

LUÍS PEDRO PEREIRA CANHOTO

**INFLUÊNCIA DO pH E a_w NA SUSCETIBILIDADE
À OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE AMINAS
BIOGÉNICAS EM PRODUTOS CÁRNEOS
MATURADOS DE HUMIDADE INTERMÉDIA**

Orientador: Professor Doutor Carlos Santos

**Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2023

LUÍS PEDRO PEREIRA CANHOTO

**INFLUÊNCIA DO pH E a_w NA SUSCETIBILIDADE
À OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE AMINAS
BIOGÉNICAS EM PRODUTOS CÁRNEOS
MATURADOS DE HUMIDADE INTERMÉDIA**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, no dia 02 de Novembro de 2023, perante o júri, com Despacho de nomeação N° 415/2023, de 23 de Outubro de 2023, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor David Ramilo

Arguente: Prof^a. Doutora Cristiana Nunes

Orientador: Prof. Doutor Carlos Santos

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer à faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, aos docentes e colaboradores por toda a dedicação, exigência, profissionalismo e transmissão de conhecimentos ao longo destes anos.

Ao meu orientador interno, Professor Doutor Carlos Santos e à minha orientadora externa Professora Doutora Cristina Roseiro, o meu mais sincero obrigado por todo o apoio, orientação, ensinamentos, disponibilidade e amizade ao longo desta etapa. São ambos profissionais de excelência e alvos da minha admiração.

À Engenheira Helena Gonçalves e à Doutora Cristina Antunes pela amizade, companheirismo, disponibilidade e por toda a ajuda prestada a nível laboratorial.

Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária por me ter recebido, bem como a todos os seus funcionários com quem tive a oportunidade de trabalhar e de conviver diariamente. Sem dúvida alguma que fiquei com boas memórias e experiências que irei recordar ao longo da minha vida.

Aos meus amigos de infância e aos novos amigos que fiz ao longo da universidade por toda a amizade, carinho e momentos passados quer seja em férias, viagens, estudos, saídas de campo, festivais ou até mesmo num simples café.

Por último e não menos importante, à minha família por me terem dado esta oportunidade e pelo apoio durante todos estes anos, que mesmo eu estando longe de casa, sempre estiveram cá para mim.

Obrigado!

Resumo

A carne e os produtos cárneos apresentam matrizes muito complexas incorporadas com constituintes muito suscetíveis aos processos de oxidação, possíveis de afetar a qualidade final do produto, incluindo alterações da cor, textura, flavor, perda de nutrientes e formação de compostos tóxicos, como é o caso do aldeído malónico e das aminas biogénicas. Dentro dos produtos cárneos, o salame é um produto cárneo maturado de humidade intermédia que resulta da transformação da carne, de tal forma que a superfície de corte do produto final permita constatar a ausência das características da carne fresca.

Neste estudo, foi avaliada a influência do pH e do a_w na evolução do processo oxidativo e na suscetibilidade da formação de aldeído malónico e de aminas biogénicas em salames, para diferentes tempos de maturação. Através dos resultados foi possível observar que os produtos mais ácidos e simultaneamente detentores de a_w mais elevado tendem a apresentar maior suscetibilidade oxidativa para a formação de aldeído malónico, nomeadamente se maturados por longos períodos. Relativamente à formação de aminas biogénicas, este perigo biológico está significativamente aumentado nos produtos com maior teor de água biologicamente ativa, não sendo detetado qualquer efeito do pH dentro dos limites testados no âmbito do presente trabalho.

Posto isto, deverá continuar a existir um controlo rigoroso durante os processos de manuseio, processamento e armazenamento dos produtos cárneos de forma a prevenir a ocorrência deste tipo de reações, reduzindo por sua vez as perdas económicas das indústrias alimentares.

Palavras-chave: Oxidação lipídica; Ácidos gordos polinsaturados; Aldeído malónico; Aminas biogénicas; Produto cárneo; pH; a_w

Abstract

Meat and meat products have highly complex matrices containing constituents that are very susceptible to oxidation processes. These processes can impact the final product's quality, leading to changes in color, texture, flavor, nutrient loss, and the formation of toxic compounds such as malondialdehyde and biogenic amines. Among meat products, salami is a semi-dry cured meat product resulting from the transformation of meat, in such a way that the cut surface of the final product no longer exhibits the characteristics of fresh meat.

In this study, was evaluated the influence of pH and a_w on the progression of oxidative processes and the susceptibility to the formation of malondialdehyde and biogenic amines in salamis, considering different maturation times. The results indicated that products with higher acidity and simultaneously elevated a_w levels tend to display greater oxidative susceptibility, especially during extended maturation periods. Concerning the formation of biogenic amines, this biological risk is notably increased in products with higher levels of biologically active water, with no observable pH effect within the investigated parameters of this study.

With that being said, it remains crucial to continue the rigorous control during the handling, processing, and storage of meat products in order to prevent the occurrence of these types of reactions. This proactive approach will effectively reduce the economic losses incurred by the food manufacturing sector.

Keywords: Lipid oxidation; Polyunsaturated fatty acid; Malondialdehyde; Biogenic amines; Meat product; pH; a_w

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA – Análise de Variância

a_w – Atividade da água

CE – Comissão Europeia

DNPH – 2,4-Dinitrofenilhidrazina

DOP – Denominação de Origem Protegida

EFSA – European Food Safety Authority

ETG – Especialidade Tradicional Garantida

FAAN – Fração azotada de aminoácidos livres

FDA – Food and Drug Administration

FSCJ – Food Safety Commission of Japan

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (High Performance Liquid Chromatography)

IGP – Indicação Geográfica Protegida

INE – Instituto Nacional de Estatística

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados

NP – Norma Portuguesa

OPA – Ortho-phthalaldehyde

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados

ROS – Reactive Oxygen Species

SFA – Ácidos gordos saturados

TBA – Teste do ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

WHO – World Health Organization

Lista de Unidades e Símbolos

h – Horas

g – Grama

g/kg – Grama por quilograma

g/dia – Grama por dia

kg – Quilograma

M – Molaridade

mg – Miligrama

mg/kg – Miligrama por quilograma

mg/g – Miligrama por grama

mg/ml – Miligrama por mililitro

min – Minutos

ml – Mililitro

ml/min – Mililitro por minuto

N – Normalidade

nm – Nanómetro

n° – Número

ppm – Partes por milhão

rpm – Rotações por minuto

µl – Microlitro

µm – Micrómetro

% – Percentagem

° C – graus Celcius

≤ – Menor ou igual

> – Maior

< – Menor

Índice Geral

1. Atividades do estágio curricular	10
2. Introdução	11
3. Caracterização do setor de carnes/enchidos em Portugal	13
4. Aspetos nutricionais e tecnológicos relevantes da carne de suíno	14
5. Produtos cárneos processados de suíno	17
5.1. Processo de fabrico de produtos cárneos	18
5.1.1. Matérias-Primas e obtenção da miga	19
5.1.2. Preparação e condimentação da massa	19
5.1.3. Enchimento e Atadura	19
5.1.4. Tratamentos Térmicos	19
5.1.5. Embalagem e Maturação	20
6. Oxidação Lipídica.....	21
6.1. Fatores que afetam a oxidação lipídica.....	23
6.1.1. Composição da Carne	23
6.1.1.1. Gordura e Ácidos Gordos	23
6.1.1.2. Hemoproteínas e Metais	24
6.1.1.3. Enzimas pró-oxidantes	24
6.1.1.4. Antioxidantes endógenos	24
6.1.2. Condições de armazenamento	25
6.1.2.1. Tempo e temperatura	25
6.1.2.2. Embalagem e Concentração de O ₂	26
6.2. Principais compostos formados na oxidação lipídica	27
7. Formação de Aminas Biogénicas	29
8. Metodologias analíticas usadas na avaliação da taxa de oxidação.....	33
9. Materiais e Métodos	35

9.1. Delineamento Experimental	35
9.2. Tecnologia de produtos de salame modelo “puro porco”	35
9.3. Metodologias de análise	36
9.3.1. Preparação da amostra	36
9.3.2. Determinação do pH	37
9.3.3. Determinação da atividade da água (a_w)	37
9.3.4. Determinação da gordura total.....	37
9.3.5. Determinação do aldeído malónico	38
9.3.6. Determinação das aminas biogénicas	38
9.3.7. Determinação do azoto dos aminoácidos livres.....	40
9.3.8. Determinação da acidez	40
9.4. Análise estatística	41
10. Resultados e Discussão	42
10.1. Caraterização dos salames	42
10.2. Curvas padrão do aldeído malónico e das diferentes aminas biogénicas	43
10.3. Influência do pH e do tempo de maturação	44
10.4. Influência do a_w e do tempo de maturação	49
11. Conclusão	53
12. Bibliografia.....	54
13. Anexos.....	I
Anexo I – Curvas Padrão.....	I
Anexo II – Comunicações	VI
Anexo III – Materiais e Reagentes utilizados em cada técnica	VII

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição química (valor por 100g) da carne de diferentes espécies	15
Tabela 2. Estrutura química dos aldeídos	27
Tabela 3. Estrutura química das aminas biogénicas	29
Tabela 4. Caracterização dos salames	42
Tabela 5. Equações da reta e respetivos coeficientes de correlação de cada composto analisado	43
Tabela 6. Influência do pH e tempo de maturação nos diferentes parâmetros químicos ..	44
Tabela 7. Influência do a_w e tempo de maturação nos diferentes parâmetros químicos ..	49

Índice de Figuras

Figura 1. Processo de fabrico de salames	18
Figura 2. Processo de auto-oxidação lipídica. RH , Ácido gordo insaturado; R[•] , Radical livre; ROO[•] , Radical peróxido; ROOH , Hidroperóxido	22
Figura 3. Descarboxilação dos aminoácidos livres e formação das respetivas aminas biogénicas	30
Figura 4. Poster “Influence of pH on lipid oxidation, lipolysis and proteolysis susceptibility of pork dry cured sausage	70

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Produção de carne de bovino e suíno em Portugal	13
Gráfico 2. Influência do pH no aldeído malónico dos salames	45
Gráfico 3. Influência do pH na acidez dos salames	46
Gráfico 4. Influência do pH no azoto dos aminoácidos livres dos salames	47

Gráfico 5. Influência do pH nas aminas biogénicas dos salames	48
Gráfico 6. Influência do a_w no aldeído malónico dos salames	50
Gráfico 7. Influência do a_w na acidez dos salames	51
Gráfico 8. Influência do a_w no azoto dos aminoácidos livres dos salames	52
Gráfico 9. Influência do a_w nas aminas biogénicas dos salames	52
Gráfico 10. Curva Padrão do aldeído malónico	65
Gráfico 11. Curva Padrão da triptamina	65
Gráfico 12. Curva Padrão da feniletilamina	66
Gráfico 13. Curva padrão da putrescina	66
Gráfico 14. Curva padrão da cadaverina	67
Gráfico 15. Curva padrão da histamina	67
Gráfico 16. Curva padrão da tiramina	68
Gráfico 17. Curva padrão da espermidina	68
Gráfico 18. Curva padrão da espermina	69

1. Atividades do estágio curricular

O estágio curricular do autor para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, ministrado na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT), que deu origem a esta Dissertação, foi realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), situado em Oeiras, distrito de Lisboa.

O mesmo foi orientado pelo Professor Doutor Carlos Santos e pela Professora Doutora Cristina Roseiro, ambos investigadores da instituição, tendo uma duração de 21 semanas, com início a 8 de Março de 2021 e término a 30 de Julho de 2021, perfazendo um total de 714 horas.

O autor durante este estágio realizou técnicas laboratoriais para a avaliação da suscetibilidade à oxidação lipídica, ao longo do tempo de prateleira (6 e 9 meses), de produtos cárneos fermentados e maturados crus de humidade intermédia, nomeadamente salames de miga fina. Para tal, efetuou a análise e quantificação de parâmetros como o pH, a_w , gordura, aldeído malónico, aminas biogénicas, azoto dos aminoácidos livres e acidez livre para cada uma das dezanove amostras do estudo.

O estágio curricular permitiu ao autor consolidar e aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, assim como adquirir novos conhecimentos técnico laboratoriais, para a área de tecnologia alimentar, bem como da higiene, segurança e qualidade alimentar.

Surgiu a oportunidade de o autor participar em diversas ações de formação e/ou divulgação na área da tecnologia alimentar, nomeadamente: Comunicação em painel no XVI Encontro de Química dos Alimentos (poster em anexo); 9º SPASS – Simpósio para a Promoção de uma Alimentação Saudável; 14.^a Reunião Anual PortFIR; 3.^a edição Comunicação para uma Alimentação Saudável e Segura.

Para além deste estudo, o autor participou e colaborou com outros projetos do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, destacando-se principalmente o cargo de bolsheiro de investigação do projeto Clean Label+: “Substituição do nitrito e fosfato em fiambre de baixa injeção”.

2. Introdução

A ocorrência, relativamente recente, de episódios graves de quebra da segurança de alimentos produzidos em fileiras, consideradas de grande credibilidade técnico-científica, em termos das boas práticas consolidadas em décadas do seu histórico de produção, transformação e comercialização, acarretou, na opinião pública, uma renovada onda de preocupação por este aspeto central da qualidade alimentar obrigando a vigilância redobrada das organizações (EFSA – European Food Safety Authority; FDA – Food and Drug Administration; FSCJ – Food Safety Commission of Japan; WHO – World Health Organization), que tratam de assegurar, a nível global, a avaliação e controlo dos perigos eminentes e respetivos níveis de risco associados (FDA, 2022; CDCP, 2022).

A carne e os seus produtos processados, com características estruturais e composição química tão únicas, representam alimentos incontornáveis da dieta equilibrada dos seres humanos, nomeadamente daqueles em fase de crescimento/desenvolvimento corporal, destacando-se o seu nível elevado de proteína de valor biológico impar e seus derivados funcionais (péptidos e aminoácidos livres), o teor considerável de vitaminas, nomeadamente do grupo B e ainda múltiplos minerais e outros micronutrientes (Toldrá & Reig, 2011).

Porém, alguns dos constituintes das respetivas frações lipídicas intrínsecas (ácidos gordos insaturados/polinsaturados) são, face às condições habitualmente associadas às tecnologias de produção e conservação praticadas, particularmente suscetíveis ao “stress” oxidativo, daí resultando a alteração dos padrões da qualidade sensorial ou “inclusive” a acumulação de compostos com algum risco de toxicidade cumulativa associada a perda do valor nutricional destes alimentos (Domínguez et al., 2019). Cabe destacar neste domínio particular de suscetibilidade os produtos cárneos classificados como fermentados e maturados crus de humidade intermédia, representantes largamente majoritários dos produtos referenciados na salsicharia tradicional portuguesa (Santos & Roseiro, 2018) e um pouco por todo o mundo (Leistner, 1992).

A forte componente microbiana deste tipo de produto, natural ou adicionada, com participação importante em vias metabólicas responsáveis pela evolução química e bioquímica das componentes proteica e lipídica e, indiretamente, pela definição de padrões sensoriais ligados á sua excelente aceitabilidade pela maioria dos consumidores qualificados, pode igualmente contribuir para a presença de metabolitos questionáveis em termos do melhor

padrão de segurança que se pretende assegurar. Se as estirpes dominantes ao longo do processo de fabrico forem detentoras de capacidade descarboxilásica dos aminoácidos livres largamente presentes na matriz, a acumulação de aminas biogénicas pode acontecer com níveis preocupantes. Se nestes teores tivermos incluída a presença maioritária de alguns destes compostos, como a histamina, triptamina e tirosina, tal situação pode configurar um perigo químico iminente, de risco acrescido em consumidores sensíveis/hipersensíveis.

Pelas razões apontadas, os estudos versando esta problemática são de grande acuidade sectorial, importando avaliar os diferentes fatores implicados no processo oxidativo, na formação de aldeído malónico e das aminas biogénicas, por forma a obterem-se as melhores ferramentas técnico-científicas para o respetivo controlo, minimizando os efeitos do seu consumo na saúde (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019). Com a presente dissertação pretendeu-se avaliar o efeito do pH e do a_w na evolução do processo oxidativo e na suscetibilidade da formação de aldeído malónico e de aminas biogénicas em produto modelo fermentado e maturado cru de humidade intermédia (tipo salame de miga fina), para diferentes tempos de maturação/conservação.

