produção de alimentos e se propõe uma nova estratégia de armazenamento, de forma a garantir a estabilidade de oferta de alimentos (Nascimento & Andrade, 2010).

Na década seguinte, conclui-se que os problemas de fome e desnutrição advém de problemas de distribuição e não de produção. Existe, novamente, um desenvolvimento do conceito de segurança alimentar e este passa a relacionar também com a garantia de acesso económico e físico aos alimentos para todos os países e toda a população (Pereira Silva, 2014).

Já no final da década de 80 são também levantadas questões referentes às vertentes sanitárias, biológicas e nutricionais do fornecimento alimentar (Nascimento & Andrade, 2010). Em 1992, dá-se a Conferência Internacional de Nutrição, pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e nas suas declarações, a segurança alimentar passa a ser denominada Segurança Alimentar e Nutricional.

A evolução contínua deste conceito, reflete-se nas preocupações associadas a cada época. Atualmente, a segurança alimentar entende-se como um conceito muito vasto que se associa a diferentes parâmetros relativos à qualidade, acessibilidade e segurança. A garantia, a todos, de acesso básico a alimentos de qualidade que respeitem todas as boas práticas de produção, processamento, distribuição, comercialização, e, que não comprometam a saúde do consumidor, são os pilares da indústria alimentar.

Em resposta aos padrões da sociedade e à exigência do consumidor, a indústria alimentar encontra-se em constante desenvolvimento, procurando acompanhar e corresponder a todas estas exigências que lhe são impostas, garantindo a salubridade e qualidade nutricional dos seus alimentos (FIPA, 2020).

Os conceitos de segurança e qualidade alimentar são indissociáveis. No entanto, a qualidade alimentar define-se como o conjunto de características que irão influenciar a aceitabilidade de um alimento por parte do consumidor, o que integra, naturalmente, a exigência da sua inocuidade e segurança de consumo. Contudo, um alimento que seja inócuo, se não corresponder às características sensoriais apreciadas pelo consumidor, ou se não preencher os requisitos nutricionais da embalagem, conservação, ou outras características expectáveis, não será aceite por este (Gava, 1998).

A indústria alimentar tem promovido a qualidade dos seus produtos sem descuidar ou pôr em causa a segurança alimentar através da implementação de sistemas de autocontrolo de potenciais perigos como o HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*), estudo da *shelf-life*, legislação para critérios microbiológicos e aposta no desenvolvimento de novos produtos.

3.2 Enquadramento legal de segurança e qualidade alimentar na indústria

A qualidade de um alimento depende de diversos fatores, no entanto, a segurança encontra-se na base deste conceito. Atualmente, existe legislação e normas que estabelecem critérios bem definidos que previnem e impedem a produção, distribuição e consumo de produtos que não sejam seguros (ASAE, 2020).

A constituição orgânica dos alimentos torna-os frágeis do ponto de vista da segurança para o consumidor (FAO, 2014). Por esta razão, em 1993 através da Diretiva 93/43/CEE, o sistema HACCP começa a fazer parte da regulamentação europeia, tendo por base de aplicação os princípios expressos no *Codex Alimentarius* e em 2006, o Regulamento (CE) n° 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, e que revoga a Diretiva 93/43/CEE. No seu artº5 estipula que todos os operadores do setor

alimentar devem criar, aplicar e manter um processo ou processos permanentes baseados nos 7 princípios do HACCP (ASAE, 2020).

Metodologias como o HACCP foram implementadas para identificar os perigos de forma específica, avaliar e definir medidas preventivas necessárias para o seu controlo em todas as etapas de produção. Este sistema baseia-se numa abordagem sistemática, documentada e verificável e é atualmente, uma ferramenta imprescindível para os operadores ligados ao sector alimentar, tendo como objetivo controlar os perigos de origem física, química e biológica que possam ocorrer nos alimentos durante qualquer fase da cadeia alimentar desde a produção primária até ao seu consumo (ASAE, 2020).

A implementação do Regulamento (CE) n. o 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, é também uma ferramenta imprescindível para o estudo microbiológico dos alimentos para que deste modo se possa assegurar a inocuidade destes durante o seu tempo de vida útil.

3.3 Classificação do sector de charcutaria e os seus produtos

Como referido anteriormente, nas lojas de retalho, a secção da charcutaria destaca-se como um dos maiores e mais diversificados sectores de venda. Existem inúmeros produtos de diferentes características neste sector, como por exemplo, queijos e fiambres. A grande maioria dos produtos disponíveis na secção de charcutaria são produtos de origem animal e prontos a comer. É importante referir que nesta secção muitos dos produtos são manipulados pelos funcionários, sendo comum o fracionamento e corte de peças de charcutaria. Tendo em conta estes processos que decorrem na secção de charcutaria é importante que a manutenção das boas práticas de higiene e correto manuseamento dos produtos se verifique.

3.4 Queijo fresco

3.4.1 Definição e Classificação

O queijo fresco é um produto muito popular em Portugal. De acordo com a Norma Portuguesa de 1985, caracteriza-se por ser um produto não maturado, obtido por dessoramento lento, após coagulação dos leites inteiro, total ou parcialmente desnatado. Na sua constituição apresenta como ingredientes essenciais o leite de vaca, cabra, ovelha ou as suas misturas, coalho ou outras enzimas coagulantes, e como ingredientes facultativos o leite em pó e deve ser submetido a pasteurização ou outro tratamento térmico (NP-1985). O queijo fresco tradicional pode ser classificado de acordo com o seu teor em matéria gorda como representado na **Tabela 1**.

Tabela 1- Classificação de queijo quanto á sua matéria gorda. (Extraído de NP -1985)

Classificação	Matéria gorda no extracto seco
Muito gordo ou extragordo	Superior a 60%
Gordo	De 45% a 60%
Meio gordo	De 25% a 45%
Pouco gordo	De 10% a 25%
Magro	Máximo - 10%

3.4.2 Ingredientes e características do queijo fresco

O queijo fresco apresenta uma forma cilíndrica, de dimensões variáveis entre os 5 e os 8 centímetros de diâmetro e os 3 e os 5 centímetros de altura com um peso de 70 a 150 gramas. São também comercializados queijos frescos de maiores dimensões entre os 1000 e os 1500 gramas; este tipo de produtos são manipulados na secção da charcutaria e vendidos à fatia. O seu aspeto é uniforme e sem crosta, devido há ausência de cura, com cor branca ou branca amarelada uniforme e de consistência mole. O teor de humidade situa-se entre os 67% e 80%, referente ao queijo isento de matéria gorda e um teor de matéria gorda de 10 a 60% referido ao resíduo seco.

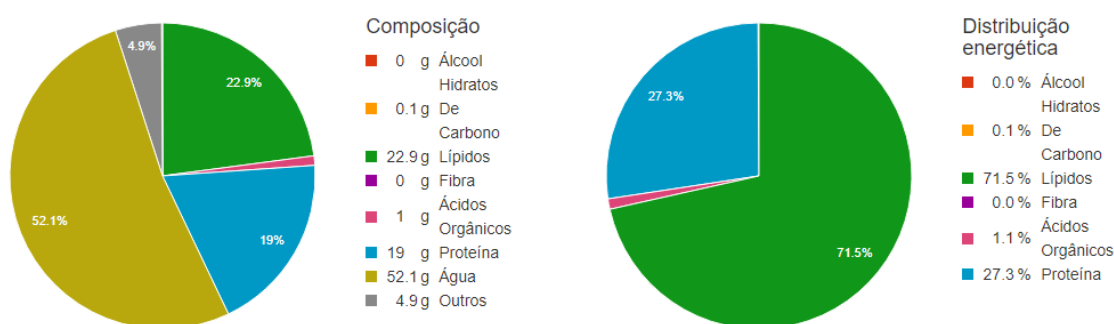


Figura 1- Gráfico de composição e distribuição energética do queijo fresco (Fonte: INSA, 2020)

O queijo fresco é considerado um alimento saudável devido ao seu baixo conteúdo em gordura saturada e elevado teor proteico (**Figura 1**). O seu elevado teor de água e ausência de casca torna o queijo fresco um produto frágil do ponto de vista da segurança e qualidade alimentar. A sua comercialização pode ser feita em cinchos de alumínio ou plástico (PEAD) branco e perfurados. Estes queijos são armazenados nos expositores de lojas de retalho, cafés, restaurantes e mercearias juntamente com outro tipo de produtos com diferentes características que podem provocar contaminações cruzadas. Este fator contribuiu para a introdução no mercado da venda de queijo fresco em embalagens fechadas individuais. Os materiais da embalagem, segundo a Norma Portuguesa 1985, devem ser inócuos, inertes e impermeáveis em relação ao conteúdo.

O queijo fresco deve ser sempre armazenado em refrigeração a uma temperatura entre os 0 e 5° C, tendo nestas condições um período de validade de 5 dias (NP-1985).

3.4.3 Processo produtivo de queijo fresco

O fabrico de queijo resulta da combinação entre a Arte e a Ciência, sendo a Ciência um instrumento ao serviço da Arte. É um processo que compreende uma série de etapas desde a recolha do leite até expedição do produto para o mercado (Associação Portuguesa de Nutrição, 2018).

O fabrico de queijo fresco, (**Figura 2**), inicia-se pela aquisição da matéria prima, que poderá ser adquirida a um outro fornecedor produtor de leite, ou então produzida no próprio local de fabrico, deste modo, adicionando-se mais uma etapa do processo que será a ordenha. De seguida, dá-se a refrigeração do leite até a uma temperatura de 4 °C que pode ser armazenado na unidade de transformação a esta temperatura. A pasteurização do leite é feita numa unidade de processamento térmico e é responsável por eliminar a grande maioria dos microrganismos patogénicos.

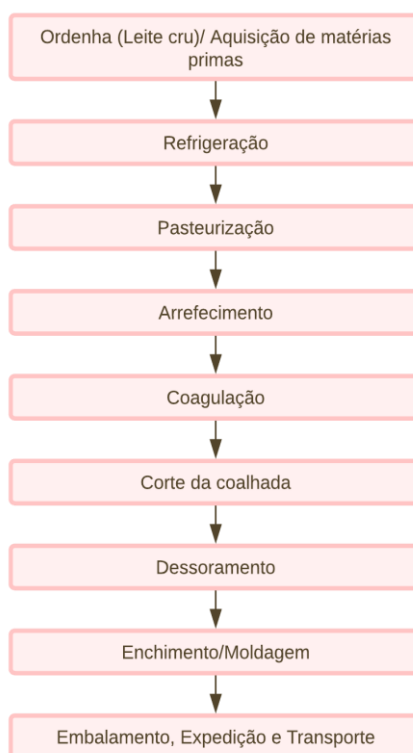


Figura 2- Fluxograma do processo de fabrico de queijo fresco

Na etapa seguinte, após o arrefecimento do leite proveniente da pasteurização dá-se a etapa de coagulação onde o leite é dividido em coalhada (parte sólida) e soro (parte líquida). Esta coalhada forma-se após a desnaturação das caseínas por ação enzimática e é constituída por gordura, água, vestígios de lactose e minerais. Esta coalhada é cortada na horizontal ou vertical e dependendo do tipo e tempo de corte obtêm-se queijos diferentes. Tempos de coagulação longos e fragmentos pequenos de coalhada contêm menos soro e por isso obtêm-se queijos menos húmidos. No queijo fresco a etapa de prensagem é dispensada, bem como as etapas da cura e maturação. Nestes queijos, é feito o dessoramento da coalhada do leite que é, posteriormente, disposto em moldes e embalado para expedição (Associação Portuguesa de Nutrição, 2018).

3.4.4 Transporte

O queijo fresco deve ser conservado à temperatura de refrigeração de 0 °C-5 °C, devendo durante o transporte observar-se uma temperatura máxima, no produto, de 8 °C ou 10 °C, conforme se trate de transporte de longo curso ou de transporte a nível de distribuição, respetivamente (NP-1985).

3.5 Fiambre de porco da pá

3.5.1 Definição e Classificação

Entende-se por fiambre, conforme a Norma Portuguesa NP 4393 (2001), o produto cárneo processado e preparado a partir da carne de porco, salmourada, prensada ou não em moldes e posteriormente submetida a tratamento térmico.