Para melhor se perceber e enquadrar a discussão dos resultados e conclusões obtidas, faz ainda parte integrante da presente dissertação uma revisão sucinta dos principais aspetos da composição da carne neste contexto, dos mecanismos envolvidos na oxidação lipídica e dos fatores que mais a impactam na sua dinâmica evolutiva bem como das condições biológicas e químicas indispensáveis para a formação de aldeído malónico e de aminas biogénicas. Acresce ainda a descrição das principais técnicas analíticas utilizadas na deteção e quantificação dos compostos indicadores da respetiva evolução temporal e das tecnologias aplicadas na prevenção dos compostos derivados.

3. Caracterização do setor de carnes/enchidos em Portugal

Entre 2015 e 2016, mais de 3,5 milhões de portugueses, cerca de 34 % da população, consumiu mais de 100 g/dia de carne (Lopes et al., 2017). A tradição da produção de enchidos em Portugal, principalmente à base de carne de suíno, prevalece ainda nos dias de hoje, encontrando-se representada em 4 zonas de forte incidência: **1.** Minho, Trás-os-Montes e Alto Douro; **2.** Beira Interior; **3.** Alto Alentejo; **4.** Baixo Alentejo. Apesar de em Portugal existirem 3 raças autóctones de suínos, como o Porco Alentejano, Bísaro e o Porco Malhado de Alcobça, os animais maioritariamente utilizados são geneticamente cruzados (Qualifica4agro, 2020).

Como resultado da valorização dos produtos cárneos a nível comercial têm sido implementadas estratégias de certificação através da atribuição de marcas, como Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG) (Fernandes, Ribeiro, Cabo & Matos, 2016).

No ano de 2018, Espanha foi considerada como o principal país importador de carne e enchidos portugueses (Qualifica4agro, 2020). Em 2020 a produção total de carne em Portugal foi cerca de 902 mil toneladas, com a carne de suíno a atingir 380 mil toneladas, representando um decréscimo de 2,1% em relação ao ano de 2019 (Gráfico 1). Por outro lado, a produção de carne de bovino foi de 98 mil toneladas, sendo 6,2% superior à do ano de 2019 (INE, 2020).

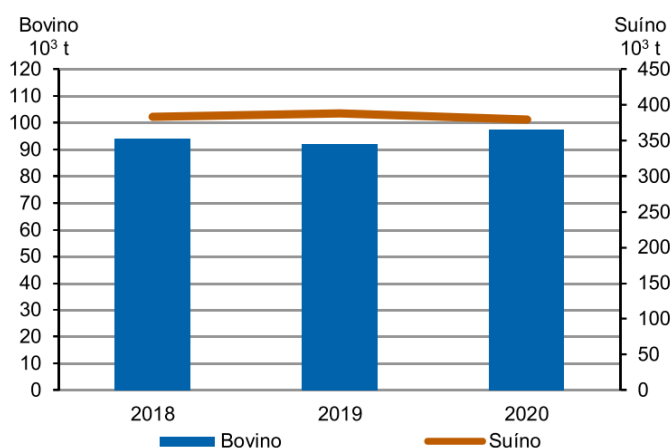


Gráfico 1. Produção de carne de bovino e suíno em Portugal (INE, 2020)

4. Aspetos nutricionais e tecnológicos relevantes da carne de suíno

A composição da carne é determinada por uma gama alargada de fatores, dentre os quais se destacam a espécie e raça do animal, o sexo e idade ao abate, o tipo de manejo e dieta ministrada nas diferentes fases do crescimento e a localização anatômica dos músculos que integram as diferentes peças resultantes da desmancha da carcaça (Cobos & Díaz, 2015). Entre as espécies zootécnicas mais relevantes na produção de carne “vermelha” (Tabela 1), a carne de suíno destaca-se pelo teor de gordura mais elevado (USDA, 2014).

Porém, a respetiva composição média em ácidos gordos garante uma expectativa de maior resiliência ao “stress” oxidativo e ao consequente desenvolvimento de metabolitos responsáveis pela rancificação, conotados a desvios inaceitáveis da qualidade sensorial dos produtos processados. Atualmente, alvo de crítica no presente estadió da evolução civilizacional da população, o teor de gordura potencialmente mais elevado da carne de suíno faz com que também a respetiva porção intramuscular possa surgir com teores superiores à das restantes espécies, sendo esta uma garantia de superiores níveis de aceitabilidade no consumo, no que concerne ao sabor e suculência percecionados (Ruiz Carrascal et al., 2000).

Como animais monogástricos, a composição em ácidos gordos da gordura suína depositada depende diretamente do perfil existente na dieta ministrada, nomeadamente durante o último terço da sua vida útil. Neste domínio, pequenos, mas significativos desvios no teor de ácidos gordos polinsaturados da ração, nomeadamente do C18:2 (ácido linoleico) e C18:3 (ácido linolénico), poderão determinar alterações físico-químicas indesejáveis, comprometedoras do seu melhor desempenho tecnológico, em aspetos particularmente relevantes para a concretização das boas características de textura e conservação dos produtos fermentados/maturados crus de humidade intermédia.

Como em qualquer tipo de carne, a de suíno é também sensível à deterioração microbiana em condições ambiente que potenciem a sua multiplicação e desenvolvimento. No entanto, para idênticas condições de evolução de pH e temperatura “*post-mortem*”, o tempo de vida útil comercial é substancialmente mais reduzido comparativamente à da sua congénere bovina. As razões para esta maior suscetibilidade ainda não estão totalmente esclarecidas.

Tabela 1. Composição química (valor por 100g) da carne de diferentes espécies. (USDA, 2014)

Componente	Unidade	Vaca	Borrego	Porco	Frango	Perú
Água	g	75.91	73.78	72.90	75.46	75.37
Proteína	g	20.20	20.75	20.48	21.39	22.64
Gordura	g	2.87	4.41	5.41	3.08	1.93
Ácidos gordos saturados	%	41.35	49.60	38.24	32.38	34.08
Ácidos gordos monoinsaturados	%	44.23	44.59	49.90	36.89	35.41
Ácidos gordos polinsaturados	%	14.42	5.80	11.86	30.74	30.51
Cinzas	g	1.08	1.12	1.05	0.96	1.04
Minerais	g	1.2	1.2	1.0	1.2	
Energia	Kcal	116	103	112	110	116
Vitamina C	mg	0	0	0.9	2.3	0
Vitamina B1	mg	0.08	0.15	0.88	0.07	0.05
Vitamina B2	mg	0.28	0.39	0.23	0.14	0.19
Niacina	mg	7.83	6.54	5.34	8.24	8.10
Ácido pantoténico	mg	1.37	0.49	0.81	1.06	0.84
Vitamina B6	mg	0.43	0.14	0.50	0.43	0.65
Folatos	µg	13	0	9	7	7
Vitamina B12	µg	1.4	2.71	0.71	0.37	1.24
Vitamina A	µg	0	0	2	16	9
Vitamina D3	µg			0.6	0.1	0.2
Vitamina E	mg	0.26	0.21	0.17	0.21	0.09
Vitamina K	µg			0	1.8	0
Cálcio	mg	15	8	6	12	11
Ferro	mg	0.85	1.64	1.01	0.89	0.86
Magnésio	mg	25	19	25	25	27
Fósforo	mg	211	202	229	173	190
Potássio	mg	328	171	369	229	235
Sódio	mg	86	46	55	77	118
Zinco	mg	3.23	3.01	2.27	1.54	1.84
Cobre	mg	0.113	0.099	0.075	0.053	0.079
Magnésio	mg	0.029	0.024	0.029	0.019	0.012
Selénio	µg	8.6	1.5	35.4	15.7	22.6
Colesterol	mg	83	74	68	70	67

Porém, a reduzida idade ao abate praticada na maioria das raças e cruzamentos industriais desta espécie e uma superior disponibilidade de substâncias facilmente metabolizáveis pelos microrganismos poderão estar implicadas. Por esta fragilidade, a carne suína deverá apresentar valores finais de pH entre 5,6 – 5,8, intervalo indicador de acidificação *post-mortem* satisfatória associada a critérios de manejo *ante/peri-mortem* respeitadores do bem-estar animal, e ser manuseada sob condições de temperatura ambiente tão próxima quanto possível do ponto de congelação da respetiva fase aquosa (-1,5°C) (Araújo et al., 2007).

As bactérias são o grupo de microrganismos que prevalecem na contaminação da carne e produtos cárneos, sendo capazes de se multiplicar e desenvolver mais rapidamente nas condições físico-químicas aí prevalecentes e assim promoverem alterações químicas e sensoriais indesejáveis (Gava, Silva & Frias, 2009). Das que possuem potencial patogenicidade, a *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* são os géneros que mais frequentemente são detetados nesta matriz, podendo a sua presença resultar de contaminação ocorrida nas diferentes fases do processo produtivo, se mal gerido do ponto de vista higio-sanitário (Veloso, 2000; Warriss, 2009).

No caso da carne e dos produtos cárneos, utilizam-se embalagens com atmosferas ricas em dióxido de carbono de forma a prolongar o tempo de vida útil destes mesmos produtos. Para além deste método de conservação, é também usual recorrer-se a outras tecnologias de conservação, como é o caso da congelação, desidratação, arrefecimento rápido, controlo do pH e a_w , salga, fumagem e adição de aditivos. A atividade da água (a_w) define-se como a quantidade de água livre ou disponível para os microrganismos nos alimentos, classificando-se estes valores em elevados (> 0.92), intermédios ($0.85 - 0.92$) ou baixos (< 0.85). Quando os valores de a_w se encontram elevados, a grande parte das bactérias patogénicas consegue desenvolver-se, no entanto quando os valores de a_w são intermédios, o desenvolvimento de microrganismos e produção de toxinas é inibido e controlado, exceto no caso do *Staphylococcus aureus* que se consegue desenvolver em valores de a_w inferiores a 0.90 (Baptista & Linhares, 2005).

5. Produtos cárneos processados de suíno

Ao longo dos anos, o consumo de carne tem vindo a aumentar, especialmente quando se fala na carne de suíno, constatando-se a preferência da população portuguesa por este tipo de carne fresca, sendo esta a mais utilizada tradicionalmente na produção da maior parte dos produtos cárneos de humidade intermédia que se encontram no mercado em Portugal (Santos & Roseiro, 2018).

Segundo o regulamento (CE) nº 853/2004 de 29 de Abril de 2004, os produtos cárneos são considerados produtos fabricados à base de carne, sujeitos a tratamentos tecnológicos diferenciados, impactantes de tal forma na estrutura e características físico-químicas das matérias primas que no produto final deixa de ser possível distinguir as características iniciais da carne fresca. Estes produtos classificam-se atendendo a vários critérios, incluindo o formato, a tecnologia aplicada e os aditivos adicionados (Santos, Gonçalves & Roseiro, 2022).

Em virtude das suas características físico-químicas resultarem da tecnologia de fabrico pouco redutora do desenvolvimento dos mecanismos bioquímicos virtuosos de maturação, os produtos cárneos fermentados e maturados crus de humidade intermédia têm um nível de preferência abrangente em todo o mundo, com especificidades organoléticas que os tornam únicos.

Dentro dos produtos cárneos sujeitos a tratamento térmico pode-se encontrar produtos com coloração rosada como os fiambres e patés. Por outro lado, existem produtos cárneos onde não se aplica esta via para acautelar níveis efetivos de segurança biológica, mas antes sim a implementação de tecnologias de barreira, como é o caso dos salames, salpicões, chouriços, paios e presuntos que apresentam uma cor avermelhada. Quando se fala de tratamento térmico, significa intervir com temperaturas superiores a 50°C, já que abaixo desta temperatura, não ocorre a desnaturação significativa das proteínas miofibrilares da carne. Os produtos cárneos que não são sujeitos a tratamento térmico, acabam por apresentar um tempo de vida útil mais longo, pois ao serem produzidos com recurso à salga, secagem e fumagem, irão possuir valores de a_w mais baixos (Vandendriessche, 2008).

5.1. Processo de fabrico de produtos cárneos de humidade intermédia

O processamento tecnológico de transformação da carne neste tipo de produtos foi desenvolvido maioritariamente na Europa e Ásia (Leistner, 1992). Independentemente do tipo de enchido, os fluxogramas dos respetivos processos de fabrico, se bem que com diferenças típicas ligadas à tradição regional e até local, convergem para a prossecução de objetivos comuns: a implementação de barreiras tendentes a assegurar a redução do a_w , em simultâneo ou não com a diminuição do pH, por forma a garantir valores destes parâmetros compatíveis com a segurança microbiológica dos produtos finais. O fluxograma de fabrico representado na Figura 1 exemplifica uma sequência de operações unitárias para atingir este desiderato.



Figura 1. Processo de fabrico de salames

5.1.1. Matérias-Primas e obtenção da Miga

Na receção das matérias-primas deverá ter-se em linha de conta o controlo da temperatura e pH, procedendo à respetiva seleção tendo em consideração a relação quantitativa entre a carne e a gordura da formulação, de acordo com a valorização da aparência almejada aquando da comercialização do produto pré-embalado fatiado. Os aspetos específicos da qualidade desejável da gordura utilizada, nomeadamente da sua composição em ácidos gordos, deverá ser, sempre que possível, salvaguardada para assegurar que não fundirá facilmente no decorrer da preparação da miga, do enchimento da massa ou durante a secagem/fumagem finais. Após a seleção, procede-se à redução da carne e gordura em fragmentos de dimensões semelhantes consoante o tipo de enchido que está a ser produzido (Incze, 1998).

5.1.2. Preparação e condimentação da massa

Durante a preparação da miga da carne e da gordura, procede-se à adição de ingredientes essenciais ou opcionais, como os aditivos e os condimentos, socorrendo-se da energia mecânica das misturadoras para ajudar na sua incorporação na matriz e facilitar a solubilização e extração de proteína miofibrilar necessária para promover a ligação e garantir a coesão da massa do produto final. A gestão da temperatura das matérias-primas assume também particular relevância nesta fase, devendo ser sempre mantida dentro dos limites exigíveis da boa segurança microbiológica (Janeiro, 1948; Kramlich, 1976).

5.1.3. Enchimento e Atadura

Colocação da massa na tripa natural ou semi-sintética permeável com ótimas condições higiénicas e físicas, assegurando ausência de refluxo da massa durante esta operação e a obtenção da sua compactação no interior, indispensável a um ótimo potencial de ligação nas etapas seguintes. Após o enchimento da tripa, esta será atada ou clipsada (Janeiro, 1948).

5.1.4. Tratamento Térmico

Assegurar a desidratação e a intensificação dos processos bioquímicos da proteólise e da lipólise, indispensáveis à estabilidade microbiológica e ao desenvolvimento das características físicas e sensoriais desejáveis (textura, sabor e aroma) à boa aceitabilidade deste tipo de produtos.

a) Secagem

De preferência conduzida em câmara climatizada com temperatura, humidade relativa e taxa de ventilação controladas, programadas para permitir a desidratação progressiva e em perfeito equilíbrio com o fluxo de humidade estabelecido entre o centro e a superfície do produto, minimizando a formação exterior de crosta demasiado seca e impermeável à regular redução do a_w , condição indispensável para a fermentação homogénea e a boa conservação do produto (Prändl et al., 1994).

b) Fumagem

A fumagem a temperaturas máximas de 35°C, podendo ser facultativa, serve para impregnação do produto com os compostos do fumo, muitos com potencial antioxidante e antimicrobiano, responsáveis pela transmissão de sabor, odor e cor característicos, que são do agrado da maioria dos consumidores. Atingidas quebras do peso inicial entre 30-35%, o a_w de segurança microbiológica (0,87) estará garantido e assim assegurado o poder de conservação à temperatura mais elevada da última fase desta etapa (Bard & Townsend, 1976).

5.1.5. Embalagem e maturação

Atingidos os valores finais almejados para o a_w , pH e as características físicas próprias de cada produto, urge parar a continuidade das perdas para não prejudicar o rendimento tecnológico e a qualidade final, recorrendo-se para este efeito à respetiva embalagem a vácuo ou de atmosfera modificada. O período necessário para a continuidade e extensão da proteólise e lipólise, dependerá da temperatura ambiente adotada, não devendo esta exceder 35°C.

6. Oxidação Lipídica

A qualidade sensorial do produto é influenciada pelo desenvolvimento da oxidação lipídica, desde que esta não confira características negativas ao produto final, tais como, sabor e odor a ranço e formação de substâncias tóxicas para o ser humano (Dobarganes & Márquez-Ruiz, 2003). O início desta cadeia de reações está ligado a mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos, como por exemplo a luz, a temperatura, os microrganismos e a presença de metais (Chan, 1987).