Na norma portuguesa NP 4393, existem cinco classificações diferentes para o fiambre sendo estas: Fiambre da Perna Superior, Fiambre da Perna Extra, Fiambre da Perna, Fiambre da Pá e Fiambre Corrente. Os fiambres da perna, como o nome indica, são preparados a partir de carne de suíno da perna e diferenciam-se entre si pela adição ou ausência de alguns ingredientes. O fiambre da perna superior não inclui a adição de proteína estranha, de amidos ou de fosfatos, no fiambre da perna extra não são adicionadas proteínas não cárneas e amidos, no fiambre da perna podem ser adicionadas proteínas não cárneas, excluindo-se a adição de amidos. O fiambre da pá, objeto de estudo do presente trabalho, é preparado através da carne da zona da pá do suíno e a que podem ser adicionados ingredientes como proteínas não cárneas, excluindo-se a adição de amido. O fiambre corrente, por sua vez, é preparado também a partir da carne de suíno, mas podem ser adicionadas proteínas não cárneas e amidos à sua formulação.

3.5.2 Ingredientes e características do fiambre da pá

Os ingredientes essenciais na constituição do fiambre são a carne de porco, água potável, gelo e sal refinado (NP 4393, 2001). Como ingredientes facultativos podem ser utilizados açúcares, substâncias aromatizantes, aromas de fumo, aditivos de acordo com a legislação em vigor, geleias de cobertura, proteínas cárneas e não cárneas e amidos (NP 4393, 2001).

O fiambre caracteriza-se como um alimento saudável e apreciado pela população devido ao seu elevado teor proteico e pela presença de vitaminas e minerais benéficos para um estilo de vida saudável (**Figura 3**). Usualmente, o fiambre da perna de porco tem uma consistência firme sob a forma de bloco ou sob a forma de fatias. Quando apresentado em bloco possui um invólucro sem roturas e aderente à massa, com um peso de aproximadamente 1kg. O fiambre de porco apresenta uma superfície ligeiramente húmida, cor rosada e textura compacta que permite a sua divisão em fatias finas, bem como, cheiro e sabor característico. O courato e a gordura subcutânea da peça podem ser ou não removidos. Processos como a condimentação, aromatização e fumagem são processos facultativos a cada empresa de produção (Rodrigues, 2013).

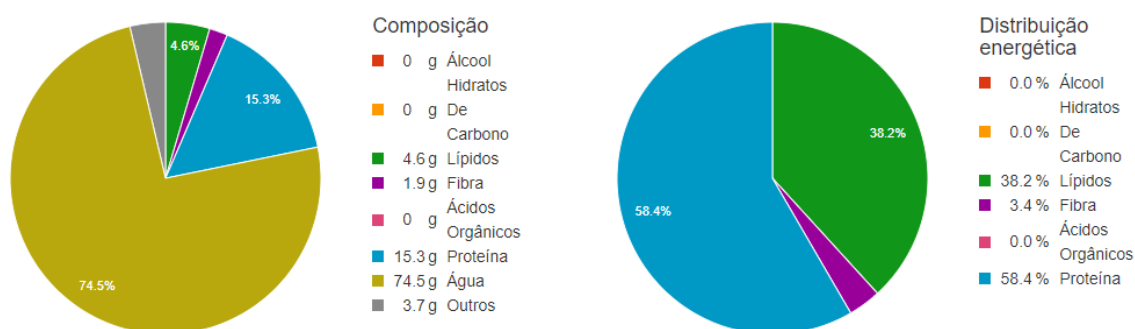


Figura 3-Gráfico de composição e distribuição energética de fiambre de porco (Fonte: INSA, 2020)

3.5.3 Processo de fabrico do fiambre da pá

O processo de fabrico de fiambre encontra-se representado na **Figura 4** e inicia-se com a desmancha e desossa da carne de porco. Esta etapa é caracterizada pela divisão da carcaça em variadas peças e de seguida procede-se á desossa que é a remoção de todos os ossos de maior dimensão. Na sala de preparação da salmoura são pesados e ordenadamente colocados os aditivos, água e sal necessários para a injeção da salmoura nas peças de carcaça (Rodrigues, 2013). Esta etapa destaca-se das restantes pois a falta, sobredose de aditivos ou qualquer alteração da fórmula pode pôr em causa a qualidade do produto final (Dinis, 2012). Após a preparação da salmoura, esta é colocada na injetora e coloca-se também a carne no interior do equipamento. De seguida, através do auxílio de múltiplas micro agulhas dá-se a injeção da salmoura na carne.

Quando este processo termina, as peças de fiambre são enviadas para um novo equipamento que efetua a tenderização. A tenderização é caracterizada por fazer pequenos cortes ao longo das peças para eliminar possíveis veios e para que a salmoura seja absorvida uniformemente (Rodrigues, 2013). O fiambre é colocado no interior de um bombo que através da rotação em torno do seu eixo e sob vácuo permite massajar a carne envolvendo as peças em toda a salmoura. Esta massagem permite também que as peças sofram algum tipo de dano na sua estrutura muscular e com a aplicação de vácuo elevado (cerca de -0,95 bar), permite um melhor desenvolvimento da cor e um *flavour* mais intenso (Rodrigues, 2013).

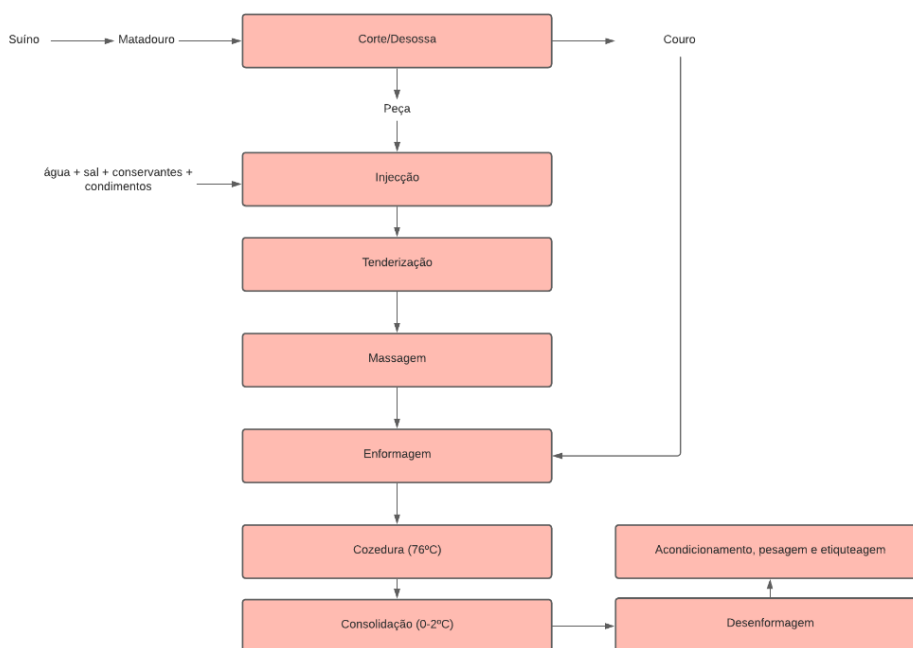


Figura 4-Fluxograma do processo de fabrico de fiambre de porco

A etapa seguinte é o enchimento mecânico em que é colocado um saco plástico de polietileno na boca da saída do equipamento para onde é extraído o fiambre. De seguida dá-se a cozedura do fiambre até o seu interior atingir os 68 – 72 °C.

Após este processo o fiambre é arrefecido com um duche de água fria durante 10 a 15 minutos para reduzir a temperatura interna do produto que se denomina consolidação. Finalmente, envia-se o fiambre para a câmara de refrigeração onde fica acondicionado até à sua distribuição (Rodrigues, 2013).

Transporte

O transporte deste tipo de alimento deve ser feito nos moldes acordados na legislação, em camiões que possuem caixas estanques a uma rede de frio que mantenha os produtos a temperatura adequada (0 a 5 °C) (Dinis, 2012).

3.6 Alterações e perigos associados a produtos alimentares

A deterioração alimentar é algo inevitável e consiste na alteração de propriedades dos alimentos quer de origem biológica, física ou química e que se manifesta em alterações do sabor, odor ou cheiro, comprometendo a sua segurança e qualidade final (Gram et al., 2002).

Como referido anteriormente, as alterações dos produtos alimentares podem ter diferentes origens. Perigos físicos, por exemplo, são frequentemente associados com a fase produtiva do alimento, a contaminação de matérias primas, desgaste de utensílios ou equipamentos que podem levar à inserção de objetos estranhos nos produtos. Por outro lado, a higienização dos equipamentos ou erros nas dosagens de aditivos podem ter como consequência, alterações na formulação de um produto alimentar e que se traduz numa contaminação de origem química (Baptista & Venâncio, 2003).

Relativamente a perigos biológicos, a constituição orgânica dos alimentos apresenta uma fonte ideal para o crescimento microbiano. Uma contaminação deste tipo nem sempre é perceptível a nível sensorial, mas pode estar presente no produto e provocar sérios problemas na saúde do consumidor e, em casos mais extremos, até a sua morte (Baptista & Venâncio, 2003).

Para além destes perigos representados, existem também outras variáveis que podem ter um contributo para estas alterações, fatores como a temperatura, humidade relativa durante o armazenamento, tipo de embalagem e parâmetros físico químicos como a_w , e pH que são vetores que influenciam o tempo de vida útil de qualquer alimento.

Devido aos diversos perigos associados ao consumo alimentar e à inevitável deterioração dos alimentos ao longo do tempo, exige-se uma monitorização constante de

todos os produtos alimentares para avaliar se as características e salubridade deste se mantêm ao longo do seu tempo de vida útil.

3.7 Alterações físicas

As alterações físicas são as mais perceptíveis e podem ser provocadas por diversos fatores como choques ou pressões mecânicas que alterem a constituição do produto. Nestas alterações incluem-se também a exposição ao ar, luz e temperatura que se traduzem em mudanças de cor num alimento e/ou do seu sabor e aparência (Amaral & Oliveira, 2013).

As alterações de textura, muitas vezes provocadas pela perda ou ganho de humidade, são também enquadradas neste sector e usualmente perceptíveis pelo consumidor (Amaral & Oliveira, 2013).

3.8 Alterações químicas

Todos os alimentos são constituídos por uma matriz orgânica que estabelece reações bioquímicas entre si e, por esta razão, um perigo de origem química pode estar sempre presente. As reações químicas são responsáveis pela mudança de cor, sabor e odor dos produtos durante o seu acondicionamento e são representadas, na maioria dos casos, por interações bioquímicas entre os alimentos e a sua microbiota (Hayes, 1995). A degradação enzimática é um destes mecanismos e um reflexo de uma relação bioquímica que provoca alterações químicas na matriz dos produtos.

Estas alterações podem ocorrer também naturalmente por mecanismos naturais como a presença de oxigénio. Observa-se frequentemente este processo de oxidação em produtos como frutas e hortícolas que resulta na sua conseqüente redução do tempo de vida (Hayes, 1995).

A rancificação, principalmente em alimentos que apresentem um elevado teor de gordura é também um processo químico que ocorre devido à degradação dos lípidos, originando odores e sabores indesejáveis. Nesta deterioração, existem dois tipos de ranço: o oxidativo e o hidrolítico ambos responsáveis pela diminuição do tempo de vida útil de alguns produtos alimentares (Velasco, Dobarganes, & Márquez-Ruiz, 2010).

Apesar de não tão frequentes, a sobredosagem de aditivos alimentares as alterações na formulação dos alimentos, são também contributos importantes para a identificação destas alterações químicas (Baptista & Venâncio, 2003).

3.9 Alterações microbiológicas

A ubiquidade de vida em substratos orgânicos e inorgânicos é do conhecimento da maioria da população, mas por vezes também desvalorizada. Atualmente, sabemos que existem inúmeros microrganismos que se podem desenvolver nas superfícies e até no interior de outros organismos sem termos a sua perceção visual. Estes microrganismos podem ser caracterizados de diferentes maneiras consoante o seu papel na biologia do nosso planeta (Baptista & Venâncio, 2003).

A microbiologia é uma das principais ciências responsáveis pelo avanço e desenvolvimento da indústria alimentar. Muitas características de produtos alimentares advêm da sua caracterização microbiológica, como é o caso dos produtos de charcutaria, derivados de leite, hortícolas, entre outros. São alguns destes organismos que fortalecem a sua constituição orgânica, no entanto, outros são também responsáveis pela sua degradação ao longo do tempo (Baptista & Venâncio, 2003).

Estima-se que cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos patogénicos (ASAE, 2020).

A constituição orgânica dos produtos alimentares torna-os frágeis do ponto de vista da segurança microbiológica. A presença de microrganismos em produtos alimentares é registada frequentemente, no entanto, os perigos microbiológicos associados ao consumo destes produtos resulta, na maioria dos casos, pela transmissão de microrganismos patogénicos pela utilização de metodologias erradas nas últimas etapas da sua confeção ou distribuição (Huis In't Veld, 1996). Embora se conheçam mais de 250 tipos diferentes de bactérias, vírus e parasitas causadores de Doenças de Origem Alimentar, apenas alguns aparecem frequentemente.

A presença de microrganismos indicadores em produtos alimentares é um contributo fundamental para o estudo da salubridade destes alimentos. Estes microrganismos podem ser utilizados para determinar a qualidade microbiológica dos géneros alimentícios, a fim de estimar a vida útil dos produtos ou avaliar a sua segurança alimentar. Assim, os agentes microbiológicos podem ser utilizados como indicadores da qualidade quando estão presentes nos alimentos em determinadas quantidades (Baptista & Venâncio, 2003).

4. Tempo de vida útil dos alimentos

4.1 Conceito de tempo de vida útil ou *shelf life* de um produto alimentar

O tempo de prateleira de um alimento corresponde ao período em que um determinado produto, armazenado sob condições especificadas determinadas pela entidade produtora, se encontra em condições ideais e adequadas para consumo (Martins, Lopes, Vicente, & Teixeira, 2008). Do ponto de vista da segurança alimentar, a validação do tempo de prateleira de cada produto depende de muitos fatores e, por esta razão, não existe uma resposta simples que dite qual o prazo de validade que cada produto deve ter.

A sensibilidade do consumidor e as alterações que ocorrem por armazenamento inadequado dos produtos, são alguns dos exemplos que contribuem para a inexistência de uma definição geral deste conceito. A estimativa do período de vida útil de um produto é feita tendo em conta diversos parâmetros, como a sua estabilidade microbiológica e propriedade organolépticas. A vida útil de um produto depende de quatro fatores fundamentais, nomeadamente a sua formulação, o seu processamento, embalagem e as suas condições de armazenamento (Food Safe Authority of Ireland, 2019).

Estes fatores devem ser monitorizados e controlados, mesmo quando o produto se encontra, do ponto de vista alimentar, microbiologicamente estável e seguro, já que as alterações nas propriedades sensoriais quando detetadas pelos consumidores podem levar à sua rejeição.

4.2 Fatores que influenciam o tempo de validade dos produtos alimentares

As alterações que ocorrem nos alimentos ao longo do tempo podem ter diferentes origens e ser influenciadas por diversos fatores que afetam a qualidade e salubridade dos alimentos. Estas alterações podem ser caracterizadas por serem de origem biológica, química ou física, nomeadamente:

- ✓ Crescimento e atividade dos microrganismos;
- ✓ Ação das enzimas presentes nos alimentos;
- ✓ Reações químicas não enzimáticas;
- ✓ Alterações provocadas por insetos e roedores;
- ✓ Mudanças físicas, como aquelas ocasionadas por queimaduras, congelação, desidratação, pressão, entre outros.

O tempo de prateleira é determinado não só pela falta de salubridade de um alimento, mas também pela perda de características e qualidades deste (Food Safe Authority of Ireland, 2019).

4.3 Determinação da vida útil

A determinação da qualidade e segurança alimentar de um produto é feita com base nas alterações das suas características ao longo do tempo. Idealmente, o tempo de validade, deve ser estimado durante a fase de produção e definido antes da sua distribuição ao consumidor (New Zealand Food Safety Authority, 2018). Existem diferentes metodologias para a avaliação da deterioração dos alimentos. Estas avaliações consistem na manipulação ou não, de diferentes condições extrínsecas e independentes das características únicas de cada alimento. Deste modo, é possível estimar um prazo de vida útil para estes produtos e ter uma ideia mais clara dos seus padrões de qualidade final (Food Safe Authority of Ireland, 2019).

Como referido anteriormente, são inúmeros os métodos de avaliação e de determinação do tempo útil de um alimento. Na indústria utilizam-se técnicas empíricas e analíticas para quantificar a qualidade e os atributos das amostras. A manipulação de condições de armazenamento, testes microbiológicos e análises sensoriais, são alguns dos procedimentos utilizados para definir e validar um prazo de validade que cumpra com os requisitos legislativos e com as exigências do consumidor (New Zealand Food Safety Authority, 2018).

Apesar dos testes que são feitos para a determinação de validade dos produtos alimentares devido à sua composição orgânica, a sua deterioração ao longo do tempo é inevitável. Com o objetivo de combater os problemas associados à qualidade e segurança dos alimentos e também para confirmar o cumprimento das normas de segurança pela entidade fabril, é necessário recorrer a análises de rotina. Estas análises microbiológicas, físicas, químicas e sensoriais são o que permitem a evolução do departamento da qualidade e que garantem a distribuição e venda de um produto seguro e de alta qualidade (New Zealand Food Safety Authority, 2018).

4.3.1 Análises físico químicas

As alterações físicas e químicas dos alimentos resultam na redução da sua vida útil. Alguns dos motivos responsáveis por alterações físicas são as más práticas durante a colheita, transformação e distribuição dos produtos, podendo ser prevenidas através da correta manipulação dos alimentos, da utilização de embalagens adequadas e de um rigoroso controlo das temperaturas de armazenamento. Já as alterações químicas englobam as reações enzimáticas e oxidativas, nomeadamente a oxidação lipídica, e o escurecimento não enzimático, envolvendo os constituintes internos dos alimentos e os fatores ambientais externos. Nas análises químicas e físicas são utilizados testes instrumentais para detetar possíveis mudanças na qualidade dos alimentos, como a medição do pH e da a_w , medição da textura, da cor e controlo da embalagem.

4.3.1.1 Potencial de Hidrogénio (pH)

O valor de pH é um dos indicadores físico químicos mais utilizados para análise no estudo da estimativa do tempo prateleira e controlo da qualidade de um produto alimentar (Hutkins & Nannen, 1993). A sua evolução durante o tempo de vida útil tem um impacto significativo nas características organolépticas de um alimento como na sua cor e sabor, mas também no seu crescimento e estabilidade microbiológica.

A determinação do valor de pH é representada pela concentração de iões de hidrogénio num determinado meio e varia numa escala logarítmica de 0 a 14. Esta concentração regula diferentes processos químicos e bioquímicos nos alimentos (Huis In't Veld, 1996).

O valor deste parâmetro é limitante para o crescimento microbiológico já que existem determinados microrganismos que inibem o seu crescimento a diferentes valores de pH. A alteração do valor de pH em produtos alimentares acontece ao longo do tempo e depende de diversos fatores como o seu amadurecimento, práticas de manuseamento pré processamento e variações sazonais. O crescimento microbiológico também pode ter um elevado contributo para a alteração do valor de pH sendo que, por exemplo, bactérias do ácido láctico quando presentes podem baixar o valor de pH de um determinado alimento (Huis In't Veld, 1996).

4.3.1.2 Atividade da água (a_w)

A atividade de água (a_w) de um alimento define-se pelo rácio entre a pressão de vapor de um alimento e a pressão do vapor de água pura em condições de equilíbrio e varia de 0 a 1. A a_w é uma característica única de cada alimento que mede a biodisponibilidade de água num alimento para as reações químicas e bioquímicas (Chandler, 1988).

A determinação da a_w é um parâmetro fundamental para a determinação da vida útil e da estabilidade microbiológica de um produto alimentar. Os processos químicos e bioquímicos da matriz de um alimento são diretamente afetados pela quantidade de água presente. Um dos efeitos em reduzir o teor de água nos produtos de origem alimentar é provocar subsequentes alterações nestes processos, de modo a desacelerar a taxa de deterioração ao longo do tempo e inibir o crescimento microbiológico (Chandler, 1988).

A a_w da grande maioria dos alimentos frescos é superior a 0,95, valor que favorece o desenvolvimento bacteriano. A grande maioria das bactérias patogénicas e deteriorantes de alimentos, possuem a capacidade para se desenvolverem em produtos alimentares frescos, devido aos seus elevados valores de a_w . Por outro lado, todos os microrganismos apresentam também um limite de crescimento em relação a este parâmetro.

Por esta razão, a atividade de água apresenta-se como um fator limitante no crescimento microbiano e deve ter-se em conta sempre que se faz um estudo do tempo útil de vida de um determinado alimento (Chandler, 1988).

4.3.2 Análises microbiológicas

A caracterização microbiológica é determinante para garantir a estabilidade de um produto. A deterioração dos alimentos é provocada em grande parte pela presença destes microrganismos, que se aproveitam deste substrato orgânico para se desenvolver. Apesar da grande maioria não comprometer a saúde do consumidor, são responsáveis pela perda de qualidade de um produto e pela alteração das suas características. Por outro lado, existem também microrganismos patogénicos que apesar de não serem em causa a qualidade ou as características organolépticas de um produto, quando presentes, podem provocar sérios problemas de saúde para o consumidor (Boutrif & Schlundt, 2010).

Para a determinação das análises microbiológicas a realizar, a Comissão Europeia aprovou o Regulamento nº 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Neste regulamento é referido e recomendado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESAs) a monitorização e execução de testes de rotina para a presença de microrganismos patogénicos e onde se definem também os

critérios de higiene dos processos para os diferentes géneros alimentícios e os seus limites correspondentes (ASAE, 2020).

4.3.2.1 Microrganismos indicadores da qualidade

Existem microrganismos de referência que são transversais à grande maioria dos produtos alimentares e que podem ser utilizados para determinar a sua salubridade e qualidade microbiológica. Neste estudo utilizou-se por base, o regulamento nº 2073/2005 com objetivo de definir as análises microbiológicas a serem feitas e o tipo de microrganismos indicadores utilizados para avaliar os produtos.

O crescimento microbiano é muito complexo e diversificado, por esta razão, é necessário identificar os perigos microbiológicos relativamente a cada tipo de produto. Relativamente ao regulamento nº 2073/2005, no **Anexo I** é referido que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., enterotoxinas estafilocócicas e *Enterobacter sakazakii* são considerados critérios de segurança dos géneros alimentícios. Ainda no mesmo anexo, a *Escherichia coli* é identificada como um indicador de contaminação fecal. Os indicadores referidos nos critérios de higiene dos processos são *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *E. coli*, associados a uma vasta gama de produtos alimentares, como carne e produtos derivados, leite e produtos lácteos, ovo produtos, produtos de pesca e produtos hortícolas, frutas e produtos derivados. (Anónimo, 2005).

4.3.2.2 *Listeria monocytogenes*

Talvez um dos microrganismos mais reconhecidos da indústria alimentar, *L. monocytogenes* é uma bactéria patogénica pertencente à família *Listeriaceae*. O crescimento e comportamento desta bactéria foi um dos principais focos deste trabalho.

L. monocytogenes, caracteriza-se como Gram-positiva, anaeróbia facultativa, flagelada, ubíqua e não produtora de esporos. Esta espécie foi descoberta e registada em 1927 e isolada de diversas fontes ambientais, bem como de fezes de alguns seres vivos (Rodrigues, de Sá, & de Melo, 2017). Devido às suas características únicas, *L. monocytogenes* constitui uma das principais ameaças para a indústria alimentar sendo responsável por diversos quadros clínicos e doenças fatais como o caso da listeriose.