Os lípidos podem ser oxidados por 3 mecanismos diferentes envolvendo reações complexas: **1.** Auto-oxidação; **2.** Foto-oxidação; **3.** Oxidação enzimática. Destas 3 vias, a auto-oxidação é o processo mais importante da oxidação lipídica na carne, pois é através dela que os ácidos gordos insaturados irão reagir com o oxigénio molecular e outras “ROS” (Reactive Oxygen Species), levando à formação de radicais livres e iniciando-se assim a oxidação do produto (Cheng, 2016). A oxidação enzimática e a foto-oxidação apenas diferem da auto-oxidação no momento da formação dos hidroperóxidos durante a fase de iniciação do respetivo processo (Chaijan & Panpipat, 2017).

1. Auto-oxidação lipídica

Tal como se encontra ilustrado na figura 2, o processo de auto-oxidação divide-se em 3 fases: **1.** “Iniciação”, onde ocorre a formação de radicais livres; **2.** “Propagação”, em que existe a multiplicação dos compostos reativos; **3.** “Terminação”, na qual os compostos reativos se degradam ou reagem entre si de forma a dar origem a compostos não reativos (Cheng, 2016). Na **fase de iniciação** ocorre a extração de um H^+ do grupo metileno, uma vez que os lípidos são sujeitos à ação de um radical pró-oxidante. A remoção deste átomo de hidrogénio e a formação de radicais é facilitada pela quantidade de duplas ligações que se encontram nos ácidos gordos, característica diretamente relacionada com a probabilidade de ocorrer oxidação. Por este motivo, os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e os saturados (SFA), apresentam uma maior resistência aos radicais do que os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (Moerck & Ball, 1974).

De seguida tem origem a **fase de propagação**, onde ocorre uma reação do radical livre com a molécula de oxigénio, levando à formação de um radical peróxido. Este, irá reagir com

outro lípido, acabando por lhe retirar um hidrogénio do seu grupo metileno e formar outro radical livre e um hidroperóxido, havendo assim uma propagação da peroxidação lipídica. Por último a **fase de terminação**, caracteriza-se pela redução do teor de ácidos gordos insaturados e pela ligação entre os radicais, levando à formação de produtos não reativos (Carocho & Ferreira, 2013).

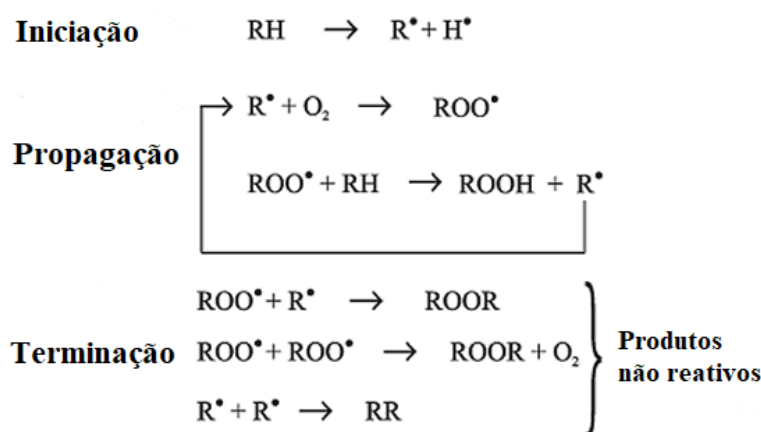


Figura 2. Processo de auto-oxidação lipídica. **RH**, Ácido gordo insaturado; **R[•]**, Radical livre; **ROO[•]**, Radical peróxido; **ROOH**, Hidroperóxido

2. Foto-oxidação lipídica

Normalmente nas cadeias de supermercados, a carne e os produtos cárneos encontram-se expostos à luz artificial com o objetivo de facilitar a consulta do consumidor. No entanto, esta situação irá favorecer o desenvolvimento do processo da foto-oxidação, acabando por acrescentar celeridade ao processo da auto-oxidação (Lorenzo et al., 2017). Assim, a foto-oxidação é uma forma alternativa para a formação de hidroperóxidos, adicionando stress oxidativo ao produto, iniciado pelo processo de auto-oxidação (Wąsowicz et al., 2004).

3. Oxidação lipídica enzimática

Para além dos dois mecanismos não enzimáticos anteriormente expostos, existe um mecanismo enzimático responsável pelo início do processo de oxidação lipídica. A principal enzima que se encontra envolvida na oxidação enzimática é a lipoxigenase, sendo a sua concentração proporcional à probabilidade de ocorrer o processo de oxidação (Schilstra, Veldink & Vliegthart, 1993).

6.1. Fatores que afetam a oxidação lipídica

As reações associadas à oxidação lipídica podem ser exponenciadas ou inibidas por diferentes fatores internos, como é o caso da composição do produto, e por fatores externos como as respetivas condições de processamento e armazenamento (Wąsowicz, 2004; Lorenzo, 2017). A ingestão destes produtos marcadamente oxidados poderá levar à ocorrência de certas patologias no ser humano, tais como, aterosclerose, cancro, processos inflamatórios e envelhecimento (Broncano et al., 2009; Pereira & Abreu, 2018).

Dentre os fatores internos, a composição de ácidos gordos é um dos mais importantes, já que estes são considerados como os principais compostos para o desenvolvimento da oxidação lipídica. Para além destes compostos, as proteínas, os metais, as vitaminas, as enzimas antioxidantes e os péptidos, também são determinantes para o desenvolvimento/inibição das reações oxidativas. Fatores como o tipo e localização anatómica do músculo, a espécie, raça e o tipo de dieta do animal, poderão modificar a composição da carne e por sua vez afetar a dinâmica do processo de oxidação (Králová, 2015). Em relação aos fatores externos, é importante ter em conta que parâmetros como a temperatura, presença de luz e oxigénio aumentam o processo oxidativo (Wąsowicz et al., 2004). Para além disso, processos como a desmancha, desossa, miga e cozedura, propiciam o desenvolvimento da oxidação lipídica, pois irão contribuir para a destruição dos sistemas membranares das células e das suas organelas, expondo os fosfolípidos fortemente insaturados aí presentes (Cheng, 2016).

6.1.1. Composição da Carne

6.1.1.1. Gordura e Ácidos Gordos

O teor de gordura e o respetivo perfil de ácidos gordos são os principais fatores que influenciam a oxidação lipídica nos produtos cárneos, sendo os lípidos classificados principalmente em triglicerídeos e fosfolípidos. A quantidade de gordura intramuscular encontra-se diretamente relacionada com o teor de triglicerídeos, já que estes são considerados como elementos de reserva (95 % dos lípidos da carne), enquanto os fosfolípidos estruturais representam cerca de 500 mg/100 g de carne (Pereira & Abreu, 2018). Assim, um aumento da gordura intramuscular resulta num aumento dos triglicerídeos, enquanto o teor de fosfolípidos se mantém praticamente inalterado, pois a estrutura de membranas não varia substancialmente.

No entanto, como os fosfolípidos apresentam uma maior quantidade de ácidos gordos polinsaturados, irá haver uma maior contribuição para o desenvolvimento da oxidação lipídica e da rancificação do produto cárneo (Cheng, 2016).

6.1.1.2. Hemoproteínas e Metais

A presença de metais na carne promove o processo oxidativo com mais eficiência do que parâmetros como a temperatura e a luminosidade. Isto acontece porque metais como o cobre e o ferro, são potentes catalisadores de diferentes etapas do processo de oxidação lipídica (Richards, 2005). As hemoproteínas que se encontram em maior quantidade na carne (mioglobina e a hemoglobina), são a possível origem de ferro livre, resultante da destruição do grupo heme. Para além do desenvolvimento da rancificação, a oxidação das hemoproteínas resulta na alteração da cor do produto durante o armazenamento, sendo um aspeto crucial na escolha do consumidor (Chaijan & Panpipat, 2017).

6.1.1.3. Enzimas pró-oxidantes

Existem diversos sistemas enzimáticos na carne capazes de iniciar a oxidação lipídica. A principal enzima no processo de oxidação lipídica é a lipoxigenase, encontrando-se presente nos tecidos dos animais e acaba por ser essencial para a biossíntese de alguns ácidos gordos de cadeia longa (Amaral, da Silva & da Lannes, 2018). A mieloperoxidase é outra enzima pró-oxidante que continua ativa na carne mesmo após o abate do animal, encontrando-se nas células do sangue e ainda presente no músculo (Erickson, 2002). Para além das enzimas pró-oxidantes, existem outras que possuem atividade antioxidante, tais como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (Richards, 2005).

6.1.1.4. Antioxidantes endógenos

A presença de compostos antioxidantes endógenos, sejam vitaminas, péptidos ou enzimas/co-enzimas, permite à carne obter uma proteção contra a ação dos radicais livres que promovem o processo de oxidação lipídica (Domínguez et al., 2019).

a) Vitaminas

Uma das vitaminas antioxidantes com maior capacidade protetora dos tecidos do animal é a Vitamina E (α -tocoferol), localizando-se nos fosfolípidos, o que significa que a sua concentração será determinada pelo tipo de músculo em questão. Os músculos facilmente oxidados, como apresentam sistemas membranares mais desenvolvidos, irão possuir uma concentração mais elevada desta vitamina. Outra vitamina lipossolúvel importante na estabilidade oxidativa da carne é a Vitamina A (Retinol), que à semelhança da Vitamina E, irá proteger os ácidos gordos polinsaturados do processo de oxidação, através da eliminação dos radicais peróxidos (Erickson, 2002). Por fim, existe a Vitamina C (Ácido Ascórbico) que também atua como um antioxidante endógeno (Bekhit, Hopkins, Fahri & Ponnampalam, 2013).

b) Péptidos

Alguns péptidos da carne, livres ou inclusos na estrutura das proteínas, apresentam funções reconhecidamente antioxidantes, acabando por assegurar e aumentar a estabilidade oxidativa do produto (Bekhit et al., 2013). Dentro deste grupo de compostos, a carnosina e a anserina representam os dipéptidos antioxidantes endógenos mais abundantes da carne. Embora o mecanismo de ação dos péptidos como agentes antioxidantes ainda não se encontre totalmente esclarecido, sabe-se que são responsáveis pela eliminação dos radicais, pela redução dos hidroperóxidos e que a sua função antioxidante irá depender dos resíduos de aminoácidos que os integram (Lorenzo et al., 2017).

6.1.2. Condições de armazenamento

6.1.2.1. Tempo e temperatura

A oxidação lipídica é potenciada pelo aumento da temperatura e do tempo de exposição, favorecendo a decomposição dos hidroperóxidos e o desenvolvimento da fase de propagação (Choe & Min, 2006). É necessário controlar o tempo de armazenamento pois o seu prolongamento excessivo, aumenta a probabilidade dos radicais provocarem danos na estrutura dos lípidos e de promover a libertação de ferro das hemoproteínas, catalisando diversas reações nas fases de iniciação e de propagação do processo de oxidação lipídica (Richards, 2005).

As variações da temperatura nas câmaras de manutenção de congelados provocam queimaduras pelo frio, levando a sublimação dos cristais de gelo a um contacto mais estreito com o oxigénio da atmosfera envolvente. Estas variações da temperatura também provocam fenómenos de recristalização que aumentam a dimensão dos cristais e a lesão da estrutura das células (Erickson, 2002). Para combater esta situação, é necessário que a congelação do produto seja rápida, realizando-se a baixas temperaturas com o objetivo de causar menos lesões nas células e de formar cristais de gelo de menor tamanho (Richards, 2005).

6.1.2.2. Embalagem

Na carne e em produtos cárneos processados, as técnicas de embalagem mais utilizadas são a embalagem a vácuo e a embalagem com atmosfera modificada de composição diferenciada (Lorenzo et al., 2017). É necessário ter em conta que a molécula de oxigénio representa o principal elemento iniciador e de propagação da oxidação. Assim, a sua ausência na atmosfera envolvente irá permitir um melhor controlo da oxidação na carne (Amaral et al., 2018).

Uma das formas mais simples e económicas para reduzir a concentração de oxigénio na embalagem é através do uso de uma embalagem a vácuo e em alternativa a embalagem com atmosfera rica em azoto (N_2) e dióxido de carbono (CO_2). No entanto, na comercialização “self-service” é impossível retirar o oxigénio da embalagem sem prejudicar a aparência comercial do produto, que perderá a sua coloração vermelha rutilante apetecível a cargo da oximioglobina (Lorenzo et al., 2017).

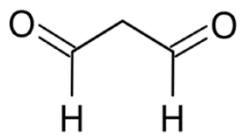
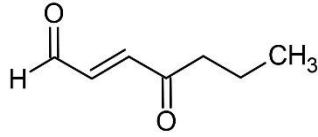
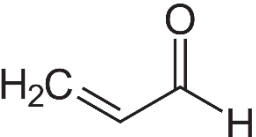
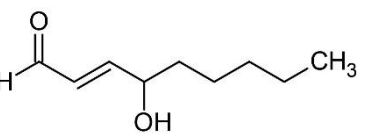
A luz é outro parâmetro importante a ter em conta porque é responsável pelo aumento da probabilidade de ocorrer foto-oxidação lipídica no produto. Assim, foram desenvolvidas embalagens capazes de absorver as radiações ultravioletas, prevenindo o desenvolvimento deste processo e assegurando a estabilidade do produto (Erickson, 2002).

6.2. Principais compostos formados na oxidação lipídica

Tal como referido anteriormente, a oxidação lipídica resulta da reação dos ácidos gordos insaturados com as moléculas de oxigénio por intermédio da intervenção de radicais livres. Através desta reação são produzidos primeiramente os hidroperóxidos lipídicos, considerados inodoros, incolores e sem contribuição apreciável para o aroma do produto. No entanto, estes compostos são altamente instáveis, o que leva à ocorrência de uma rápida decomposição do produto e consecutivamente à formação de compostos secundários, tais como, aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas, ácidos e álcoois, com diferenças de volatilidade, polaridade e peso molecular, que são responsáveis pela alteração da textura, cor, flavor e odor da carne (St. Angelo, Vercellotti, Jacks & Legendre, 1996).

De todos estes compostos resultantes do processo de oxidação lipídica, os aldeídos (pentanal, hexanal, heptanal, octanal, 4-Oxo-2-nonenal, 4-Hidroxinonenal, acroleína e principalmente o malonaldeído) são os que apresentam um maior efeito na alteração sensorial na carne (Tabela 2) (Cheng, 2016; Chaijan & Panpipat, 2017). Posto isto, um dos melhores marcadores para se determinar o nível de oxidação lipídica de um produto, é através da avaliação do valor de aldeído malónico, pois este é considerado o principal produto secundário da oxidação dos ácidos gordos polinsaturados (Kinter, 1995).

Tabela 2. Estrutura química dos aldeídos. (Adaptado de Wadhwa, Mathew, Jatawa & Tiwari, 2012)

Aldeídos	
 Malonaldeído	 4-Oxo-2-nonenal
 Acroleína	 4-Hidroxinonenal

O malonaldeído ou aldeído malónico ($C_3H_4O_2$) é uma pequena molécula polar, tóxica, solúvel em água e de difícil extração, que resulta da peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados com dois ou mais grupos metileno interrompidos por ligações duplas. Este composto é considerado um iniciador carcinogénico e mutagénico, que se pode acumular em alimentos e por via do seu consumo, nos tecidos, na urina e no plasma, podendo provocar distúrbios nos processos fisiológicos dos seres humanos e dos animais, nomeadamente induzir stress oxidativo intracelular, provocar lesões nas membranas dos eritrócitos e reagir com o DNA das células humanas (Okolie, Akioyamen, Okpoba & Okonkwo, 2009).

Para além destes distúrbios, a ingestão de alimentos com concentrações de aldeído malónico elevadas também pode provocar e desenvolver no ser humano patologias como, cancro pulmonar, gástrico e/ou mamário, diabetes, alzheimer's, parkinson's, pré-eclampsia, falha cardíaca congestiva e cirrose (Del Rio, Stewart & Pellegrini, 2005).

Diversos estudos recentes afirmaram que após a formação do aldeído malónico, este possui uma elevada capacidade de reagir com diversas biomoléculas, como é o caso das proteínas e do DNA, levando posteriormente à formação de aductos e danos biomoleculares nas células humanas. Estes aductos são estruturas anormais que têm a capacidade de interferir nos processos normais de replicação e transcrição do DNA, levando posteriormente ao aparecimento de mutações ou interrupções da cadeia genética (Łuczaj & Skrzydlewska, 2003; Zarkovic, Cipak, Jaganjac, Borovic & Zarkovic, 2013).