L. monocytogenes é uma bactéria resistente e de distribuição ubiqüitária podendo ser encontrada em diversos substratos como é o caso dos produtos alimentares em estudo (Rodrigues et al., 2017). Devido à sua capacidade de crescimento na presença ou ausência de oxigénio, esta bactéria é capaz de se multiplicar em ambientes adversos o que acresce

à dificuldade de controlo deste microrganismo. A sua elevada tolerância a temperaturas negativas e a teores de NaCl elevados, bem como a sua proliferação a baixos valores de a_w , permitem que *L. monocytogenes* sobreviva em condições adversas para a grande maioria de outros microrganismos patogénicos. Deste modo, devido às suas condições de crescimento e aos quadros clínicos associados ao consumo de produtos com este microrganismo, *L. monocytogenes* é uma das principais bactérias com crescente interesse por parte da comunidade científica.

L. monocytogenes apresenta uma temperatura ótima crescimento entre os 30 e 37 °C, no entanto, é capaz de se multiplicar a temperaturas entre os -1,5 e 45 °C. *L. monocytogenes* é problemática por apresentar temperaturas ótimas de crescimento idênticas às temperaturas do corpo humano, sendo que, usualmente, temperaturas acima dos 50 °C são consideradas letais (Rodrigues et al., 2017). O crescimento deste microrganismo a temperaturas na ordem dos 0 °C traduz-se num grave problema de segurança alimentar em relação ao armazenamento refrigerado de produtos alimentares.

L. monocytogenes caracteriza-se também por apresentar um amplo espectro de crescimento a diferentes valores de pH entre 4,0 e 9,6. Não existem evidências ou registos de crescimento desta bactéria abaixo de valores de pH de 4,0, no entanto, *L. monocytogenes* é considerada como relativamente resistente a condições ácidas sendo menos resistente a estas condições quando submetida a temperaturas mais elevadas (Batt, 2014).

Como a grande maioria dos microrganismos bacterianos apresenta um crescimento ideal em alimentos com valores de atividade de água elevados, mais especificamente 0,97. As suas características como a elevada tolerância a cloreto de sódio permitem que *L. monocytogenes* sobreviva durante um extenso período de tempo a valores de a_w mais baixos sendo o valor mais baixo deste crescimento registado de 0,81 (Batt, 2014).

A ocorrência desta bactéria em produtos alimentares traduz-se em graves problemas de saúde para o consumidor. Deste modo, o estudo sobre os alimentos e o seu controlo microbiológico tem um papel fundamental na prevenção do desenvolvimento deste microrganismo (Batt, 2014).

5. Material e métodos

5.1 Obtenção de amostras

Os produtos queijo fresco de cabra tradicional e fiambre da pá foram obtidos diretamente da secção de charcutaria. Os artigos foram fornecidos em peças inteiras, embaladas e seladas na embalagem original do produto. Após a sua aquisição foram transportados da loja até ao laboratório e armazenados nas devidas temperaturas de acondicionamento até ao início da experiência.

5.1.1 Queijo fresco de cabra tradicional português

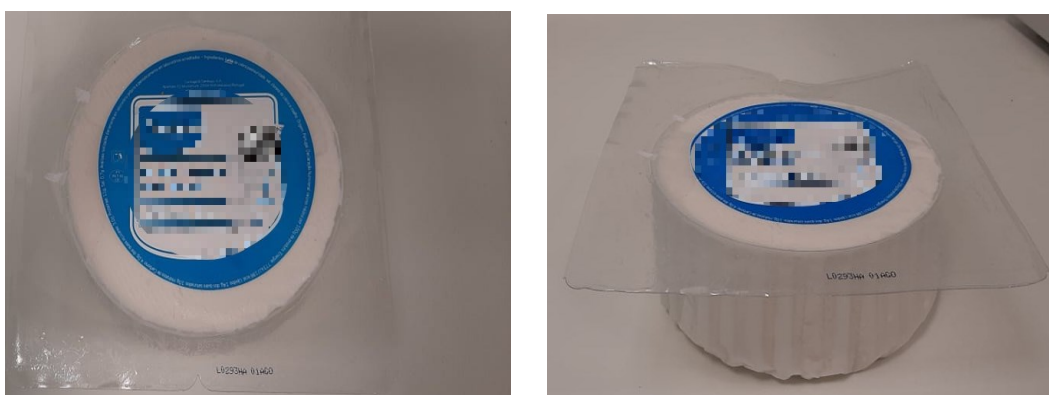


Figura 5- Queijo fresco de leite de cabra, de produção industrial, embalado em atmosfera.

- **Designação** – Queijo fresco de cabra
- **Descrição** - produto não maturado obtido por dessoramento lento, após coagulação enzimática de leite inteiro, total ou parcialmente desnatado. O leite ou a mistura do leite com a totalidade ou parte dos ingredientes a seguir referidos deve ser submetido a pasteurização ou outro tratamento térmico de efeito equivalente
- **Ingredientes** - Leite de cabra pasteurizado, sal, cloreto de cálcio e coalho.
- **Peso** - 1200 gramas
- **Cor** – Branca ou branca amarelada, uniforme
- **Aspetto**- Uniforme e sem crosta
- **Sabor e cheiro** - *Suis generis*
- **Validade** - 10 (Após embalamento e desde que conservado nas condições indicadas no rótulo)
- **Acondicionamento** - Este produto é comercializado à unidade, em embalagem de material plástico termoformada e hermeticamente fechada.

- **Armazenamento** - O armazenamento deverá ser efetuado a uma temperatura compreendida entre 0 °C a 7 °C.
- **Distribuição** - Este produto deve ser transportado em viaturas com caixa isotérmica refrigerada, em condições higiénicas consideradas próprias e a temperaturas compreendidas entre 0 °C e 10 °C.

5.1.2 Fiambre da pá



Figura 6- fiambre de pá de porco de produção industrial, hermeticamente selado e embalado

- **Designação** – Fiambre da pá
- **Descrição** - produto cárneo processado e preparado a partir da carne de porco, salmourada, prensada ou não em moldes e submetido a tratamento térmico
- **Ingredientes** - carne da pá de suíno, água, proteína de soja, dextrose, sal, gelificante (E407), emulsionante (E452), conservante (E250), aromas, estabilizador (E331), antioxidante (E316), corante (E120)
- **Peso** - 5800 gramas
- **Cor** – rosada
- **Aspetto**- homogéneo, fibras musculares visíveis
- **Sabor e cheiro** - *Suis generis*
- **Validade** – 75 dias após embalamento e 5 dias após abertura e desde que conservado nas condições indicadas no rótulo
- **Acondicionamento** - Este produto é comercializado à unidade, em embalagem de material plástico termoformada e hermeticamente fechada.
- **Armazenamento** - O armazenamento deverá ser efetuado a uma temperatura compreendida entre 0 °C a 5 °C.

- **Distribuição** - Este produto deve ser transportado em viaturas com caixa isotérmica refrigerada, em condições higiénicas consideradas próprias e a temperaturas compreendidas entre 0°C e 5°C.

5.2 Análises Microbiológicas

5.2.1 Culturas bacterianas e preparação de culturas

Para a preparação do inóculo utilizaram-se sete estirpes de *L. monocytogenes*: *L. monocytogenes* 2542 (Magalhaes et al., 2015); *L. monocytogenes* FSL J1-177; *L. monocytogenes* FSL J1-031 (De Jesús & Whiting, 2003); *L. monocytogenes* FSL N3-013 (Bille & Rocourt, 1996); *L. monocytogenes* FSL R2-499 (CDC, 2000); *L. monocytogenes* FSL N1-227 (CDC, 1998); *L. monocytogenes* MF4077 (Møretro et al., 2017). Fez-se crescer cada estirpe em *Tryptic Soy Agar* (TSA, Biokar) com 6 g/L de Extrato de levedura (YE, Biokar) a 37°C durante 18-24 horas. Para cada uma das sete *L. monocytogenes*, fez-se a sua suspensão em solução ringer (Biokar) e registadas as suas OD (600 nm) de modo a obter uma absorvância de 1.0 (10^9 CFU / ml);

5.2.2 Preparação diluições

De cada suspensão obtida previamente, retirou-se cerca de 1 mL para um tubo vazio e estéril, obtendo-se assim um cocktail de estirpes de *L. monocytogenes*. Deste tubo, fizeram-se sucessivas diluições até obter uma concentração de 10^4 UFC/mL (as diluições foram feitas de modo a obter o volume necessário para inocular as amostras de queijo fresco de cabra e de fiambre da pá – diluição até -5).

Pesou-se cerca de 10 g de amostra e inoculou-se utilizando cerca de 100 uL do cocktail preparado anteriormente com recurso a uma micropipeta. As amostras foram inoculadas à superfície e por incorporação para garantir a dispersão do inóculo (obteve-se uma concentração final de ca. 10^2 CFU/g).

5.2.3 Análises Microbiológicas

Para as análises microbiológicas, as amostras foram homogeneizadas com auxílio do equipamento BagMixer® 400W. A cada saco de amostra (10g) adicionou-se cerca de 90 mL de água peptonada tamponada estéril (BPW, Biokar) e utilizou-se cerca de 1 minuto de homogeneização no caso do queijo fresco e no caso do fiambre cerca de 3 minutos. Foram preparadas as diluições decimais necessárias em solução estéril de Ringer para enumeração microbiana em ALOA (bioMérieux) e incubadas a 37 °C durante 48h ± 2h. Fez-se também a contagem para Bactérias do Ácido Lático (BAL) em de Man, Rogosa

and Sharpe Agar (MRSA, Biokar) e a contagem de *Enterobacteriaceae* em RAPID'*Enterobacteriaceae* Agar (BioRad). As placas correspondentes a BAL foram incubadas a 30 °C durante 48h e 72 horas, e as *Enterobacteriaceae* durante 24h.

As amostras foram preparadas em triplicado e armazenadas a diferentes temperaturas (10 °C e 4 °C) que foram controladas e registadas ao longo da experiência. Utilizaram-se amostras não inoculadas para controlo.

5.2.4 Determinação da atividade antimicrobiana e mecanismos de inibição

A segunda atividade laboratorial efetuada foi a determinação da atividade antimicrobiana de BAL e os respetivos mecanismos de inibição. Esta experiência foi feita de modo a compreender se o crescimento de *L. monocytogenes* poderia ser condicionado pela presença de BAL.

Para tal, foram selecionadas de ambos os produtos, placas com crescimento de BAL referentes a cada tempo e cada diluição efetuada. Destas foram repicadas colónias para nova placa e incubadas a 30 °C. Após crescimento destas colónias frescas, escolheram-se 3 colónias puras de cada placa e repicaram-se novamente em MRSA totalizando 126 isolados para cada produto.

O mesmo processo foi executado para as sete diferentes estirpes de *L. monocytogenes*, com o objetivo de recolher colónias frescas, utilizadas para formar o tapete bacteriano.

5.2.5 Preparação de culturas de BAL e *L. monocytogenes*

Cada um dos isolados foi repicado para tubo de 5 ml de MRSB e incubou-se a 30 °C durante 24 horas. Simultaneamente, repicou-se para tubo de 5 ml de BHI cada uma das 7 estirpes diferentes de *L. monocytogenes* e incubaram-se os tubos a 37 °C durante 24 horas.

Após 24 horas repicaram-se novamente todos os tubos de isolados crescidos referentes a BAL e os tubos referentes a *L. monocytogenes* e incubaram-se às devidas temperaturas durante 24 horas. No dia seguinte, deu-se início a experiência.

Dos sete tubos de *L. monocytogenes* preparados retirou-se cerca de 1ml de cada para um tubo estéril. Deste tubo estéril com auxílio de uma zaragatoa, foi feito um tapete bacteriano em TSA. Cada placa foi marcada com 8 códigos correspondentes a cada isolado de BAL.

Foram feitas duas experiências em simultâneo com as colónias de BAL. A primeira experiência teve como objetivo testar a inibição de cultura contra cultura em que se retirou diretamente dos tubos de MRSB, 10 uL de suspensão de BAL e transferiu-se para placa.

A segunda consistiu em determinar o efeito inibitório do sobrenadante destes isolados no tapete bacteriano de *L. monocytogenes*. Nesta experiência retirou-se cerca de 1 mL de cada cultura para um *ependorf* estéril e submeteu-se a uma centrifugação (7000 rpm; 10 minutos). Deste processo de centrifugação, utilizou-se o sobrenadante e, novamente, retirou-se cerca de 10 uL para a placa.

5.3 Análises físico-químicas (pH e a_w)

A determinação físico química do valor do pH é importante para as análises de deterioração de um alimento. Este parâmetro foi determinado para os dois produtos durante o período experimental de 72 horas. Para tal, utilizou-se o equipamento de medição de *pH Sension+ pH3 Basic laboratory pH & ORP Meter*. Este equipamento é constituído por um eléctrodo e um circuito elétrico que através da medição da diferença do potencial elétrico entre o eléctrodo do aparelho e o eléctrodo de referência obtém-se o pH. As experiências foram efetuadas em tempos diferentes mediram-se 4 réplicas da mesma amostra e obteve-se o pH referente a cada produto.

A atividade da água (a_w) foi outro parâmetro determinado para as duas amostras. Tal como o pH, a atividade de água é uma característica intrínseca de cada alimento e consoante o seu valor, poderá ser um fator de crescimento, limitante ou ótimo, para a multiplicação microbiana. Com recurso ao equipamento, *Lab Master – Novasina*, prepararam-se, tal como no pH, 4 réplicas da cada amostra e determinou-se a a_w para cada uma. Em ambos os produtos, o pH e a atividade da água, foram registados ao longo do tempo de experiência, para perceber como estes parâmetros variam em relação ao tempo e temperatura a que são armazenados.

6. Resultados e Discussão

6.1 Avaliação sensorial dos produtos

Na análise das características sensoriais para avaliação do tempo de vida de um produto alimentar devem ter-se em conta os principais atributos de cor, textura, e *flavor* (odor e sabor) (Felfoul, Attia, & Bornaz, 2017). Devido à impossibilidade da realização de uma análise sensorial com um painel de provadores esta foi feita no laboratório e os parâmetros que se tiveram em conta foram o aspeto, cor, textura e odor.

Ao longo das 72 horas de experiência avaliou-se sensorialmente as amostras dos produtos a diferentes temperaturas de armazenamento (4 °C e 10 °C) com e sem inóculo. No final das 72 horas de experiência não se registou qualquer tipo de alteração perceptível nas amostras de queijo fresco e fiambre da pá armazenadas a 4 °C. Estes dados são corroborados pela literatura. Num estudo feito sobre a análise do tempo de vida de requeijão por Schmidt & Bouma (1992) realizou-se uma análise sensorial com painéis treinados de modo a estudar as alterações sensoriais entre o requeijão armazenado a 4 °C e 7 °C. Neste estudo, os resultados obtidos pela análise sensorial permitem determinar um período de vida útil de 19 dias para as amostras de requeijão armazenadas a 4 °C e de 7 dias para as amostras de requeijão armazenadas a 10 °C. Este tempo de vida útil é estabelecido tendo em conta que, durante esse período, o painel de provadores não registou qualquer diferença significativas nas características organolépticas do produto relativamente às amostras de controlo.

No que diz respeito ao queijo fresco de cabra, ao fim de um período de 72 horas e relativamente à temperatura de armazenamento de 10 °C, verificou-se uma acidificação notória do odor e um aumento significativo da firmeza na textura das amostras, com ou sem inóculo. Por outro lado, nesta temperatura e no final das 72 horas, as amostras de fiambre da pá apresentavam, tal como o queijo fresco de cabra, um odor ácido e verificou-se também a libertação de soro à volta do alimento. Um estudo efetuado por Westling et al. (2016) determinou também que a presença de *Enterobacteriaceae* num queijo fresco pode ser detectada pelos seres humanos, apenas pelo uso das características sensoriais (odor e sabor) o que corrobora também os resultados das contagens microbiológicas obtidas para o queijo fresco de cabra neste estudo.

6.2 pH e determinação de a_w no queijo fresco de cabra

Os resultados destes parâmetros apresentam-se na **Tabela 3**. A determinação do pH e a_w do queijo fresco foi feita ao longo das 72 horas de experiência. No primeiro dia (T_0) obteve-se um valor de pH na ordem de $6,61 \pm 0,02$ e um valor de a_w de $0,9889 \pm 0,0005$.

Os resultados obtidos ao longo das 72 horas de experiência, demonstram uma acidificação do produto em ambas as temperaturas, no entanto, esta acidificação é mais notória na temperatura de armazenamento de 10°C , onde o valor médio de pH mais baixo registrado foi de $5,50 \pm 0,06$ ao final de 72 horas.

Relativamente às amostras armazenadas a 4°C , o valor do pH manteve-se constante durante toda a experiência, sendo o seu valor médio mais baixo registrado de $6,30 \pm 0,06$ também ao final de 72 horas.

No que diz respeito a a_w , o valor deste parâmetro manteve-se constante e não variou com a temperatura.

Tabela 2-Determinação do pH e a_w de queijo fresco de cabra a diferentes temperaturas de armazenamento (4 e 10°C)

QUEIJO FRESCO DE CABRA			
Temperatura de armazenamento	Tempo (Horas)	pH	a_w
4°C	0	$6,61 \pm 0,02$	$0,9889 \pm 0,0005$
	24	$6,50 \pm 0,02$	$0,9890 \pm 0,0002$
	48	$6,50 \pm 0,02$	$0,9887 \pm 0,0010$
	72	$6,30 \pm 0,02$	$0,9830 \pm 0,0050$
10°C	Tempo (Horas)	pH	a_w
	0	$6,61 \pm 0,02$	$0,9889 \pm 0,0005$
	24	$6,25 \pm 0,04$	$0,9896 \pm 0,0003$
	48	$5,58 \pm 0,07$	$0,9806 \pm 0,0057$
	72	$5,50 \pm 0,06$	$0,9836 \pm 0,0014$

6.3 pH e determinação de a_w no fiambre da pá

Os resultados das determinações dos parâmetros físico químicos relativos ao fiambre da pá apresentam-se na **Tabela 4**. No primeiro dia (T_0) registou-se um valor de pH na ordem de $6,57 \pm 0,02$ e um valor de a_w de $0,9695 \pm 0,0009$.

Relativamente aos resultados obtidos ao longo das 72 horas, verificou-se que tanto os valores de pH como de a_w do fiambre da pá não apresentam grandes variações em relação ao seu valor inicial determinado em T_0 . Tal como no queijo fresco de cabra, o valor médio de pH mais baixo registado foi determinado na temperatura de armazenamento de $10\text{ }^\circ\text{C}$ de valor $6,52 \pm 0,03$.

Tabela 3--Determinação do pH e a_w de fiambre da pá a diferentes temperaturas de armazenamento (4 e 10°C)

FIAMBRE DA PÁ			
Temperatura de armazenamento	Tempo (Horas)	pH	a_w
4°C	0	$6,57 \pm 0,02$	$0,9695 \pm 0,0009$
	24	$6,61 \pm 0,02$	$0,9696 \pm 0,0003$
	48	$6,61 \pm 0,03$	$0,9689 \pm 0,0017$
	72	$6,64 \pm 0,01$	$0,9720 \pm 0,0019$
10°C	0	$6,57 \pm 0,02$	$0,9695 \pm 0,0009$
	24	$6,52 \pm 0,04$	$0,9703 \pm 0,0013$
	48	$6,52 \pm 0,03$	$0,9680 \pm 0,0024$
	72	$6,53 \pm 0,01$	$0,9720 \pm 0,0019$

A determinação das análises físico químicas destes produtos reflete que o binómio pH/ a_w é determinante para o crescimento microbiológico. No entanto, os resultados destas análises revelaram que estes parâmetros físico químicos se encontram dentro dos padrões registados nas fichas técnicas dos produtos. Após 24 horas de armazenamento e nos produtos armazenados a $4\text{ }^\circ\text{C}$ não existem alterações significativas que ponham em causa a qualidade deste produto. Por outro lado, o queijo fresco armazenado a $10\text{ }^\circ\text{C}$ apresenta uma queda de valores de pH de aproximadamente uma unidade. Esta acidificação pode ser explicada pela presença de ácido láctico resultante do processo de fermentação de bactérias ácido lácticas (Othman, Ariff, Rios-Solis, & Halim, 2017).

6.4 Evolução do teor microbiológico

6.4.1 *L. monocytogenes*

Tal como esperado, não se encontrou qualquer evidência de *L. monocytogenes* nas amostras de controlo dos dois produtos: queijo fresco de cabra e fiambre da pá., Relativamente às amostras dos produtos inoculadas com *L. monocytogenes*, determinaram-se as suas contagens ao longo das 72 horas de experiência. No **Gráfico 1**, encontra-se representado o seu crescimento logarítmico em relação à população inicial. Estas contagens revelam um crescimento contínuo ao longo do tempo, sendo que se obtêm os valores de contagens de unidades formadoras de colónias mais elevados nas amostras referentes à temperatura de armazenamento de 10 °C.

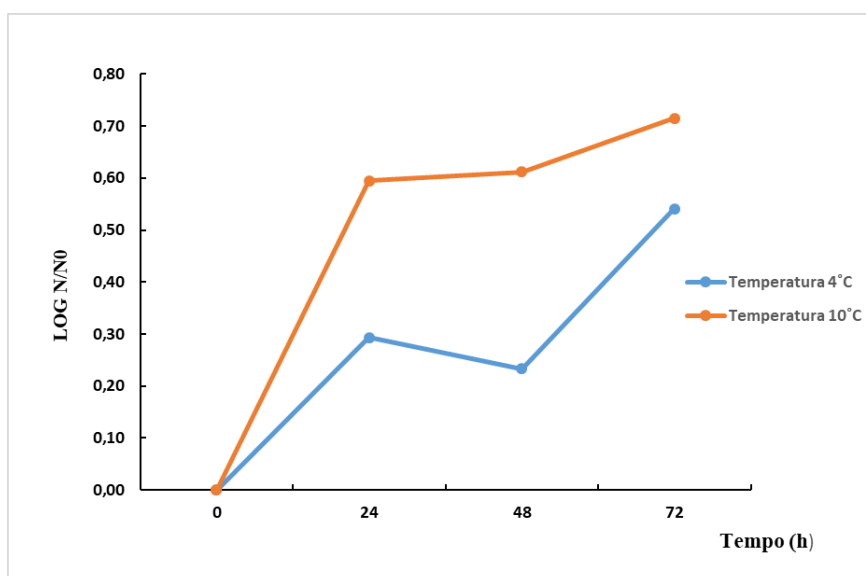


Gráfico 1-Evolução das contagens ($\log (N/N_0)$ ufc/g) de *L. monocytogenes* em amostras inoculadas de queijo fresco de leite de cabra

Tal como no caso do queijo fresco de cabra, não se encontrou qualquer evidência de *L. monocytogenes* no fiambre da pá. Os resultados, registados no **Gráfico 2**, representam as contagens relativas às amostras inoculadas e armazenadas a 4 °C e 10 °C. Nas amostras inoculadas verificou-se um crescimento contínuo de *L. monocytogenes* ao longo do tempo, sendo que se obteve uma grande diferença de crescimento relativamente às amostras armazenadas a temperatura de 10 °C e 4 °C.