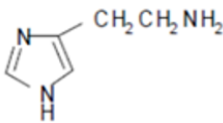
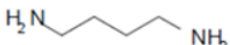
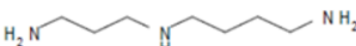
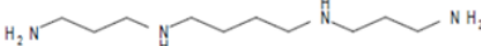
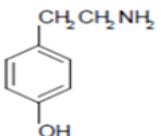
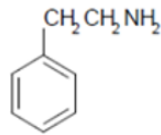
Leuratti observou que a predisposição para a formação de aductos apresenta uma correlação direta com a idade do indivíduo e uma relação inversa com o índice de massa corporal. Para além disso, detetou que o consumo de determinados alimentos como os vegetais e pão integral se encontra inversamente proporcional à concentração de aductos, enquanto por outro lado, o consumo de álcool, tabaco e carne se encontra diretamente proporcional (Leuratti et al., 2002).

Na legislação não existem limites máximos para a concentração de aldeído malónico nas amostras de carne e produtos cárneos. No entanto, segundo alguns estudos, valores de aldeído malónico entre os 2-2,5 mg/kg correspondem ao limite máximo para a carne e os produtos cárneos apresentarem isenção de sinais de rancificação (Campo et al., 2006).

7. Formação de Aminas Biogénicas

As aminas biogénicas são moléculas de baixo peso molecular que integram um ou mais grupos de aminas e que resultam da ação dos microrganismos capazes de realizar a descarboxilação enzimática dos aminoácidos livres e da aminação ou transaminação dos aldeídos e cetonas (Santos, 1996). As aminas biogénicas podem surgir nos alimentos ou nas matérias-primas ricas em proteínas, porém acabam por ser todas formadas pelo processo de descarboxilação de aminoácidos e catalisadas por enzimas de origem microbiana (Lorenzo, Franco & Carballo, 2016). Podem ser classificadas de acordo com as suas características estruturais em: **1. Heterocíclicas** (Histamina; Triptamina); **2. Alifáticas** (Putrescina; Espermina; Espermidina; Cadaverina); **3. Aromáticas** (Tiramina; Feniletilamina) (Tabela 3) (Santos, 1996).

Tabela 3. Estrutura química das aminas biogénicas. (Adaptado de Santos, 1996)

Aminas Heterocíclicas	Aminas Alifáticas	Aminas Aromáticas
 Histamina	 Cadaverina  Putrescina  Espermidina  Espermina	 Tiramina  2-Feniletilamina

Através da descarboxilação enzimática dos aminoácidos livres irá ocorrer a remoção do grupo carboxilo da estrutura dos aminoácidos, permitindo a libertação de dióxido de carbono e a formação da respetiva amina (Figura 3) (Tabanelli, Montanari & Gardini, 2019). Este processo pode ocorrer por via endógena, se as enzimas estiverem presentes nos alimentos, ou por via exógena onde as enzimas são produzidas no decorrer do metabolismo do microbiota associado aos alimentos e onde acaba por ocorrer uma maior produção de aminas (Santos, 1996; Flick & Granata, 2004).

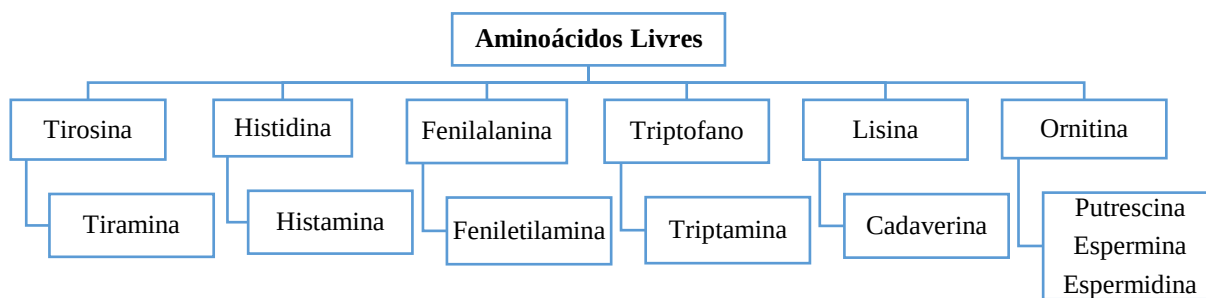


Figura 3. Descarboxilação dos aminoácidos livres e formação das respetivas aminas biogénicas

O perfil das aminas biogénicas presentes nos alimentos, será diferente consoante a natureza dos produtos considerados. Os níveis de histamina, putrescina e cadaverina normalmente aumentam com a degradação da carne e do peixe, enquanto a espermidina e a espermina diminuem as suas concentrações (Lorenzo et al., 2016). Nos produtos não fermentados, como é o caso da carne e do leite fresco de boa qualidade, os valores de aminas biogénicas são baixos ou inexistentes. Se este parâmetro se encontrar elevado, é normalmente indicativo de uma fraca qualidade da matéria-prima ou da prevalência de más práticas de manipulação e de armazenamento dos produtos (Santos, 1996). As aminas biogénicas são termoestáveis, o que significa que dificilmente são eliminadas por processos como a pasteurização. Logo as matérias-primas utilizadas deverão ser de ótima qualidade microbiológica, para que não se registem níveis tóxicos de aminas biogénicas no produto final (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019).

Por outro lado, nos alimentos fermentados os microrganismos são responsáveis pelas alterações bioquímicas que irão estar na origem das características organoléticas e nutricionais destes produtos. Os produtos cárneos, apresentam matrizes favoráveis à formação de aminas biogénicas, devido à presença de microrganismos, ao elevado teor de aminoácidos livres e ao pH ácido proveniente do metabolismo de carboidratos por parte das bactérias lácticas (Lorenzo et al., 2016). As aminas biogénicas, os péptidos de cadeia curta, os aminoácidos e outros compostos azotados de baixo peso molecular, contribuem para o odor e sabor característico dos alimentos fermentados (Maga & Katz, 1978) Porém, a presença de quantidades elevadas de aminas biogénicas, nomeadamente putrescina e cadaverina, poderá dar origem a um odor pútrido e flavour indesejado para o consumidor (Lorenzo et al., 2016). O consumo de produtos excessivamente contaminados, nomeadamente por histamina, putrescina e tiramina, poderá ter consequências para o consumidor, tais como, intoxicação, vómitos, diarreia, suores, problemas respiratórios, taquicardia e hipotensão ou hipertensão (Kordiovská et al., 2006).

A histamina, segundo a “Food and Drug Administration” (FDA) e a “European Food Safety Authority” (EFSA), é considerada a amina biogénica clinicamente mais problemática para o ser humano, estando mais associada ao consumo de peixe processado da família *Scombridae* e de queijo largamente maturado. Como possui efeitos vasodilatadores, pode causar hipotensão, enxaquecas, rubor, cólicas, diarreia e vómitos (Taylor, 2014). Por outro lado, a triptamina, feniletilamina e principalmente a tiramina possuem efeitos vasoconstritores capazes de provocar hipertensão, vasoconstrição periférica, taquicardia, taquipneia, hiperglicemia e libertação de norepinefrina por parte do sistema nervoso simpático (McCabe-Sellers, Staggs & Bogle, 2006).

Poderá ocorrer formação de nitrosaminas devido à interação das aminas biogénicas, principalmente a putrescina e a cadaverina, com os nitritos e nitratos residuais presentes nos produtos cárneos. Porém em condições fisiológicas normais o corpo humano apresenta sistemas de desintoxicação para as aminas biogénicas, localizadas principalmente a nível do intestino através da ação da monoamina oxidase, da diamina oxidase e da poliamina oxidase (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004; EFSA, 2011). No entanto, estes sistemas de desintoxicação tornam-se infuncionais devido ao consumo de inibidores da amina oxidase, ingestão de álcool, falha de imunidade do consumidor, patologias gastrointestinais, elevada concentração de aminas biogénicas em alimentos fermentados ou em produtos fora da validade (Alvarez & Moreno-Arribas, 2014).

A quantificação das aminas biogénicas dos alimentos permite avaliar a sua provável toxicidade e, consequentemente, o risco associado ao seu consumo (Shalaby, 1996). Por vezes certos alimentos fermentados com níveis alegadamente problemáticos de histamina e tiramina podem surgir com um aspeto organolético normal. Por este motivo justifica-se o controlo profilático destes compostos nos alimentos que apresentam uma maior suscetibilidade de os desenvolver (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019).

As diferenças na quantidade e natureza das aminas biogénicas dos produtos cárneos fermentados, deve-se em grande parte às condições ambientais que influenciam o desenvolvimento microbiano e a descarboxilação. Isto ocorre por influência de fatores intrínsecos e extrínsecos durante a fermentação e maturação dos produtos cárneos, tais como, o pH, a concentração de NaCl e de aminoácidos livres, a temperatura de armazenamento, as condições de higiene e manejo do processamento e a presença de microrganismos, como a

Enterobacteriaceae, *Micrococcaceae* e bactérias lácticas (Komprda et al., 2004; Ruiz-Capillas & Jimenéz-Colmenero, 2004; Benkerroum, 2016; Gardini et al., 2016).

Quanto mais rápida for a maturação do alimento, maior será a quantidade expectável de aminas biogénicas formadas, justificada pelas mais elevadas temperaturas praticadas durante o processo de secagem/cura do alimento. A temperatura de armazenamento dos produtos finais é um dos principais parâmetros a ser controlado, pois as temperaturas superiores a 5 °C na carne ou no pescado, levam ao aumento e desenvolvimento de microrganismos nos produtos e por sua vez ao aumento da proteólise no tecido muscular e um aumento da atividade das enzimas de descarboxilação (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019).

Segundo o regulamento da Comissão Europeia (1441/2007), a histamina no pescado é a única amina biogénica com limite máximo estabelecido, cujos valores de aceitabilidade se situam entre 100-200 mg/kg. Para produtos derivados do pescado sujeitos a maturação enzimática em salmouras, o intervalo de valores, já se encontra mais elevado, entre 200-400 mg/kg (Regulamento nº 1441/2007). Atualmente na União Europeia não existe legislação para as restantes aminas biogénicas ou para outros produtos alimentares, apesar do risco do consumo de alimentos com níveis elevados de aminas biogénicas para a saúde humana (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019).

Uma das formas de limitar a atividade de descarboxilação seria aumentar a concentração de sal no produto alimentar. No entanto, o teor de sal necessário para controlar este desidrato é demasiado elevado (5%) para se aplicar na formulação dos alimentos produzidos industrialmente, atendendo à exigência dos atuais consumidores por níveis de NaCl cada vez mais reduzidos (Tabanelli et al., 2019). Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de compreender a relação entre o pH e a concentração de aminas biogénicas, já que a descarboxilação consiste numa atividade celular que contraria o stress ácido. Concluiu-se que a Tirosina descarboxilase evidenciou um pH ótimo entre 5 e 6, a Tiramina entre 4 e 5, e a Histidina descarboxilase entre 6 e 7 (Moreno-Arribas & Lonvaud-Funel, 2001; Kanki et al., 2007; Bargossi et al., 2015).

Os compostos antimicrobianos naturais, como certos óleos que contêm eugenol, timol e carvacrol, e determinadas especiarias e ingredientes como a pimenta, açúcar, canela e alho, podem ser úteis para a redução da concentração de aminas biogénicas nos alimentos, porque são detentores de ações antibacterianas seletivas contra diversas espécies problemáticas (Komprda et al., 2004; Naila et al., 2010; Cai et al., 2015; Özogul et al., 2015).

8. Metodologias analíticas usadas na avaliação da taxa de oxidação lipídica

Tal como já foi referido os hidroperóxidos formados na fase inicial da oxidação lipídica rapidamente se decompõem e dão origem a compostos secundários (Estévez, Morcuente & Ventanas, 2008). Posto isto, para se assegurar uma boa segurança e qualidade alimentar, os métodos de avaliação da oxidação lipídica na carne e produtos cárneos deverão avaliar/determinar os produtos primários e secundários que se encontram presentes neste processo (Ross & Smith, 2006).

É necessário ter em conta que a carne representa uma matriz estruturalmente muito complexa constituída por uma grande multiplicidade de componentes, que leva ao frequente aparecimento de artefactos, prejudicando/dificultando a obtenção clara de resultados. Por este motivo, todo o processo de extração analítica deverá ser conduzido de forma tecnicamente irrepreensível com o objetivo de garantir resultados claramente específicos, precisos, rápidos e reprodutíveis (Domínguez et al., 2019).

A obtenção do perfil de ácidos gordos apesar de representar um indicador complementar da evolução expectável da oxidação lipídica, não é uma técnica de eleição neste domínio específico. Uma das razões para esta técnica não ser selecionada é pelo facto de a oxidação lipídica começar na fração fosfolipídica e a separação dos fosfolípidos dos outros lípidos ser algo necessário para obter bons resultados. (Lorenzo et al., 2017).

Devido à instabilidade dos compostos primários, como é o caso dos hidroperóxidos, um teor reduzido destes compostos no produto tanto pode ser observado numa fase inicial da oxidação como numa fase avançada. Assim, a avaliação dos compostos secundários será mais representativa, pois estes são mais estáveis e acabam por ser os responsáveis pela indução do flavor e odor a ranço como resultado do processo de oxidação, no produto final (Estévez et al., 2008).

Desde 1960 que vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar o nível de stress oxidativo in vivo e in vitro (Del Rio, Stewart & Pellegrini, 2005). Com o desenvolvimento e inovação dos equipamentos analíticos disponíveis, têm vindo a ser implementados vários métodos para a deteção de produtos primários e secundários resultantes da oxidação.

Os métodos que se usam mais frequentemente são: **1.** Índice de peróxido; **2.** Teste do ácido tiobarbitúrico (TBA); **3.** Quantificação do aldeído malónico por cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC) (Bigolin, Weber & Alfaro, 2014). O teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) é a técnica mais utilizada para quantificar o nível de oxidação instalado nos alimentos, consistindo na avaliação colorimétrica do complexo formado como resultado da reação do TBA com as diferentes moléculas, dentre as quais se destaca o aldeído malónico (Estévez et al., 2008).

Mais recentemente foi desenvolvida a técnica de cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC) com o objetivo de quantificar o aldeído malónico na carne e nos produtos cárneos (Reitznerová et al., 2017). No entanto, é importante referir que apesar da técnica de HPLC oferecer uma melhor especificidade e sensibilidade, o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) acaba por ser mais utilizado na rotina diária de análises devido à sua simplicidade e baixo custo (Pereira & Abreu, 2018).

Relativamente à determinação do teor de aminas biogénicas, pode-se recorrer ao uso de métodos analíticos precisos como é o caso da cromatografia gasosa, da eletroforese capilar, da cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC) e da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019). Dentro destes métodos, a técnica por HPLC é a mais frequentemente utilizada na comunidade europeia para a identificação e quantificação das aminas biogénicas, permitindo identificá-las e quantificá-las individualmente (EFSA, 2011).

Recentemente foram desenvolvidas novas técnicas de análise, tais como: **1.** Quimiluminescência; **2.** Fluorescência; **3.** Espectroscopia Raman; **4.** Espectroscopia de infravermelhos; **5.** Ressonância Magnética (Domínguez et al., 2019). No entanto, estas técnicas são normalmente utilizadas para monitorizar a oxidação em tempo real com recurso a condições específicas, acabando por não serem métodos fáceis de se adaptar à rotina laboratorial (Barriuso, Astiasarán & Ansorena, 2013).

9. Material e Métodos

9.1. Delineamento Experimental

As amostras de salame (19 unidades) utilizadas no presente estudo foram obtidas de produto modelo “puro porco” produzido em oficina piloto do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária de Oeiras (INIAV) no âmbito das aulas práticas de Tecnologia Alimentar I da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Utilizou-se uma formulação base 80:20 (80% de carne limpa e 20% de gordura macroscopicamente visível) com miga de aproximadamente 3-5 mm, enquadrando produtos com 3 níveis diferentes de a_w e pH finais, submetidos a processos de maturação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 6 e 9 meses.

9.2. Tecnologia de produção de Salame modelo “puro porco”

A produção dos 19 salames modelo “puro porco” nas aulas práticas iniciou-se na cutter (Alexanderwerk, Germany) equipada com duas navalhas e conduzida à velocidade lenta, até ser atingida a dimensão da miga pretendida, de carne limpa e gordura, adicionando ao longo deste processo os seguintes aditivos e condimentos: sal (NaCl) 2,5 %, nitrito de sódio 200 mg/kg, eritorbato de sódio 0,5 g/kg, glicose 7 g/kg, ácido cítrico 0,1 % e pimenta preta em grão (14,5 g nos cerca de 9,5 kg das formulações praticadas).

As matérias-primas (“trimmings”/aparas) foram previamente acondicionadas a -5°C, condição física essencial ao seu corte em figuras poliédricas, com faces e arestas bem definidas, facilitadoras do desenvolvimento homogéneo da flora microbiana nos interstícios capilares obtidos após o enchimento. Seguiu-se a transferência imediata da massa para a enchedora e realizou-se o enchimento em tripa colagénica previamente demolhada em água fria, para minimizar fenómenos de re-congelação prejudiciais à sua regular fermentação.

Depois de submetidos a escorrimento durante cerca de 2 horas para eliminação do excesso de água na tripa, os enchidos foram transferidos para uma câmara frigorífica a 0-2°C com o intuito de criar ambiente de privilégio ao desenvolvimento da flora láctica autóctone integrada no microbiota acumulado nas matérias-primas.

Após o registo de quebra de aproximadamente 10% do peso inicial, calculado por pesagens sucessivas dos produtos obtidos após escorrimento, os enchidos sofreram um processo de fumagem com madeira de azinho, englobando duas sessões intensas de aproximadamente 6 horas de duração cada, cuja temperatura ambiente nunca ultrapassou os 30-35 °C, com o objetivo de impregnar os compostos do fumo na superfície dos produtos (cor e sabor) e controlar o desenvolvimento de fungos à superfície.

O processo de secagem prosseguiu em câmaras climatizadas, operadas com temperatura progressivamente aumentada (12-15°C; 20-25°C; 25-30°C) e humidade relativa progressivamente mais reduzida (85-75%; 75-70%), até se registarem perdas de peso totais entre 25-35%, indicadoras de diferentes valores de a_w no produto final, mas com níveis de segurança confortavelmente assegurados. O produto final foi posteriormente embalado sob vácuo (película BB4L) e armazenado à temperatura ambiente (17-20°C) pelo tempo previsto no desenho experimental. No caso do protocolo analítico não poder ser de imediato executado, as amostras permaneceram em câmara de congelação a -20°C.

9.3. Metodologias de análise

Os parâmetros físico-químicos e bioquímicos considerados no presente protocolo experimental, enquanto facilitadores da compreensão do enquadramento tecnológico e indicadores da estabilidade oxidativa e da predisposição das matrizes para a formação de aminas biogénicas e aldeído malónico, em função do pH, a_w finais e do tempo de maturação, foram analisados de acordo com o seguinte conjunto de práticas laboratoriais:

9.3.1. Preparação da amostra

Na primeira etapa, as amostras foram trituradas, numa picadora tipo 123 (Moulinex, Spain), com o intuito de homogeneizar a matriz e de aumentar a área de contacto do produto cárneo com o solvente de extração, tendo permanecido acondicionadas sob refrigeração ou congelação até à análise.

9.3.2. Determinação do pH

A medição do pH foi realizada utilizando o protocolo descrito na NP 3441:2008 com o auxílio de um potenciómetro 654 pH-Meter (Metrohm Herisau, Switzerland), provido de um eléctrodo de vidro (Mettler Toledo, Switzerland), calibrado antes de cada sessão de trabalho, com soluções padrão de pH 4 e 7. Com o recurso a balança de precisão digital ($\pm 0,01g$) (Sartorius, Germany), pesaram-se 5 gramas de amostra para um gobelé, no qual se adicionou 10 gramas de água destilada. Após mistura com uma vareta de vidro, procedeu-se à leitura do pH de cada amostra.

9.3.3. Determinação da atividade da água (a_w)

A atividade da água das amostras trituradas foi efetuada em aparelho Rotronic HygroLab, equipado com duas sondas AWVC-DIO (Rotronic AG, Switzerland), mantendo-as a cerca de 25°C durante o tempo necessário para a estabilização do valor indicado no visor, a que correspondeu o valor de a_w final.

9.3.4. Determinação da gordura total

O teor de gordura total foi determinado de acordo com o método descrito por Folch et al., 1957. Para este efeito pesaram-se 3 gramas da amostra triturada e adicionaram-se 20 mililitros de uma mistura constituída por diclorometano e metanol (2:1, v:v). De seguida, homogeneizou-se em Polytron modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland) a 10000 rpm durante 2 minutos e a suspensão obtida foi filtrada com papel de filtro nº1238 (Filter-Lab, Barcelona) através da bomba de vácuo (Gast, U.S.A). O filtrado foi colocado numa ampola de decantação, adicionado de 5 mililitros de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,73 % e agitado vigorosamente. Após 24 horas de repouso para que ocorra a separação de fases, procedeu-se à decantação da fase mais densa para um balão de 250 ml, previamente pesado, e evaporou-se o solvente até à secura em evaporador rotativo (Heidolph, Germany) a 50 °C e a 150 rpm. Por fim, os balões são colocados em estufa (Mettmert, Germany) a 103°C durante 1 hora, arrefecidos em exsiccador e pesados numa balança analítica ($\pm 0,0001$) (Mettler Toledo, Switzerland). O teor de gordura total é expresso em percentagem e consiste na diferença do peso inicial e final dos balões.

9.3.5. Determinação do aldeído malónico

Extração

O aldeído malónico foi determinado por HPLC de acordo com o método descrito por Roseiro et al. 2017. Quinze gramas da amostra, pesadas em balança de precisão digital ($\pm 0,01$ g) (Sartorius, Germany) foram homogeneizadas com 20 mililitros de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5 %, com recurso a Polytron modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland) efetuado a 5000 rpm durante 2 minuto. Procedeu-se de seguida à filtração do homogeneizado com papel de filtro nº 1238 (Filter-Lab, Barcelona) e, antes da injeção em HPLC, é de novo filtrada através de Acrodisc 0,45 μ m. Uma alíquota do filtrado (1000 μ l) foi derivatizada pela adição de 100 μ l de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), mantendo-se em repouso durante 30 minutos ao abrigo da luz. Ao fim deste período, 50 μ l desta mistura foram injetados no sistema HPLC.

Análise por HPLC (Cromatografia líquida de alta pressão)

A análise cromatográfica do aldeído malónico foi efetuada num sistema HPLC da marca Waters constituído por um módulo de separação Alliance 2695 (Waters, Milford, MA) e um detetor de UV/VIS Waters 2487 Dual λ Absorbance detector (Waters, Milford, MA), equipado com uma coluna de fase reversa (Spherisorb ODS2, 4.6x 250 mm, 5 mm) da Waters (Milford, MA). A eluição foi efetuada em modo isocrático com um solvente composto por água:acetonitrilo:ácido acético glacial (55:45:0,2) a uma velocidade de fluxo de 1 ml min⁻¹ durante 20 minutos. A deteção foi monitorizada a 310nm. A quantificação do aldeído malónico foi efetuada pelo método do padrão externo, utilizando-se para este efeito uma solução de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) 2,5 mM em ácido tricloroacético a 7,5% como solução stock.

9.3.6. Determinação das aminas biogénicas

Extração

As aminas biogénicas foram determinadas por HPLC de acordo com o método descrito por Roseiro et al. 2006. Oito gramas de amostra foram homogeneizadas, com 25 mL ácido perclórico 0,4 M em Polytron modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland) a 10000 rpm durante 2 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C em centrífuga modelo RC-5C (Sorvall® Instruments, Newtown). O sobrenadante foi filtrado através de filtro nº1238 (Filter-Lab, Barcelona) para balão volumétrico de 100 ml e o sedimento foi de novo extraído com 25 ml de ácido perclórico 0,4 M. Após nova centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram combinados e perfeitou-se o volume para 100 mL com ácido perclórico 0,4 M.

Derivatização dos extratos

Adicionar a 0,5 ml do extrato da amostra 100 µl de hidróxido de sódio 2N e 150 µl de bicarbonato de sódio saturado. A mistura foi depois derivatizada com 1 ml de solução de cloreto de dansilo (cloreto de 5- dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo) em acetona (5mg/1ml de acetona), permanecendo incubada em estufa (Mettler, Germany) a 40 °C durante 45 minutos. É importante realçar que a solução de cloreto de dansilo deve ser preparada no dia de análise e mantida ao abrigo da luz natural. Após o tempo de incubação os extratos foram adicionados de 50 µl de amónia, para remoção do cloreto de dansilo, colocados no escuro durante 30 minutos e de seguida adicionados de 700 µl de acetonitrilo. Por fim, agitou-se ligeiramente no vortex (Heidolph, Germany) e filtrou-se o sobrenadante através de Acrodisc 0,45 µm.

Análise por HPLC (Cromatografia líquida de alta pressão)

As aminas biogénicas foram separadas e quantificadas por HPLC, com recurso a uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS2, 5 mm, 4,0x125 mm (Waters, Milford, MA). Esta coluna foi eluída em gradiente com uma solução de fase móvel composta por dois solventes, acetato de amónio 0,1M e acetonitrilo, com uma velocidade do fluxo de 1 ml/min, a um comprimento de onda de 254 nm durante 35 minutos. A concentração de aminas biogénicas nos produtos cárneos foi expressa em $mg.Kg^{-1}$. A quantificação das 8 aminas biogénicas em análise (triptamina, tiramina, histamina, feniletilamina, cadaverina, putrescina, espermina e espermidina) foi efetuada pelo método do padrão externo.

9.3.7. Determinação do azoto dos aminoácidos livres

A determinação do azoto dos aminoácidos livres foi efetuada de acordo com o procedimento descrito na NP 3443:1990. Vinte e cinco gramas de amostra foram homogeneizadas em Polytron modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland) com 90 ml de água destilada e 25 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 20 %. A mistura foi mantida em repouso a 2°C durante 2 horas. Após este período, filtrou-se a solução para um balão volumétrico de 200 ml e lavou-se o papel de filtro nº1238 (Filter-Lab, Barcelona) com pequenas porções de água destilada até se perfazer o volume do balão volumétrico.

De seguida, introduziu-se 25 ml do filtrado num balão de Erlenmeyer de 250 ml, adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína (1%) e procedeu-se à respetiva neutralização gota a gota com NaOH 1,5 N até obtenção de cor rósea ténue, mas persistente. Por fim, adicionou-se em hotte 10 ml de formol 40 %, já anteriormente neutralizado com fenolftaleína e NaOH 1,5 N, e procedeu-se à titulação com NaOH 0,02 N até cor rósea ténue, mas persistente. O teor de azoto dos aminoácidos livres, expresso em g/100 g de amostra é calculado pela seguinte formula:

$$AAL (\%) = \frac{5,6 \times V}{m \times V_1}$$

V – Volume, em mililitros, de NaOH 0,02 N gasto na titulação

m – Massa, em gramas, da toma para a análise

V_1 – Volume, em mililitros, do filtrado utilizado na determinação

9.3.8. Determinação da acidez

Extração

A determinação da acidez foi efetuada de acordo com o procedimento descrito por Pearson, 1973. Dez gramas de amostra foram homogeneizadas com 50 ml de diclorometano em Polytron modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland) a 10000 rpm durante 2 minutos. O extrato foi filtrado, para balão volumétrico de 100 ml, de forma sequencial através de 2 filtros Nº1238 (Filter-Lab, Barcelona), contendo o segundo sulfato de sódio anidro. Completou-se o volume com diclorometano resultante da lavagem dos filtros.

Teor de Gordura

Pipetou-se 10 ml do extrato para um balão de 250 ml, previamente tarado, e evaporou-se o solvente em evaporador rotativo (Heidolph, Germany) a 61 °C e 151 rpm. O resíduo foi colocado na estufa (Mettler, Germany) durante 1 hora a 100°C para secar. Após esse tempo os balões foram arrefecidos em exsiccador durante 20 minutos. Finalmente os balões foram pesados em balança analítica (Mettler Toledo, Switzerland) e o teor de gordura calculado por diferença de peso.

Acidez Livre

Para a determinação da acidez livre, pipetaram-se 25 ml do extrato para um balão de Erlenmeyer de 100 ml e adicionaram-se 25 ml de etanol a 95 %, já anteriormente neutralizado. Na hotte, procedeu-se à titulação com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador até obtenção de cor rósea persistente durante 15 segundos. O teor de acidez, expresso em g de ácido oleico por 100g gordura é calculado através da seguinte formula:

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{282 \times N \times V_{\text{titulante}}}{g \times V_{\text{toma}}}$$

N – Concentração da solução titulante (NaOH 0,1 N)

$V_{\text{titulante}}$ – Volume de solução titulante adicionada na titulação

g – Peso da gordura existente em 25 ml de extrato

V_{toma} – Volume da toma (25 ml)

9.4. Análise Estatística

A análise estatística de todos os resultados obtidos pelo autor foi efetuada com recurso ao software STATISTICA® Version 12 (StatSoft, Inc. 1984-2014). A influência dos níveis de pH e a_w e do tempo de maturação nos diversos parâmetros físico-químicos analisados foi avaliada através de Análise de Variância (Two-Way ANOVA). Quando os fatores ou as suas interações apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

10. Resultados e Discussão

10.1. Caraterização dos salames

Na tabela 4, encontram-se os resultados obtidos pelo autor relativamente aos parâmetros de a_w , gordura, pH nos dois tempos de maturação e as perdas de peso das dezanove amostras de produtos cárneos maturados analisados neste trabalho. Os parâmetros como a percentagem de gordura e a percentagem de perda de peso apresentaram desvios padrões superiores (4,090 e 4,737, respetivamente) comparativamente aos parâmetros de a_w , pH de 6 meses e pH de 9 meses (0,018; 0,185 e 0,243, respetivamente). Este aumento do valor do desvio padrão deve-se ao facto dos dados da percentagem da gordura e da percentagem de peso se encontrarem mais dispersos e mais distantes dos valores da média de cada parâmetro.

Tabela 4. Caraterização dos salames

Salames	a_w	Gordura (%)	pH 6 meses	pH 9 meses	Perdas de peso (%)
1	0,855	9,83	5,55	5,10	32,4
2	0,858	18,89	5,85	5,28	31,69
3	0,863	21,82	5,6	5,48	43,23
4	0,855	25,07	5,35	5,27	39,82
5	0,873	17,36	5,55	5,56	38,35
6	0,811	18,35	5,59	5,48	36,62
7	0,860	26,65	5,32	5,22	36,79
8	0,857	23,66	5,36	5,29	43,27
9	0,821	29,45	5,78	5,49	43
10	0,838	18,98	5,75	5,62	36,67
11	0,845	22,19	5,85	6,01	39,03
12	0,840	21,93	5,87	5,46	44,74
13	0,862	17,83	5,54	5,54	32,89
14	0,843	21,18	5,88	5,85	39,5
15	0,871	19,52	5,83	5,84	45,61
16	0,817	18,96	5,58	5,22	32,95
17	0,823	21,08	5,48	5,37	39,51
18	0,846	19,37	5,79	5,75	29,44
19	0,845	21,39	5,68	5,54	41,4
Média	0,85	20,71	5,64	5,49	38,26
Mínimo	0,811	9,830	5,320	5,097	29,440
Máximo	0,873	29,450	5,880	6,008	45,610
Desvio Padrão	0,018	4,090	0,185	0,243	4,737

Neste estudo, os salames foram agrupados pelo autor de acordo com o pH médio de 5,38; 5,62; 5,85, tendo sido registadas variações entre 5,32-5,48; 5,54-5,78 e 5,80-5,90, respetivamente. Estes grupos refletem diferentes níveis de eficácia do pH enquanto barreira ao desenvolvimento microbiano, sendo efetivo no primeiro grupo (pH médio = 5,38) e praticamente inexistente no terceiro grupo (pH médio = 5,85), no entanto qualquer um deles configura situações perfeitamente enquadradas nas práticas comuns da sua produção.

Relativamente ao a_w , o universo de amostras foi igualmente dividido em 3 grupos de valor médio 0,82; 0,85 e 0,87, com intervalos entre 0,81-0,83; 0,84-0,85; 0,86-0,87, respetivamente. Qualquer um destes grupos apresenta garantia de proteção desta matriz relativamente ao agente patogénico mais exigente neste domínio da segurança (*Staphylococcus aureus*). Contudo a dispersão dos resultados relativamente a este indicador de segurança crucial, ajusta-se a produtos finais com texturas diferenciadas no que respeita à dureza e coesividade, igualmente exequíveis do ponto de vista de interesse da comercialização deste tipo de produtos.