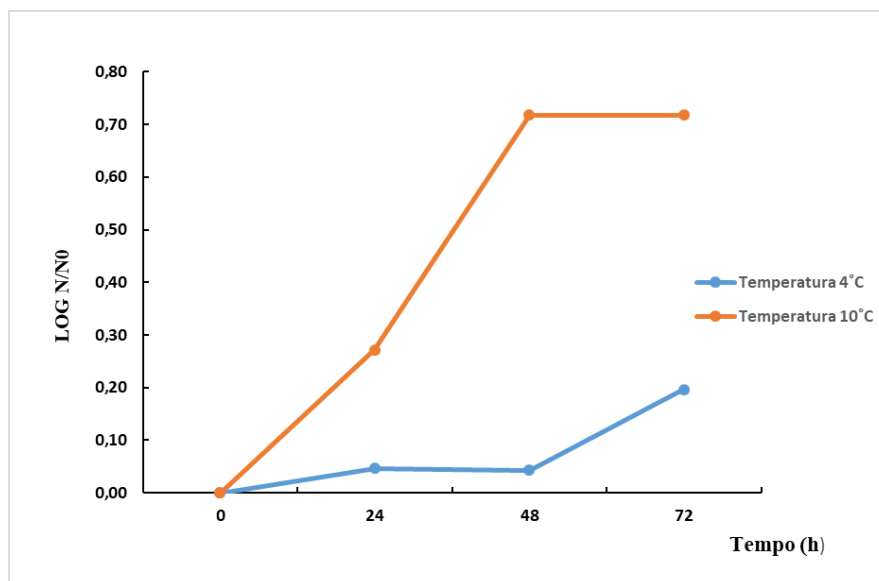


Gráfico 2-Evolução das contagens ($\log(N/N_0)$ ufc/g) de *L. monocytogenes* em amostras inoculadas de fiambre da pá de porco armazenado a 10°C e 4°C

Estes resultados evidenciam que o armazenamento destes produtos a 4 °C não potencia o crescimento de *L. monocytogenes*.

Num estudo por Garrido, García-Jalón, & Vitas, 2010 os autores avaliaram qual o efeito da variação das temperaturas de armazenamento do frigorífico doméstico no crescimento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos. Neste estudo determinou-se que para controlo de produtos prontos a comer deve-se assegurar uma temperatura de armazenamento inferior a 4 °C e que estes produtos devem ser consumidos num período máximo de 5 dias para evitar o risco de listeriose (Garrido et al., 2010). Num estudo semelhante sobre o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em queijo branco, determinou-se um modelo que suporta a conservação deste produto a 4 °C. Neste estudo foi observado que o queijo armazenado a 10 °C atinge os mesmos níveis de crescimento do patogénico que o queijo armazenado a 5 °C em menos de 9 dias (Uhlich et al., 2006).

6.4.2 *Enterobacteriaceae*

Nas contagens de *Enterobacteriaceae* (**Gráfico 3**) registou-se um crescimento contínuo ao longo do tempo nas duas temperaturas de armazenamento, atingindo o seu valor médio mais elevado ao fim de 72 horas. Nas duas curvas de crescimento regista-se uma ligeira diminuição do número de contagens entre as 24 e 48 horas. Ao contrário do esperado, nas amostras inoculadas com *L.monocytogenes*, obteve-se uma média inferior de contagens relativamente às amostras de controlo, no entanto, obteve-se uma média de contagens mais elevadas na temperatura de armazenamento de 10°C.

Relativamente aos critérios e limites microbiológicos de *Enterobacteriaceae* para produtos lácteos e/ou derivados, verifica-se que após 24 horas de armazenamento todas as amostras apresentam um número de contagens superior a $1,0 \times 10^4$ ufc/g (critério estipulado pela entidade de controlo). Estas contagens podem não comprometer a segurança microbiológica ou qualidade num produto, no entanto, servem como um parâmetro de monitorização que pode pôr em causa a qualidade final do produto (Westling et al., 2016).

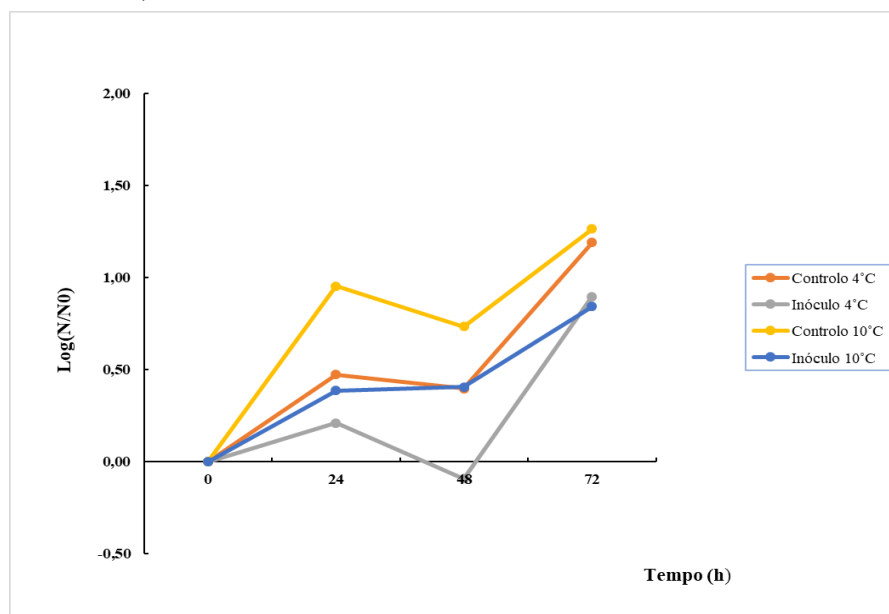


Gráfico 3-Evolução das contagens (log (N/N₀) ufc/g) de *Enterobacteriaceae* em amostras de queijo fresco de leite de cabra armazenado a 10°C e 4°C

Relativamente às contagens de *Enterobacteriaceae* nas amostras de fiambre de porco (**Gráfico 4**), não houve qualquer registo de contagens nas primeiras 48 horas exceto nas amostras com inóculo armazenadas a 10 °C.

Após estas primeiras 48 horas, como esperado, observaram-se os valores mais elevados de crescimento nas amostras com inóculo e nas amostras armazenadas a uma temperatura de 10°C. Nas 72 horas finais registaram-se os valores de crescimento mais elevados, no entanto, estes valores encontram-se dentro dos limites microbiológicos para *Enterobacteriaceae* de $1,0 \times 10^4$ ufc/g (critério estipulado pela entidade de controlo).

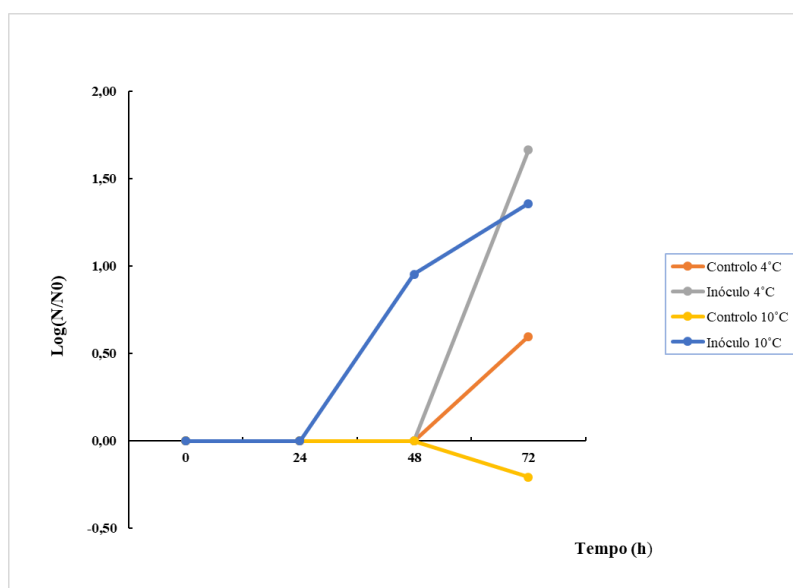


Gráfico 4- Evolução das contagens (log(N/N0) ufc/g) de *Enterobacteriaceae* em amostras de fiambre da pá de porco armazenadas a 10°C e 4°C

6.4.3 Bactérias do ácido láctico (BAL)

No que diz respeito às contagens de bactérias do ácido láctico (BAL), apresentam também um crescimento contínuo nas duas temperaturas de armazenamento atingindo, novamente, o valor médio mais elevado após 72 horas (**Gráfico 5**). Novamente, nas amostras inoculadas, obteve-se uma média mais baixa de contagens relativamente aos respetivos controlos e obteve-se também uma média de contagens mais elevadas na temperatura de armazenamento de 10°C. Um contributo para um menor registo de contagens de BAL relativamente às amostras com inóculo poderá ser a competitividade com *L. monocytogenes* (Amézquita & Brashears, 2002).

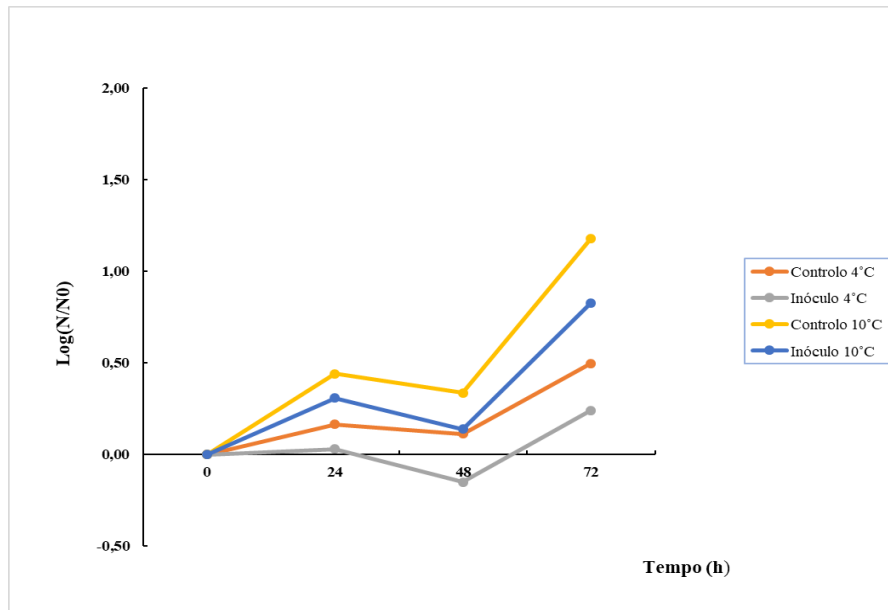


Gráfico 5- Evolução das contagens ($\log(N/N_0)$ ufc/g) de BAL em amostras de queijo fresco de leite de cabra armazenado a 10°C e 4°C

Nas placas de crescimento de BAL de fiambre da pá não se registou qualquer crescimento microbiológico à temperatura de armazenamento de 4 °C durante as 72 horas. (**Gráfico 6**). No Gráfico 6, estão registadas as contagens relativas às amostras armazenadas à temperatura de 10°C. Nestas amostras, não se registou qualquer evidência de crescimento nas placas correspondentes a T_0 , no entanto, após as primeiras 24 horas, houve um crescimento linear até ao final da experiência. Como registado no queijo fresco de cabra determinou-se um maior crescimento nas amostras com inóculo relativamente às amostras de controlo.

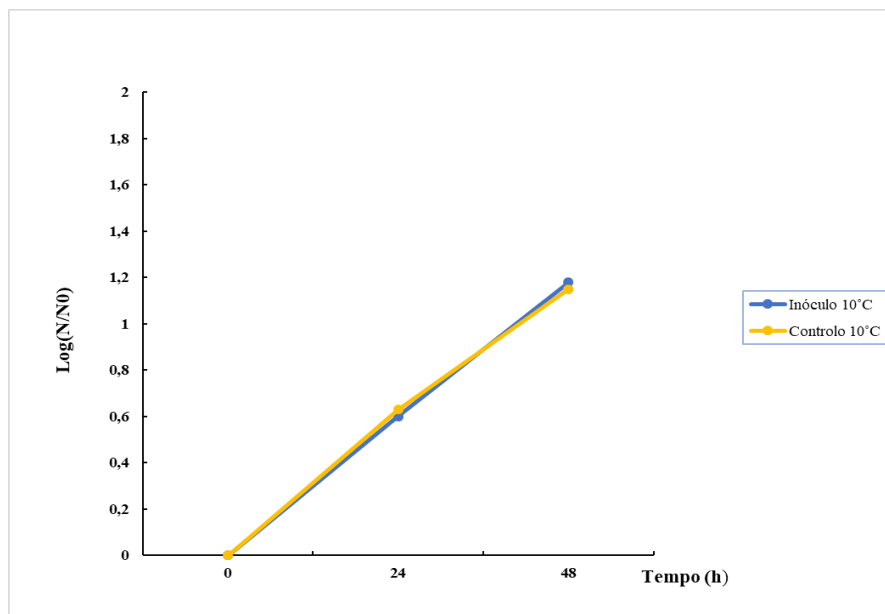


Gráfico 6- Evolução das contagens ($\log(N/N_0)$ ufc/g) de BAL em amostras de fiambre de porco da pá armazenado a 10°C

6.5 Determinação da atividade antimicrobiana e mecanismos de inibição

As BAL podem produzir uma grande variedade de compostos antimicrobianos capazes de afetar o seu próprio crescimento bem como o crescimento de estirpes patogênicas como *L. monocytogenes*.