10.2. Curvas padrão do aldeído malónico e das diferentes aminas biogénicas

Das curvas padrão efetuadas para cada composto (tabela 5), resultaram equações das retas (Anexos) que originaram coeficientes de correlação que atestam as boas práticas executadas nas técnicas utilizadas na avaliação cromatográfica, por cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC), das amostras em estudo.

Tabela 5. Equações das retas e respetivos coeficientes de correlação de cada composto analisado

Compostos	Equação da reta	Coefficiente de correlação (R^2)
Aldeído Malónico	$y = 36485x - 3268,2$	0,9953
Triptamina	$y = 3986,5x - 2113,7$	0,9938
Tiramina	$y = 5063,9x - 2443,8$	0,9660
Histamina	$y = 8087,8x - 3614,2$	0,9954
Feniletilamina	$y = 3907,7x + 406,45$	0,9963
Cadaverina	$y = 1566x + 212,97$	0,9987
Putrescina	$y = 9613,1x - 1976,1$	0,9986
Espermina	$y = 4230,6x - 3657,2$	0,9964
Espermidina	$y = 4791,9x - 1266,1$	0,9922

10.3. Influência do pH e do tempo de maturação

As concentrações obtidas para os diferentes parâmetros químicos analisados em função dos intervalos de pH e tempos de maturação considerados no âmbito do presente trabalho constam na Tabela 6.

Tabela 6. Influência do pH e tempo de maturação nos diferentes parâmetros químicos (Two-Way ANOVA)

	pH _{médio} 5,38		pH _{médio} 5,62		pH _{médio} 5,85		p		
	6 m	9 m	6 m	9 m	6 m	9 m	Grupo pH	Tempo (T)	pH*T
Aldeído malónico (mg.Kg-1)	0,47	1,14	0,32	0,89	0,32	0,79	0,175	< 0,001	0,876
Acidez (%)	13,25	11,55	14,09	11,27	14,10	13,40	0,612	0,142	0,701
Azoto AA livres (mg.Kg-1)	0,54	0,46	0,54	0,49	0,57	0,53	0,652	0,216	0,970
Triptamina (mg.Kg-1)	285,12	108,24	359,60	128,02	170,71	124,37	0,237	0,005	0,260
Feniletilamina (mg.Kg-1)	40,20	6,99	37,16	5,07	25,53	20,69	0,956	0,005	0,235
Putrescina (mg.Kg-1)	8,38	8,17	26,82	20,90	34,14	24,01	0,184	0,525	0,907
Cadaverina (mg.Kg-1)	31,33ab	51,86ab	21,64b	23,76b	66,79a	18,12b	0,032	0,248	0,002
Histamina (mg.Kg-1)	46,22	14,70	70,26	16,94	33,94	34,89	0,714	0,058	0,230
Tiramina (mg.Kg-1)	24,91	27,70	56,97	22,78	92,98	22,77	0,653	0,205	0,579
Espermidina (mg.Kg-1)	9,64	15,12	21,31	10,21	11,66	14,21	0,821	0,844	0,321
Espermina (mg.Kg-1)	21,88	11,54	35,39	12,75	20,58	12,66	0,564	0,069	0,605
AB total (mg.Kg-1)	467,67	244,33	629,16	240,43	456,32	271,71	0,712	0,001	0,521

Para cada parâmetro, médias com letras diferentes são significativamente diferentes (Tukey, $P < 0,05$)

Nas condições experimentais ensaiadas, a variação do pH e a respetiva interação com o tempo de maturação apenas afetaram significativamente ($P < 0,05$) o teor de cadaverina. Relativamente ao tempo de maturação (T), este fator afetou significativamente o teor de aldeído malónico ($P < 0,001$) e a concentração total de aminas biogénicas ($P = 0,001$), sendo neste domínio de destacar também a influência registada para a triptamina ($P = 0,005$), a feniletilamina ($P = 0,005$) e tendencialmente para a histamina ($P = 0,058$).

Apesar de existir apenas impacto estatisticamente significativo do pH em relação ao teor de cadaverina na evolução do processo oxidativo, os resultados configuram uma tendência para a redução ligeira, mas contínua do valor residual de aldeído malónico entre os produtos mais e menos ácidos, independentemente dos tempos de maturação (6 e 9 meses) considerados para este estudo (Gráfico 2).

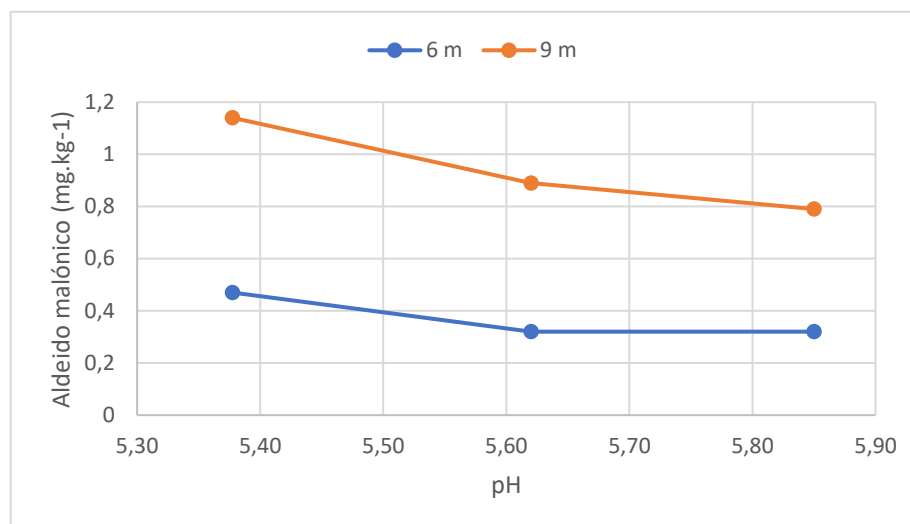


Gráfico 2. Influência do pH no aldeído malónico dos salames

Acresce a estas diferenças no teor de aldeído malónico, o facto deste composto denotar distintos níveis de reatividade molecular em função do pH do meio. Sendo baixa a sua reatividade na gama de valores de pH fisiológicos, este composto transforma-se em beta-hidroxiacroleína a valores de pH mais reduzidos, em virtude do seu carácter eletrofílico. Esta maior reatividade é particularmente associada aos nucleótidos e resíduos de ácidos aminados básicos (oxidação proteica) formando aductos que podem ser considerados também como produtos finais da oxidação lipídica. Assente neste pressuposto, a assunção de diferentes potenciais de oxidação/rancificação da matriz em função do pH, é uma realidade no mínimo expectável (Ayala, Muñoz & Arguelles, 2014).

Os valores médios de aldeído malónico, sistematicamente mais elevados nos produtos maturados durante 9 meses comparativamente aos dos analisados após 6 meses, evidenciam o carácter temporal das reações de propagação do processo da oxidação lipídica, dependentes do tempo de contacto das “ROS” (Reactive Oxygen Species) com os componentes da fração lipídica suscetíveis ao “stress” oxidativo (ácidos gordos livres insaturados).

O aldeído malónico, como produto secundário da peroxidação lipídica pode ser metabolizado, envolvendo a sua oxidação através da ação da aldeído dehidrogenase e posterior descarboxilação, formando-se acetaldeído. Por sua vez, este metabolito poderá ainda sofrer nova oxidação (aldeído dehidrogenase) e dar como produtos finais o CO_2 e H_2O (Ayala, Muñoz & Arguelles, 2014).

De qualquer forma, importa realçar que os valores detetados estão consideravelmente abaixo do limite habitualmente conotado com o desenvolvimento de ranço, compatível com a instalação de flavor sensorialmente inaceitável para a maioria dos consumidores. Para esta concentração detetada de aldeído malónico poderá ter contribuído o acondicionamento dos produtos finais em embalagem a vácuo e ao abrigo da luz durante a maturação posterior por 6 e 9 meses.

Para além do perfil de ácidos gordos da gordura utilizada na formulação, a maior ou menor rapidez do processo oxidativo depende igualmente da tecnologia de fabrico, nomeadamente da quantidade de ar aprisionado na matriz no decorrer do enchimento do produto. O facto das amostras terem sido obtidas de ensaios executados nas aulas práticas de Tecnologia Alimentar I, com utilização de “trimmings” obtidos de uma grande diversidade de animais e, por via deste facto possivelmente submetidos a dietas distintas, e com a participação dos alunos na execução daquela operação unitária, poderá ter contribuído para uma maior heterogeneidade do grau de compactação da massa no interior da tripa e, consequentemente, de uma diferente dinâmica do processo oxidativo.

Os valores inferiores da acidez da gordura nas amostras com 9 meses de maturação (Gráfico 3) poderão dever-se à maior mobilização dos ácidos gordos livres obtidos da lipólise instalada na matriz para o processo oxidativo que concomitantemente se desenrola, concordando fielmente os teores médios obtidos em função do pH com a evolução inversa registada para o aldeído malónico.

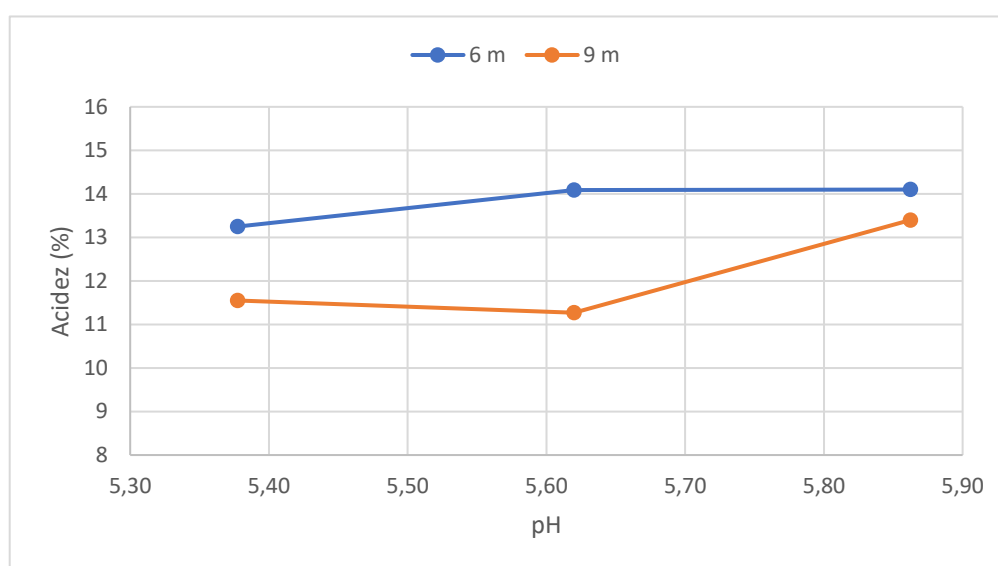


Gráfico 3. Influência do pH na acidez dos salames

Com inferior expressão diferenciadora entre os 2 tempos de maturação testados, a concentração de ácidos aminados livres para ambos os lotes de produto (Gráfico 4) traduz níveis de atividade proteolítica muito próximos. Sendo os valores médios ligeiramente superiores nas amostras com 6 meses de maturação, a evolução da concentração dos ácidos aminados livres, independentemente do valor de pH considerado, traduz uma menor expressão desta importante componente do perfil sensorial nos produtos maturados durante 9 meses, possivelmente mobilizados para oxidação na sequência da oxidação lipídica que decorre em primeiro lugar.

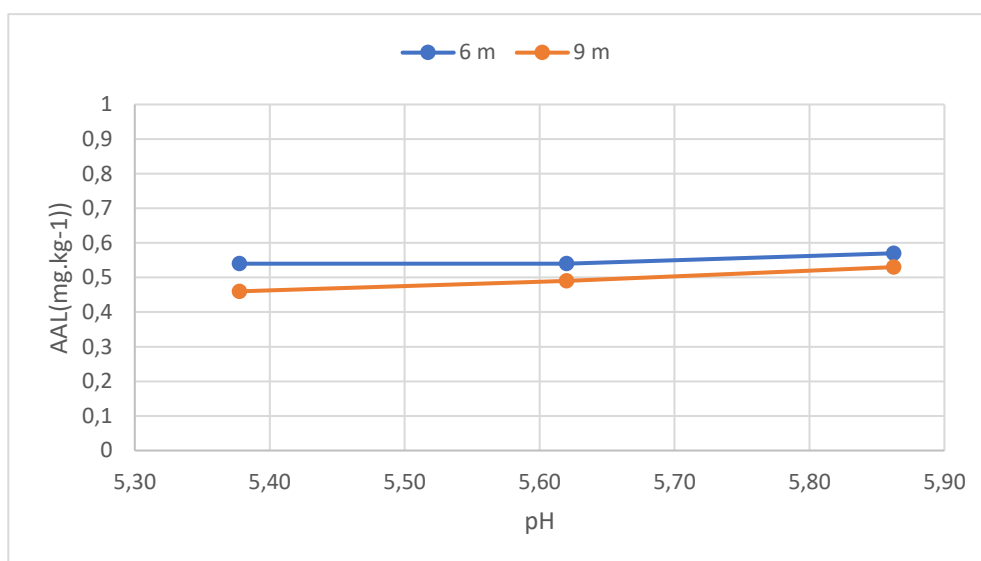


Gráfico 4. Influência do pH no azoto dos aminoácidos livres dos salames

Este quadro evolutivo poderá também estar ligado a uma perda de funcionalidade das enzimas proteolíticas intrínsecas ao longo do tempo, nomeadamente das catepsinas, bem como à redução observada na flora microbiana com potencial proteolítico (Roseiro et al., 2010).

A superior disponibilidade de ácidos aminados livres nas amostras com 6 meses de maturação poderá ter contribuído para a maior formação de aminas biogénicas, independentemente da sua condição de pH final (Gráfico 5). Condições primordiais para a formação destes compostos, como a presença de ácidos aminados livres e também de flora bacteriana mais abundante com potencialidade para a sua descarboxilação, nos produtos maturados por 6 meses traduziu-se num teor total de aminas biogénicas cerca de 2 vezes superior à das amostras com 9 meses de maturação (467,67 vs. 244,33; 629,16 vs. 240,43; 456,32 vs. 271,71; para os valores de pH médio de 5,38, 5,62 e 5,85, respetivamente).

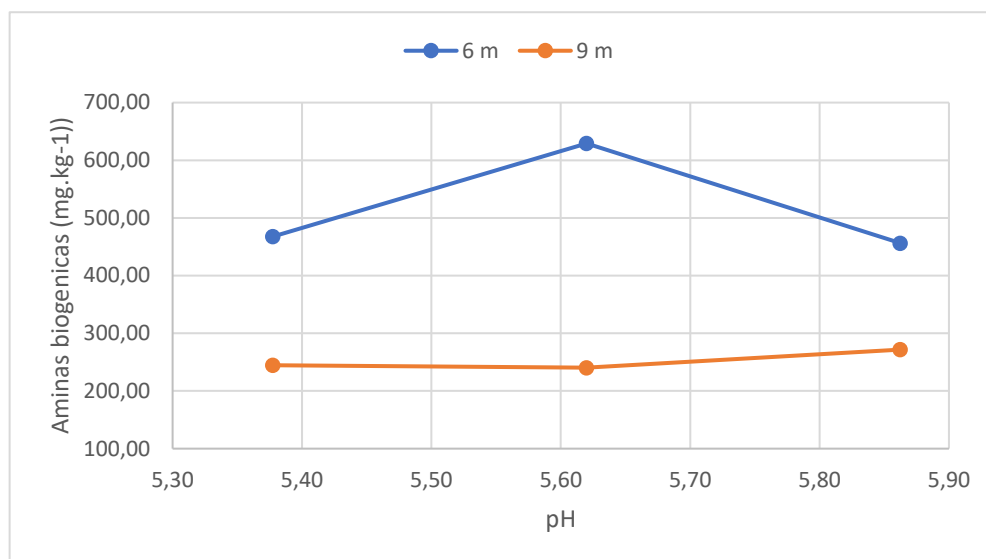


Gráfico 5. Influência do pH nas aminas biogénicas dos salames

O perfil das aminas biogénicas não diferiu de forma considerável entre os valores experimentais de pH mais ácido, tendo nestes persistido a triptamina como a mais concentrada, seguida, de forma quantitativamente decrescente, pela cadaverina, histamina, tiramina, feniletilamina, espermina, espermidina e a putrescina. Com um teor total ligeiramente mais reduzido, as amostras de pH final mais elevado caracterizaram-se por um perfil de aminas biogénicas, menos problemático em termos de risco associado ao respetivo consumo.

O carácter habitualmente aleatório da taxa de formação e metabolização posterior destes compostos poderá justificar a evolução registada para a histamina. O teor desta amina nos produtos com 6 meses de maturação aumenta do grupo mais ácido para o de pH intermédio (46,22 Vs 70,26), voltando a cair para menos de metade no produto de pH médio menos ácido (70,26 Vs 33,94), sem que tal evolução seja tutelada por qualquer alteração registada no teor de ácidos aminados livres (Gráfico 4).

No que concerne à avaliação comparativa dos tempos de maturação testados, sublima-se uma redução considerável do valor médio da histamina nos produtos com 9 meses, com valores de pH mais ácidos (46,22 Vs 14,70 – pH 5,38; 70,26 Vs 16,94 – pH 5,62) e uma quase estabilização dos valores nos produtos com pH médio superior (33,94 Vs 34,89). Sublinha-se o facto da resolução deste perigo químico só poder ser realizado através de tecnologia assente na utilização de culturas de arranque constituídas por estirpes descarboxilase negativas.

10.4. Influência do a_w e do tempo de maturação

Os teores obtidos de cada parâmetro químico analisado em função dos intervalos de a_w e tempo de maturação considerados para este estudo, encontram-se presentes na Tabela 7.

Tabela 7. Influência do a_w e do tempo de maturação nos diferentes parâmetros químicos (Two-Way ANOVA)

	a_w médio 0,82		a_w médio 0,85		a_w médio 0,87		<i>p</i>		
	6 m	9 m	6 m	9 m	6 m	9 m	a_w	Tempo (T)	$a_w \cdot T$
Aldeído malónico (mg.Kg-1)	0,34	0,87	0,40	0,83	0,28	1,10	0,830	< 0,001	0,326
Acidez (%)	13,78	8,67	13,43	12,25	14,93	14,89	0,031	0,042	0,140
Azoto AA livres (mg.Kg-1)	0,47	0,36	0,56	0,50	0,60	0,61	0,001	0,153	0,467
Triptamina (mg.Kg-1)	266,96	137,64	264,42	115,46	318,79	120,80	0,893	0,007	0,885
Feniletilamina (mg.Kg-1)	29,47	4,16	38,28	7,00	31,31	22,77	0,609	0,008	0,457
Putrescina (mg.Kg-1)	17,47	12,90	34,37	14,17	16,61	34,56	0,562	0,782	0,151
Cadaverina (mg.Kg-1)	18,03	15,76	49,67	30,13	36,73	36,00	0,082	0,392	0,562
Histamina (mg.Kg-1)	51,22	15,03	57,45	17,36	49,54	37,85	0,859	0,052	0,696
Tiramina (mg.Kg-1)	24,20b	17,32b	27,78b	28,80b	159,85a	21,32b	0,033	0,034	0,025
Espermidina (mg.Kg-1)	9,21	9,94	19,83	14,03	15,16	12,32	0,478	0,611	0,862
Espermina (mg.Kg-1)	25,38	13,77	33,52	11,51	20,19	12,89	0,776	0,067	0,652
AB total (mg.Kg-1)	441,93	226,52	525,32	238,47	648,18	298,51	0,175	< 0,001	0,546

Para cada parâmetro, médias com letras diferentes são significativamente diferentes (Tukey, $P < 0,05$)

A influência do a_w e do tempo de maturação expressou-se de forma significativa para uma maior gama de parâmetros analisados (Tabela 7). O primeiro fator considerado isoladamente afetou o valor da acidez da gordura ($P = 0,031$), o teor do azoto dos ácidos aminados livres ($P = 0,001$) e a concentração da tiramina ($P = 0,033$), enquanto o tempo de maturação influenciou de forma muito significativa o teor do aldeído malónico ($P < 0,001$) e aminas biogénicas totais ($P < 0,001$), sendo este último efeito refletido na triptamina, feniletilamina e tiramina ($P = 0,007$; $P = 0,008$ e $P = 0,034$, respetivamente) e ainda de forma considerável na acidez da gordura ($P = 0,042$). De referir ainda a influência significativa observada para a concentração da tiramina ($P = 0,025$) em resultado da interação destes fatores.

Independentemente do valor de a_w considerado, os teores médios de aldeído malónico das amostras obtidas dos produtos maturados durante 9 meses foram superiores aos dos congéneres maturados por 6 meses, sendo esta diferença cerca de 4 vezes mais expressiva entre as amostras do grupo de maior valor de água livre (0,28 vs. 1,10).

A tendência para valores crescentes de aldeído malónico em função do aumento do a_w registada nos produtos com 9 meses de maturação não se observou nos congéneres submetidos a esse estadió evolutivo durante 6 meses (Gráfico 6).

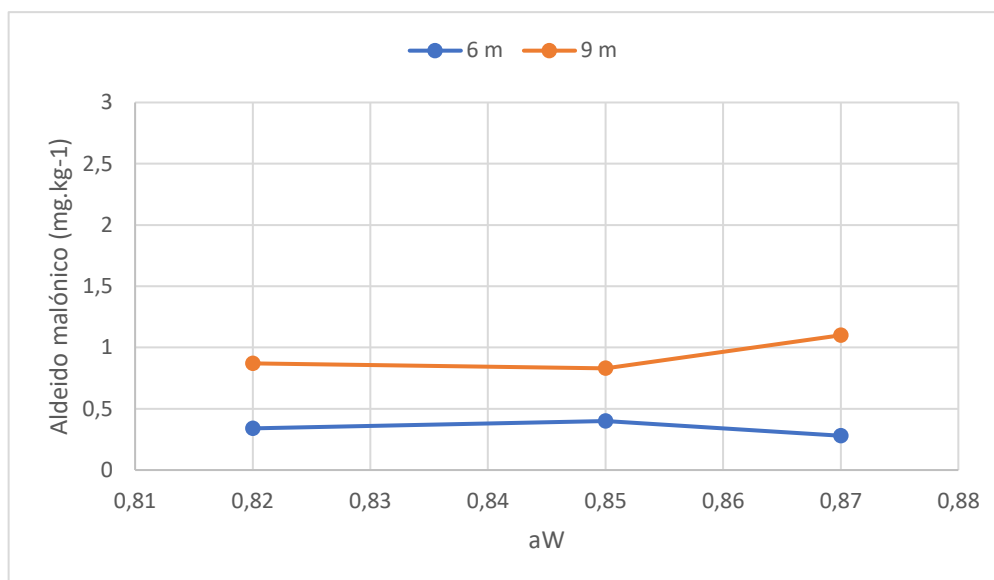


Gráfico 6. Influência do a_w no aldeído malónico dos salames

A taxa de formação Vs. metabolização do aldeído malónico observada nas amostras maturadas durante 9 meses e com a_w de 0,87 determinou um teor médio deste produto secundário da oxidação lipídica tendencialmente superior ao do registado nos congéneres com a_w inferiores. Apesar do intervalo de variação do a_w experimentado neste estudo garantir elevados níveis de segurança microbiológica dos produtos analisados, o seu potencial de evolução bioquímica permanece presente.

Estes resultados aconselham a gestão cuidada das práticas tecnológicas que possam impactar no desenvolvimento do processo oxidativo se o produto alvo pretendido passar pela observação de períodos de maturação mais prolongados. A complexidade da perceção sensorial deste tipo de produtos está também intimamente associada ao desenvolvimento da oxidação lipídica e à formação de variados produtos químicos secundários daí derivados, destacando-se os aldeídos, cetonas, álcoois, etc. Porém, a sua aceitabilidade será prejudicada pela população alargada de consumidores urbanizados se forem ultrapassados determinados limites no teor de substâncias causadoras de “off flavors”.

Também os valores crescentes da acidez da gordura em relação direta com o valor do a_w das amostras (Gráfico 7), indicia que este fator central da estabilidade microbiológica é também determinante da potencial evolução química da matriz, a cargo maioritariamente do seu arsenal enzimático intrínseco e microbiano. Se atendermos que a produção industrial e a comercialização destes produtos assenta frequentemente na persistência de valores mais elevados deste parâmetro (salvaguarda de rendimento superior), tal estratégia poderá dar lugar a matrizes com atividade bioquímica mais rápida e mais prolongada no tempo, originando desvios do perfil e do grau de “stress” oxidativo nos preparados para a prossecução de um nível de maturação mais profundo.

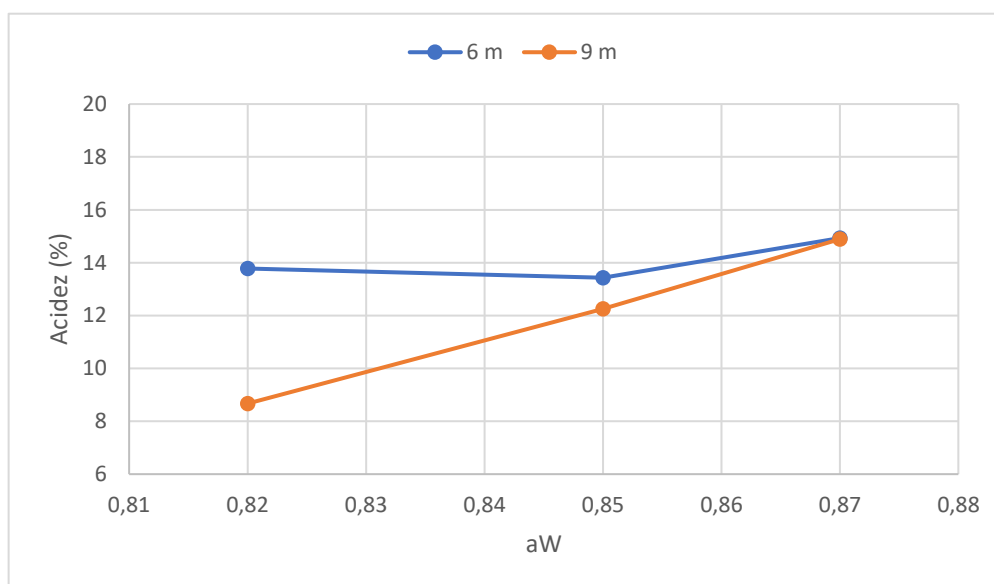


Gráfico 7. Influência do a_w na acidez dos salames

Relativamente ao impacto do a_w no desenvolvimento da proteólise, os resultados observados para o teor de ácidos aminados livres evidenciam maiores índices de formação destes compostos para valores crescentes de a_w . Sublinhe-se que o desenvolvimento comparativo desta via metabólica para os valores de a_w mais reduzidos, ainda que muito ligeiramente superior nos produtos com 6 meses de maturação, passa a ser praticamente coincidente com a observada no nível de a_w mais elevado (Gráfico 8).

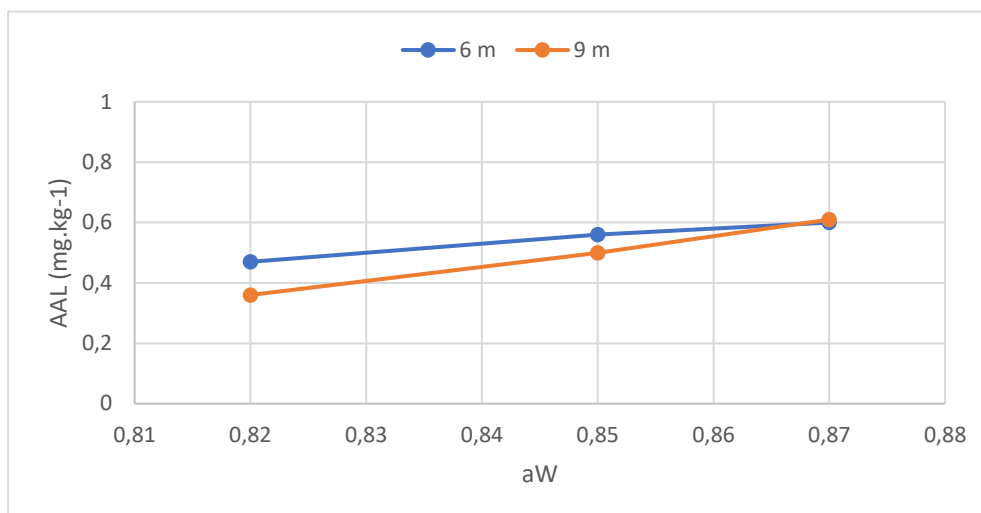


Gráfico 8. Influência do a_w no azoto dos aminoácidos livres dos salames

No que respeita à potencial formação de aminas biogénicas em função do a_w , o valor total deste composto aumentou com a elevação deste fator, independentemente do tempo de maturação em consideração, porém com resultados quantitativamente mais expressivos para os produtos maturados por 6 meses (Gráfico 9). A elevação do a_w de 0,82 para 0,87 traduziu-se num aumento do teor total de aminas biogénicas de 47 % e 32 % para os produtos maturados por 6 e 9 meses respetivamente, verificando-se um duplicar da concentração de aminas biogénicas nos produtos com 6 meses de maturação e a_w 0,87, em relação aos produtos com 9 meses (648,18 Vs 298,5). Tal evolução estará por certo relacionada com a diferença quantitativa e qualitativa da flora remanescente nos dois tipos de produto que se traduziu no presente estudo, sobretudo, no acréscimo das concentrações de tiramina e triptamina (Tabela 7).

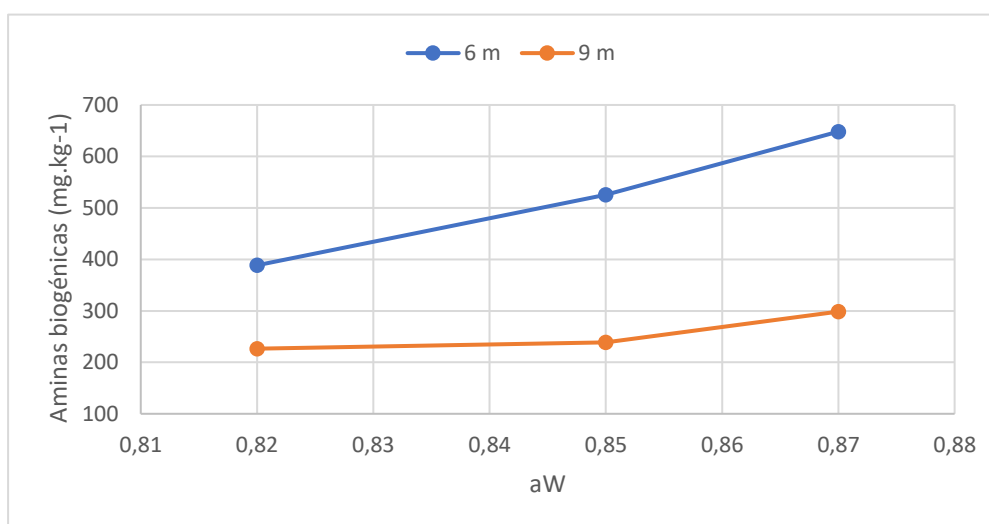


Gráfico 9. Influência do a_w nas aminas biogénicas dos salames

11. Conclusão

Os produtos fermentados crus de humidade intermédia maturados por 6 e 9 meses sob vácuo tendem a desenvolver o processo de oxidação lipídica de forma inversamente proporcional ao seu pH final, com os valores do malonaldeído, enquanto indicador deste processo, significativamente mais elevado nos submetidos a maturação mais prolongada. Precisamente pela maior mobilização dos ácidos gordos livres no processo oxidativo, o nível de acidez da gordura, expresso em teor de ácido oleico, denota uma evolução diretamente proporcional ao valor do pH da matriz, para ambos os tempos de maturação ensaiados, sendo os valores comparativamente mais elevados nos produtos submetidos a 6 meses de maturação.

No que respeita à taxa da proteólise, o teor de ácidos aminados livres formado é praticamente estável para a gama de pH testada, aparecendo muito ligeiramente mais elevada nos produtos com 6 meses de maturação. Porém, atendendo à sua também superior mobilização para a formação de aminas biogénicas, conclui-se existir uma maior atividade enzimática nesta condição, a cargo dos agentes intrínsecos e dos de origem microbiana.