Remetendo aos resultados anteriores referentes ao crescimento de *L. monocytogenes*, denota-se uma estabilização das contagens nas últimas 24 horas em ambos os produtos. De acordo com esta estabilização e com o aumento de contagens de BAL nos dois produtos ao longo das 72 horas, avaliou-se a possibilidade de existir algum tipo de mecanismo de inibição proveniente das BAL no crescimento de *L. monocytogenes*.

Um estudo realizado por Coelho et al, (2014) corrobora esta hipótese. Neste estudo os autores verificaram que duas estirpes de *Enterococcus* isoladas diretamente de um queijo fresco dos Açores foram responsáveis pela produção de bacteriocinas com propriedades que inibem o crescimento de *L. monocytogenes*. Determinou-se também que a ação destas estirpes inoculadas em queijo fresco, traduziu-se numa redução de cerca de cinco ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*, após 7 dias de armazenamento a 4 °C.

No que diz respeito aos resultados do presente estudo, determinou-se que as BAL isoladas de queijo fresco de cabra e do fiambre da pá não demonstraram qualquer tipo de mecanismo de inibição de cultura contra cultura nem efeito inibitório do sobrenadante. Deste modo, os 126 isolados de BAL das amostras de cada produto não apresentaram qualquer evidência de inibição no crescimento de *L. monocytogenes*. (**Figura 7**)

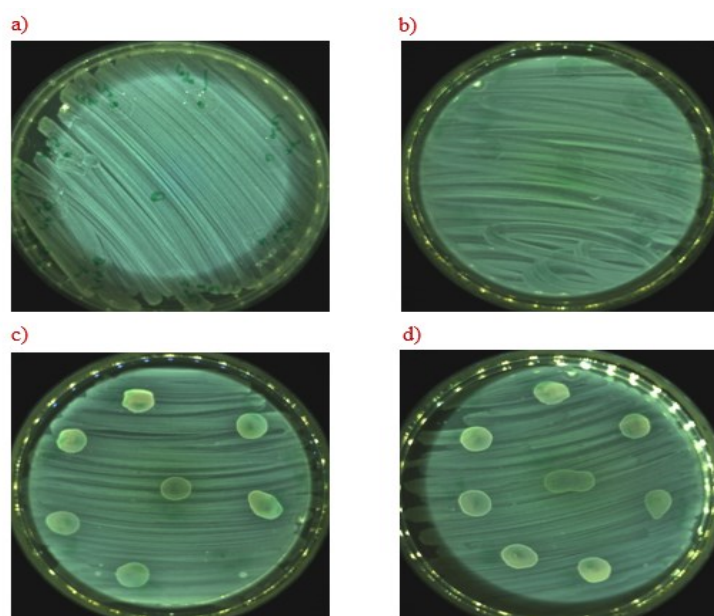


Figura 7- a) e b) exemplo de placa com resultado negativo para teste de inibição de sobrenadante; c) e d) exemplo de placa com resultado negativo para teste de inibição de cultura contracultura.

7. Conclusões gerais

Relativamente às características organoléticas verificou-se que não existe qualquer tipo de alteração no período de armazenamento de 24 horas nestes produtos. No entanto, quando armazenados a uma temperatura de abuso de 10 °C os dois alimentos apresentam alterações do odor e na sua textura ao fim de 72 horas de armazenamento.

As determinações físico químicas de pH e a_w destes produtos revelam condições favoráveis para o crescimento microbiológico, no entanto, estes parâmetros mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos nas suas fichas técnicas durante as 72 horas.

No que diz respeito à segurança microbiológica não se encontrou qualquer evidência da presença de *L. monocytogenes*. Relativamente, ao restante crescimento microbiológico e tendo em conta os limites microbiológicos exigidos pela autoridade de controlo, nas primeiras 24 horas determinou-se que as contagens *Enterobacteriaceae* de queijo fresco de cabra se encontram acima dos limites estabelecidos.

A presença de bactérias ácido lácticas foi detetada nos dois produtos, no entanto, relativamente ao procedimento laboratorial realizado com as colónias de BAL isoladas de ambos os produtos em análise, verificou-se que a sua presença não revela qualquer tipo de mecanismo de inibição no crescimento de *L. monocytogenes*. No entanto, apesar de neste trabalho não ser possível isolar BAL com capacidade de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* esta hipótese é suportada pela literatura (Coelho et al, 2014).

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a validade indicativa de 24 horas não compromete a segurança do consumidor ou a qualidade organolética do fiambre da pá, no entanto, é importante referir que, no caso do queijo fresco de cabra, se determinaram valores de contagens de *Enterobacteriaceae* superiores aos limites estabelecidos, logo no primeiro dia de análise. A extensão da validade indicativa do fiambre da pá para um período superior a 72 horas é uma possibilidade, já que não existe qualquer evidência, nas características organoléticas, físico-químicas ou microbiológicas que comprometa a sua qualidade final ou a sua segurança. Relativamente ao queijo fresco de cabra, a extensão da sua validade indicativa de 72 horas não pode ser avaliada, já que nas primeiras 24 horas o produto se encontra acima dos requerimentos mínimos microbiológicos de contagens para *Enterobacteriaceae*.

8. Trabalhos futuros

A análise destes produtos permitiu considerar a extensão da validade indicativa após 72 horas, no entanto, um dos produtos não se apresentava dentro dos limites microbiológicos necessários para esta análise. Deste modo, seria importante aumentar a amostragem destes produtos tendo em conta os diferentes lotes em que são distribuídos.

O contributo das temperaturas de armazenamento revelou ser um dos parâmetros essenciais para a preservação do tempo de vida útil, por esta razão, o estudo do comportamento microbiológico utilizando diferentes temperaturas de armazenamento seria interessante do ponto de vista da degradação dos alimentos.

A realização de uma análise sensorial com um painel de provadores treinado iria permitir resultados mais fidedignos em relação às características organoléticas dos produtos.

9. Bibliografia

- Amaral, R., & Oliveira, ; Beatriz. (2013). *Perigos Físicos: Importância da sua Identificação para o Sistema de Segurança Alimentar*. Porto.
- Amézquita, A., & Brashears, M. M. (2002). Competitive inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 65(2), 316–325. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.2.316>
- ASAE. (2020). HACCP. Retrieved November 22, 2020, from <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp.aspx>
- Baptista, P., & Venâncio, A. (2003). OS PERIGOS PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS FORVISÃO-CONSULTORIA EM FORMAÇÃO INTEGRADA, LDA. In *OS PERIGOS PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS* (p. 109).
- Batt, C. A. (2014). *Listeria: Listeria monocytogenes*. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00191-9>
- Bille, J., & Rocourt, J. (1996). WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* Subtyping Study - Rationale and set-up of the study. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01140-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01140-3)
- Boutrif, E., & Schlundt, J. (2010). *Risk characterization of microbiological hazards in food*. 122. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/012/i1134e/i1134e.pdf>
- Burity, V., Franceschini, T., Valente, F., & Recine, E. (n.d.). *Direito Humano à Alimentação Adequada no Contexto da Segurança Alimentar e Nutricional Brasília 2010*.
- Chandler, R. E. (n.d.). *THE EFFECT OF TEMPERATURE AND WATER ACTIVITY ON MICROBIAL GROWTH RATE AND FOOD SPOILAGE*.
- Coelho, M. C., Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C., Dapkevicius, M. L. N. E., & Rosa, H. J. D. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>
- De Jesús, A. J., & Whiting, R. C. (2003). Thermal inactivation, growth, and survival studies of *Listeria monocytogenes* strains belonging to three distinct genotypic lineages. *Journal of Food Protection*. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.9.1611>
- Dinis, J. (2012). *Estudo do Fabrico do Fiambre da Perna em Ambiente Industrial*. 3;17;18.
- Felfoul, I., Attia, H., & Bornaz, S. (2017). Shelf life determination of fresh cheese subjected to different modified atmospheres packaging. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19(4), 847–860.
- FIPA. (2020). Prioridades | FIPA. Retrieved December 2, 2020, from <https://www.fipa.pt/fipa/pilares-estrategicos-fipa>
- Food safety and quality | Food and Agriculture Organization of the United Nations. (n.d.). Retrieved November 21, 2020, from <http://www.fao.org/food-safety/en/>

- Garrido, V., García-Jalón, I., & Vitas, A. I. (2010). Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. *Food Control*, 21(6), 896–901. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.007>
- Gava. (1998). *Principios de Tecnologia dos Alimentos* (Vol. 284).
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 79–97. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00233-7)
- Hayes, P. R. (1995). Food Spoilage. In *Food Microbiology and Hygiene* (pp. 106–183). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3546-1_3
- Huis In't Veld, J. H. J. H. I. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7)
- Hutkins, R. W., & Nannen, N. L. (1993). pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 76(8), 2354–2365. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77573-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77573-6)
- Ireland, F. S. A. of. (2019). *E COMMITTEE ON AGRICULTURE FAO's Strategy for Improving Food Safety Globally*. Retrieved from www.fao.org
- Magalhaes, R., Almeida, G., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Mendes, M. M., ... Teixeira, P. (2015). Cheese-related listeriosis outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*.
- Martins, R. C., Lopes, V. V., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2008). Computational shelf-life dating: Complex systems approaches to food quality and safety. *Food and Bioprocess Technology*, 1(3), 207–222. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0071-0>
- Møretro, T., Schirmer, B. C. T., Heir, E., Fagerlund, A., Hjemli, P., & Langsrud, S. (2017). Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.025>
- Nascimento, A. L., & Andrade, S. L. L. S. de. (2010). Segurança alimentar e nutricional: pressupostos para uma nova cidadania? *Ciênc. Cult. (São Paulo)*, 34–38. Retrieved from http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000400012
- New Zealand Food Safety Authority. (2018). A Guide to Calculating the Shelf Life of Foods. In *Global Scientific Journal* (Vol. 4). Retrieved from <http://www.vakuumverpacken.de/GB/pdf/MAPAX Booklet e Sept 2006.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.02.004>
- Norma Portuguesa 4393. (2001). *Norma Portuguesa NP 4393 2001*. Retrieved from <https://repositoriobiblioteca.isel.pt/index.php/np-4393-2001/>

- NP-1985. (1985). Portaria 73/90, 1990-02-01 - DRE. Retrieved November 21, 2020, from <https://dre.pt/pesquisa-avancada/-/asearch/335266/details/maximized?perPage=100&anoDR=1990&types=SERIEI&search=Pesquisar>
- Nutrição, A. P. de. (2018). *Queijos Queijos Queijos Queijos DOS FRESCOS AOS CURADOS*.
- Othman, M., Ariff, A. B., Rios-Solis, L., & Halim, M. (2017). Extractive Fermentation of Lactic Acid in Lactic Acid Bacteria Cultivation: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 2285. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02285>
- Pereira Silva, S. (n.d.). *953 A TRAJETÓRIA HISTÓRICA DA SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL NA AGENDA POLÍTICA NACIONAL: PROJETOS, DESCONTINUIDADES E CONSOLIDAÇÃO*. Retrieved from <http://www.ipea.gov.br>
- Regulamento (CE) n. o 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro - Segurança Alimentar. (n.d.). Retrieved November 19, 2020, from <https://www.segurancalimentar.com/regulamento-ce-n-o-20732005-da-comissao-de-15-de-novembro-2/>
- Rodrigues, A. (2013). *Alice Daniela Vilaça Rodrigues Monitorização do processo produtivo de Charcutaria Alice Daniela Vilaça Rodrigues Monitorização do processo produtivo de Charcutaria*.
- Rodrigues, C. S., de Sá, C. V. G. C., & de Melo, C. B. (2017). An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Ciencia Rural*, 47(2). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160721>
- Schmidt, K., & Bouma, J. (1992). Estimating Shelf-Life of Cottage Cheese Using Hazard Analysis. *Journal of Dairy Science*, 75(11), 2922–2927. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78054-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78054-0)
- Uhlich, G. A., Luchansky, J. B., Tamplin, M. L., Molina-Corral, F. J., Anandan, S., & Porto-Fett, A. C. S. (2006). Effect of storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on Queso Blanco slices. *Journal of Food Safety*, 26(3), 202–214. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2006.00043.x>
- Velasco, J., Dobarganes, C., & Márquez-Ruiz, G. (2010). Oxidative rancidity in foods and food quality. In *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages* (pp. 3–32). <https://doi.org/10.1533/9781845699260.1.3>
- Westling, M., Danielsson-Tham, M.-L., Jass, J., Nilsen, A., Öström, Å., & Tham, W. (2016). Contribution of Enterobacteriaceae to Sensory Characteristics in Soft Cheeses Made from Raw Milk. *Procedia Food Science*, 7, 17–20. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.075>

Anexos

Anexo 1 - Tabelas completas de análise de pH e a_w para os produtos em estudo.

Tabela 4-Determinações de pH e a_w de queijo fresco de cabra

Queijo fresco T _{0h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,62	6,63	6,63	6,57	6,61	0,02
a_w	0,989	0,989	0,988	0,989	0,989	0,0005

Queijo fresco 4°C T _{24h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,51	6,46	6,51	6,5	6,50	0,02
a_w	0,989	0,989	0,989	0,989	0,989	0,0002

Queijo fresco 10°C T _{24h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,28	6,29	6,21	6,2	6,25	0,04
a_w	0,989	0,989	0,990	0,990	0,990	0,0003

Queijo fresco 10°C T _{48h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	5,71	5,91	5,85	5,8	5,82	0,07
a_w	0,986	0,974	0,986	0,976	0,981	0,0057

Queijo fresco 4°C T _{48h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,5	6,46	6,56	6,48	6,50	0,04
a_w	0,989	0,989	0,987	0,990	0,989	0,0010

Queijo fresco 10°C T _{72h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	5,6	5,48	5,45	5,46	5,50	0,06
a_w	0,986	0,984	0,982	0,984	0,984	0,0014

Queijo fresco 4°C T _{72h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,34	6,33	6,33	6,19	6,30	0,06
a_w	0,980	0,988	0,988	0,977	0,983	0,0050

Tabela 5-Determinações de pH e a_w de queijo fresco de cabra

Fiambre da pá 10h						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,57	6,59	6,58	6,54	6,57	0,02
a_w	0,970	0,968	0,970	0,970	0,969	0,0009

Fiambre da pá 4°C T _{24h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,66	6,62	6,59	6,56	6,61	0,04
a_w	0,970	0,969	0,970	0,970	0,970	0,0003

Fiambre da pá 10°C T _{24h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,55	6,53	6,53	6,47	6,52	0,03
a_w	0,971	0,970	0,969	0,972	0,970	0,001

Fiambre da pá 10°C T _{48h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,57	6,52	6,49	6,48	6,52	0,03
a_w	0,964	0,969	0,970	0,969	0,968	0,002

Fiambre da pá 4°C T _{48h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,64	6,62	6,59	6,57	6,61	0,03
a_w	0,970	0,966	0,970	0,970	0,969	0,002

Fiambre da pá 10°C T _{72h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,54	6,52	6,52	6,54	6,53	0,01
a_w	0,975	0,972	0,970	0,971	0,972	0,002

Fiambre da pá 4°C T _{72h}						
Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
pH	6,64	6,64	6,66	6,63	6,64	0,01
a_w	0,970	0,970	0,965	0,970	0,969	0,002

Anexo 2 – Cálculos para a determinação ufc/g

Tabela 6- Determinações de contagens de *L. monocytogenes* para queijo fresco de cabra

<i>Listeria monocytogenes</i>							
Queijo Fresco 4°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	3,70E+00	6,56E-01	0,56	0,079	0,00	0,000
29-ago	24	7,97E+00	2,76E+00	0,89	0,143	0,29	0,080
30-ago	48	6,23E+00	3,31E+00	0,74	0,270	0,23	0,190
31-ago	72	1,51E+01	6,31E+00	1,15	0,177	0,54	0,105

<i>Listeria monocytogenes</i>							
Queijo Fresco 10°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	3,70E+00	6,56E-01	0,56	0,079	0,00	0,000
29-ago	24	1,27E+01	3,40E+00	1,10	0,113	0,59	0,148
30-ago	48	1,81E+01	7,81E+00	1,23	0,197	0,61	0,153
31-ago	72	1,90E+01	6,56E-01	1,28	0,015	0,71	0,072

Tabela 7-Determinações de contagens de *L. monocytogenes* para fiambre da pá.

<i>Listeria monocytogenes</i>							
Fiambre da pá 4°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	1,13E+01	6,66E-01	1,05	0,026	0,00	0,000
29-ago	24	1,15E+01	2,00E+00	1,06	0,080	0,05	0,099
30-ago	48	1,34E+01	1,72E+00	1,13	0,054	0,04	0,080
31-ago	72	1,71E+01	1,47E+00	1,23	0,037	0,20	0,035

<i>Listeria monocytogenes</i>							
Fiambre da pá 10°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	1,13E+01	6,66E-01	1,05	0,026	0,00	0,000
29-ago	24	2,16E+01	3,95E+00	1,33	0,080	0,27	0,105
30-ago	48	6,00E+01	0,00E+00	1,78	0,000	0,72	0,026
31-ago	72	6,00E+01	0,00E+00	1,78	0,000	0,72	0,026

Tabela 8-Determinações de contagens de *Enterobacteriaceae* para queijo fresco de cabra

ENTEROBACTERIACEAE							
Queijo Fresco 4°C CONTROLO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	2,07E+07	1,27E+07	7,24	0,347	0,00	0,000
29-ago	24	5,33E+07	1,79E+07	7,71	0,143	0,47	0,226
30-ago	48	4,83E+07	2,40E+07	7,64	0,272	0,40	0,484
31-ago	72	2,70E+08	3,46E+07	8,43	0,058	1,19	0,369

Queijo Fresco 4°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	7,80E+07	4,91E+07	7,80	0,373	0,00	0,000
29-ago	24	1,06E+08	2,38E+07	8,02	0,103	0,21	0,271
30-ago	48	6,10E+07	3,97E+07	7,71	0,318	-0,09	0,105
31-ago	72	5,07E+08	4,93E+07	8,70	0,044	0,90	0,399

Queijo Fresco 10°C CONTROLO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	2,07E+07	1,27E+07	7,24	0,347	0,00	0,000
29-ago	24	1,57E+08	2,52E+07	8,19	0,072	0,95	0,277
30-ago	48	9,67E+07	3,06E+07	7,97	0,135	0,73	0,231
31-ago	72	3,30E+08	1,13E+08	8,50	0,139	1,27	0,340

Queijo Fresco 10°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	7,80E+07	4,91E+07	7,80	0,373	0,00	0,000
29-ago	24	1,60E+08	4,36E+07	8,19	0,131	0,39	0,445
30-ago	48	1,73E+08	7,02E+07	8,21	0,194	0,41	0,425
31-ago	72	4,47E+08	5,51E+07	8,65	0,054	0,84	0,390

Tabela 9-Determinações de contagens de *Enterobacteriaceae* para fiambre da pá

ENTEROBACTERIACEAE							
Fiambre da pá 4°C CONTROLO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	-	-	-	-	-	-
29-ago	24	-	-	-	-	-	-
30-ago	48	4,67E+01	3,79E+01	1,58	0,338	0,00	0,000
31-ago	72	1,53E+02	4,16E+01	2,18	0,114	0,60	0,224

Fiambre da pá 4°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	-	-	-	-	-	-
29-ago	24	-	-	-	-	-	-
30-ago	48	4,67E+06	7,23E+06	5,04	2,689	0,00	0,000
31-ago	72	3,30E+08	2,89E+08	6,70	3,446	1,67	1,010

Fiambre da pá 10°C CONTROLO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	-	-	-	-	-	-
29-ago	24	-	-	-	-	-	-
30-ago	48	2,43E+02	1,50E+02	2,29	0,389	0,00	0,000
31-ago	72	3,20E+02	3,38E+02	2,09	0,963	-0,21	0,584

Fiambre da pá 10°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	-	-	-	-	-	-
29-ago	24	4,33E+01	5,77E+01	1,35	0,601	0,00	0,000
30-ago	48	2,50E+02	1,56E+02	2,30	0,396	0,96	0,998
31-ago	72	5,20E+02	1,39E+02	2,74	0,127	1,36	0,655

Tabela 10-Determinações de contagens de *bactérias ácido lácticas* para queijo fresco de cabra

Bactérias Ácido Lácticas (LAB)

Queijo Fresco 4°C CONTROLO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	3,37E+07	5,77E+05	7,53	0,007	0,00	0,000
29-ago	24	5,00E+07	1,00E+07	7,69	0,088	0,17	0,095
30-ago	48	4,90E+07	2,44E+07	7,64	0,276	0,11	0,268
31-ago	72	1,07E+08	1,53E+07	8,02	0,064	0,50	0,070

Queijo Fresco 4°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	2,30E+08	3,12E+08	8,05	0,621	0,00	0,000
29-ago	24	1,07E+08	1,15E+07	8,03	0,046	0,03	0,706
30-ago	48	7,30E+07	2,61E+07	7,85	0,145	-0,15	0,532
31-ago	72	2,13E+08	1,50E+08	8,24	0,366	0,24	1,036

Queijo Fresco 10°C CONTROLO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	3,37E+07	5,77E+05	7,53	0,007	0,00	0,000
29-ago	24	9,43E+07	1,88E+07	7,97	0,090	0,44	0,092
30-ago	48	8,10E+07	4,45E+07	7,86	0,241	0,34	0,235
31-ago	72	5,23E+08	1,36E+08	8,71	0,118	1,18	0,124

Queijo Fresco 10°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	2,30E+08	3,12E+08	8,05	0,621	0,00	0,000
29-ago	24	2,43E+08	1,04E+08	8,36	0,179	0,31	0,457
30-ago	48	1,63E+08	5,69E+07	8,19	0,170	0,14	0,524
31-ago	72	8,33E+08	4,46E+08	8,88	0,221	0,83	0,794

Tabela 11- Determinações de contagens de *bactérias ácido láticas* para fiambre da pá

Bactérias Ácido Láticas (LAB)

Fiambre da pá 4°C CONTROLO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	-	-	-	-	-	-
29-ago	24	-	-	-	-	-	-
30-ago	48	-	-	-	-	-	-
31-ago	72	-	-	-	-	-	-

Fiambre da pá 4°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	-	-	-	-	-	-
29-ago	24	-	-	-	-	-	-
30-ago	48	-	-	-	-	-	-
31-ago	72	-	-	-	-	-	-

Fiambre da pá 10°C CONTROLO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	-	-	-	-	-	-
29-ago	24	6,33E+01	3,06E+01	1,76	0,250	0,00	0,000
30-ago	48	3,20E+02	2,46E+02	2,35	0,508	0,60	0,591
31-ago	72	9,53E+02	4,56E+02	2,94	0,236	1,18	0,408

Fiambre da pá 10°C INÓCULO		CFU/g		LOG		LOG N/N0	
DATA	T (horas)	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
28-ago	0	-	-	-	-	-	-
29-ago	24	2,70E+02	1,95E+02	2,32	0,424	0,00	0,000
30-ago	48	9,07E+02	1,82E+02	2,95	0,091	0,63	0,351
31-ago	72	2,93E+03	2,84E+02	3,47	0,041	1,15	0,462