Relativamente ao impacto do a_w na taxa de oxidação lipídica, o teor médio de aldeído malónico tende a ser superior nos produtos com valor de a_w mais elevado, sendo esta tendência corroborada pela respetiva evolução da acidez da gordura. A evolução da proteólise em função do a_w segue o mesmo padrão observado para o pH. No que concerne às aminas biogénicas, produtos finais com valores mais elevados de a_w , tendem a agravar o risco associado a este perigo.

Em síntese, produtos finais mais ácidos e simultaneamente detentores de a_w mais elevado tendem a apresentar maior suscetibilidade oxidativa, nomeadamente se maturados por período dilatado. Relativamente à formação de aminas biogénicas, este perigo biológico está significativamente aumentado nos produtos com maior teor de água biologicamente ativa, não sendo detetado qualquer efeito do pH dentro dos limites testados no âmbito do presente trabalho.

É importante continuar com o controlo, identificação e quantificação destes tipos de compostos durante o processamento e o armazenamento dos produtos alimentares de forma a minimizar os efeitos negativos nos consumidores que a sua presença excessiva poderá desencadear. Assim, este desafio, requer um compromisso por parte das instituições públicas, dos setores de produção, do comércio e dos consumidores.

12. Bibliografia

- Alvarez, M. A., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science and Technology*, 39(2), 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.007>
- Amaral, A. B., da Silva, M. V., & Lannes, S. C. D. S (2018). Lipid oxidation in meat: Mechanisms and protective factors – a review. *Food Science and Technology (Brazil)*, 38, 1-15. <https://doi.org/10.1590/fst.32518>
- Araújo, W. M. C., Borgo, L. A., Botelho, R. B. A., & Montebello, N. D. P. (2007). *Alquimia Dos Alimentos* (1st ed, pp. 220-230). São Paulo: SENAC
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Baptista, P., & Linhares, M. (2005). *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração: Volume 1, Iniciação* (1st ed., pp. 14-21, 77-83). Guimarães: Forvisão
- Bard, J., & Townsend, W. E. (1976). Curado de la carne. In Price, J. F., & Schweigert, B. S. (Eds.), *Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos* (2nd ed., pp. 429-463). Zaragoza: Acribia
- Bargossi, E., Gardini, F., Gatto, V., Montanari, C., Torriani, S., & Tabanelli, G. (2015). The capability of tyramine production and correlation between phenotypic and genetic characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01371>
- Barriuso, B., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2013). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: A challenging task. *European Food Research and Technology*, 236 (1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1866-9>

- Bekhit, A. E. D. A., Hopkins, D. L., Fahri, F. T., & Ponnampalam, E. N. (2013). Oxidative processes in muscle systems and fresh meat: Sources, markers, and remedies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 565-597. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12027>
- Benkerroum, N. (2016). Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 801-826. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>
- Bigolin, J., Weber, C. I., & Alfaro, A. D. T. (2014). Lipid oxidation in mechanically deboned chicken meat: effect of the addition of different agents. *Food and Nutrition Sciences*, 4(8), 219-223
- Broncano, J. M., Petrón, M. J., Parra, V., & Timón, M. L. (2009). Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of free cholesterol oxidation products (COPs) in Latissimus dorsi muscle of Iberian pigs. *Meat Science*, 83(3), 431-437. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.021>
- Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., & Li, J. (2015). The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets. *Food Control*, 56, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.009>
- Campo, M. M., Nute, G. R., Hughes, S. I., Enser, M., Wood, J. D., & Richardson, R. I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 72(2), 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.07.015>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- CDCP (Centers for Disease Control and Prevention). (2022, 27 de setembro). Food Safety. Acedido em 28 de novembro de 2022, em <https://www.cdc.gov/foodsafety/index.html>

- Chaijan, M., & Panpipat, W. (2017). Mechanism of oxidation in foods of animal origin. In Banerjee, R., Verma, A. K., & Siddiqui, M. W. (Eds.), *Natural Antioxidants: Applications in Foods of Animal Origin* (1st ed., pp. 1-38). Boca Raton, Florida: Apple Academic Press.
- Chan, H. W. S. (1987). *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. (1st ed., cap. 1, pp. 1-17). London: Academic Press
- Cheng, JH. (2016). Lipid Oxidation in Meat. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6(3), 12-14. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000494>
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>
- Cobos, A., & Díaz, O. (2015). Chemical Composition of Meat and Meat Products. In Cheung, P. C. K., & Mehta, B. M. (Eds.), *Handbook of Food Chemistry* (pp. 485-489). Berlin: Springer
- de Oliveira, V. S., Ferreira, F. S., Cople, M. C. R., Labre, T. da S., Augusta, I. M., Gamallo, O. D., & Saldanha, T. (2018). Use of Natural Antioxidants in the Inhibition of Cholesterol Oxidation: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(6), 1465-1483. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12386>
- Dobarganes, C., & Márquez-Ruiz, G. (2003). Oxidized fats in foods. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 6(2), 157-163. <https://doi.org/10.1097/00075197-200303000-00004>
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8(10), 1-31. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
- EFSA. (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 2393–2486. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>

- Erickson, M. C. (2002). Lipid oxidation of muscle foods. In Akoh, C. C., & Min, D. B. (Eds), *Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (2nd ed., pp. 365-411). New York: Marcel Dekker
- Estévez, M., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2008). Determination of oxidation. In Nollet, L. M. L., & Toldrá, F. (Eds), *Handbook of Muscle Foods Analysis* (1st ed., pp. 221-240). Boca Raton, Florida: CRC Press
- Fernandes, A. J. G., Ribeiro, M. I. B., Cabo, P. S. A., & Matos, A. M. V. (2016). Consumo de enchidos DOP/IGP/ETG no concelho de Bragança, Portugal. *Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias*, 1(1), 1-23
- FDA (Food and Drug Administration). (2022, 6 de setembro). Food Safety Modernization Act (FSMA). Acedido em 28 de novembro de 2022, em <https://www.fda.gov/food/guidance-regulation-food-and-dietary-supplements/food-safety-modernization-act-fsma>
- Flick, G. J. & Granata, L. A. (2004). Biogenic amines in foods. In Dabrowski, W. M., & Sikorski, Z. E. (Eds.), *Toxins in Food: Chemical and Functional Properties of Food Components* (1st ed., pp. 121-154). Boca Raton, Florida: CRC Press
- Folch, J., Lees, M., Sloana Stanley, G. H. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., & Özogul, F. (2016). Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01218>
- Gava, A. J., Silva, C. A. B., Frias, J. R. G. (2009). *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações* (1st ed., pp. 82-114, 129-133, 342-352). São Paulo: Nobel
- INE (Instituto Nacional de Estatística). (2020). *Estatísticas Agrícolas (Edição 2021)*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I. P.

- Incze, K. (1998). Dry Fermented Sausages. *Meat Science*, 49(1), 169-177.
- Janeiro, P. (1948). *Noções de Salsicharia: Técnica Geral de Salsicharia e Salsicharia Especial* (1st ed., vol. 2, pp. 104). Lisboa: Livraria Luso Espanhola.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., & Baba, E. (2007). Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1467–1473. <https://doi.org/10.1128/AEM.01907-06>
- Kinter, M. (1995). Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1-2), 223-236. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00189-P](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00189-P)
- Komprda, T., Smělá, D., Pechová, P., Kalhotka, L., Štencl, J., & Klejdus, B. (2004). Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Science*, 67(4), 607-616. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.01.003>
- Kordiovská, P., Vorlová, L., Borkovcová, I., Karpíšková, R., Buchtová, H., Svobodová, Z., Křížek, M., & Vácha, F. (2006). The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*, 51(6), 262-270. <https://doi.org/10.17221/3938-cjas>
- Králová, M. (2015). The effect of lipid oxidation on the quality of meat and meat products. *Maso International Journal of Food Science and Technology*, 2, 125-132
- Kramlich, W. E. (1976). Embutidos. In Price, J. F., & Schweigert, B. S. (Eds.), *Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos* (2nd ed., pp. 493-523). Zaragoza: Acribia
- Leistner, F. (1992). The essentials of producing stable and safe raw fermented sausages. In Smulders, J. M., Toldrá, F., Flores, J., & Prieto, M. (Eds.), *New Technologies for meat and meat products* (pp. 1-18). Utrecht: ECCEAMST

- Leuratti, C., Watson, M. A., Deag, E. J., Welch, A., Singh, R., Gottschalg, E.,... Bingham, S. A. (2002). Detection of malondialdehyde DNA adducts in human colorectal mucosa: relationship with diet and the presence of adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(3), 267-73
- Lopes, C., Torres, D., Oliveira, A., Severo, M., Alarcão, V., Guiomar, S., et al. (2017). Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: Relatório de resultados. *Universidade do Porto*, 1-291
- Lorenzo, J. M., Domínguez, R., & Carballo, J. (2017). Control of lipid oxidation in muscle food by active packaging technology. In Banerjee, R., Verma, A. K., & Siddiqui, M. W. (Eds.), *Natural Antioxidants: Applications in Foods of Animal Origin* (1st ed., pp. 343-382). Boca Raton, Florida: Apple Academic Press.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Baldin, J. C., Franco, D., Domínguez, R., & Trindade, M. A. (2017). The use of natural antioxidants to replace chemical antioxidants in foods. In Rodriguez, J. M. L., & García, F. J. C. (Eds), *Strategies for Obtaining Healthier Foods* (1st ed., pp. 205-228). New York: Nova Science Publishers
- Lorenzo, J. M., Ruiz, D. J. F, & Carballo, J. (2016). Biogenic amines in fermented meat products. In Zdolec, N. (Ed.), *Fermented Meat Products: Health Aspects* (1st ed., pp. 450-473). Boca Raton, Florida: CRC Press
- Łuczaj, W., & Skrzydlewska, E. (2003). DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 36 (3), 306-312.
- Maga, J. A., & Katz, I. (1978). Amines in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 10(4), 373-403. <https://doi.org/10.1080/10408397809527256>
- McCabe-Sellers, B. J., Staggs, C. G., & Bogle, M. L. (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.008>

- Moerck, K. E., & Ball, H. R. (1974). Lipid autoxidation in mechanically deboned chicken meat. *Journal of Food Science*, 39(5), 876-879.
- Moreno-Arribas, V., & Lonvaud-Funel, A. (2001). Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1), 103–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00559-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00559-0)
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., & Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, 75(7), 139-150. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>
- NP 3441, 2008 - Carnes e produtos cárneos - Determinação do pH - Método de referência
- NP 3443:1990 - Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de azoto dos ácidos aminados livres
- Okolie, N. P., Akioyamen, M. O., Okpoba, N., & Okonkwo, C. (2009). Malondialdehyde levels of frozen fish, chicken and turkey on sale in Benin City markets. *African Journal of Biotechnology*, 8(23), 6638-6640
- Özogul, F., Kacar, Ç., & Hamed, I. (2015). Inhibition effects of carvacrol on biogenic amine formation by common food-borne pathogens in histidine decarboxylase broth. *LWT Food Science and Technology*, 64(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.027>
- Pearson, D. 1973. In Laboratory techniques in food analysis. London: Butterworths.
- Pereira, A. L. F., & Abreu, V. K. G. (2018). Lipid peroxidation in meat and meat products. In Mansour, M. A. (Ed.), *Lipid Peroxidation Research* (1st ed., pp.1-14). London: IntechOpen.
- Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., Sinnell, H. J. (1994). *Tecnología e Higiene de la Carne* (pp. 854). Zaragoza: Acribia

- Purriños, L., Bermúdez, R., Franco, D., Carballo, J., & Lorenzo, J. M. (2011). Development of Volatile Compounds during the Manufacture of Dry-Cured “Lacón”, a Spanish Traditional Meat Product. *Journal of Food Science*, 76(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01955.x>
- Qualifica4Agro. (2020). *Sumário Prático sobre Apresentação de Presunto e Enchidos*. Castelo Branco: Qualifica4Agro
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007 de 5 de dezembro de 2007. Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, L322
- Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de abril de 2004. Regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia L 139/55.
- Reitznerová, A., Šuleková, M., Nagy, J., Marcinčák, S., Semjon, B., Čertík, M., & Klempová, T. (2017). Lipid Peroxidation Process in Meat and Meat Products: A Comparison Study of Malondialdehyde Determination between Modified 2-Thiobarbituric Acid Spectrophotometric Method and Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules*, 22, 1-12
- Richards, M. P. (2005). Lipid chemistry and biochemistry. In Hui, Y. H. (Ed), *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering* (1st ed., pp. 8(1)-8(21)). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Rio, D. D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 15, 316-328
- Ross, C. F., & Smith, D. M. (2006). Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(1), 18-25

- Roseiro, C., Santos, C., Gonçalves, H., Serrano, C., Aleixo, C., Partidário, A., Lourenço, A. R., Abreu Dias, da Ponte, M. D. J. B. 2017. Susceptibility of dry-cured tuna to oxidative deterioration and biogenic amines generation: I. Effect of NaCl content, antioxidant type and ageing. *Food Chemistry*, 228, 26-34. Doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.125
- Roseiro, L. C., Gomes, A., Gonçalves, H., Sol, M., Cercas, R., & Santos, C. (2010). Effect of processing on proteolysis and biogenic amines formation in a Portuguese traditional dry-fermented ripened sausage “Chouriço Grosso de Estremoz e Borba PGI”. *Meat Science*, 84, 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.044>
- Roseiro, C.; Santos, C.; Sol, M.; Silva, L.; Fernandes, I. (2006). Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Science*, 74, 557-563. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.030>
- Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. (2019). Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods*, 8(62), 1-12
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8), 489–499. <https://doi.org/10.1080/10408690490489341>
- Ruiz-Carrascal, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. I., & García, C. (2000). Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, 33(2), 91-95. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00153-2)
- Santos, C., Gonçalves, H., & Roseiro, C. (2022). Importância da flora microbiana autóctone para a segurança e autenticidade dos produtos da salsicharia tradicional portuguesa. *Vida Rural*, Julho/Agosto 2022, 70-75.
- Santos, C., & Roseiro, C. (2018). Salsicharia Tradicional Portuguesa – Catálogo dos produtos da Região do Alentejo. In Pestana, M., & Coelho, I. S. (Eds.), *Coleção de Cadernos Técnicos Siva Lusitana*. Lisboa: INIAV.

- Santos, M. H. S. (1996). Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), 213-231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)
- Schilstra, M. J., Veldink, G. A., & Vliegthart, J. F. G. (1993). Kinetic Analysis of the Induction Period in Lipoxygenase Catalysis. *Biochemistry*, 32(30), 7686-7691.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X)
- St. Angelo, A. J., Vercellotti, J., Jacks, T., & Legendre, M. (1996). Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(3), 175-224.
- Tabanelli, G., Montanari, C., & Gardini, F. (2019). Biogenic Amines in Food: A review of Factors Affecting Their Formation. In Varelis, P., Melton, L., & Shahidi, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (vol. 1, pp. 337-343). Amsterdam: Elsevier
- Taylor, S. L. (2014). Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects. *Critical Reviews in Toxicology*, 17(2), 91-128.
- Toldrá, F., & Reig, M. (2011). Innovations for healthier processed meats. *Food Science & Technology*, 22, 517-522. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.007>
- USDA (United States Department of Agriculture). (2014). National Nutrient Database. In Cheung, P. C. K., & Mehta, B. M. (Eds.), *Handbook of Food Chemistry* (pp. 483, 486). Berlin: Springer
- Vandendriessche, F. (2008). Meat products in the past, today and in the future. *Meat Science*, 78(1-2), 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.10.003>
- Veloso, M. G. (2000). Microbiologia das carnes: Parte 1. In Gil, J. I. (Ed.), *Manual de Inspeção Sanitária de Carnes* (2nd ed., pp. 252-272). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian

- Wadhwa, N., Mathew, B. B., Jatawa, S. K., & Tiwari, A. (2012). Lipid peroxidation: Mechanism, models and significance. *International Journal of Current Science*, 3, 29-38.
- Warriss, P. D. (2009). *Meat Science: An Introductory Text* (2nd ed., pp. 26-48, 65-73, 130-142). London: Modular Texts
- Wąsowicz, E., Gramza, A., Heś, M., Jeleń, H. H., Korczak, J., Małecka, M., et al. (2004). Oxidation of lipids in food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 54(1s), 87-100.
- Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R., & Enser, M. (2004). Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Science*, 66(1), 21-32. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00022-6)
- Zarkovic, N., Cipak, A., Jaganjac, M., Borovic, S., & Zarkovic, K. (2013). Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *Journal of Proteomics*, 92, 239-247.

13. Anexos

Anexo I – Curvas Padrão

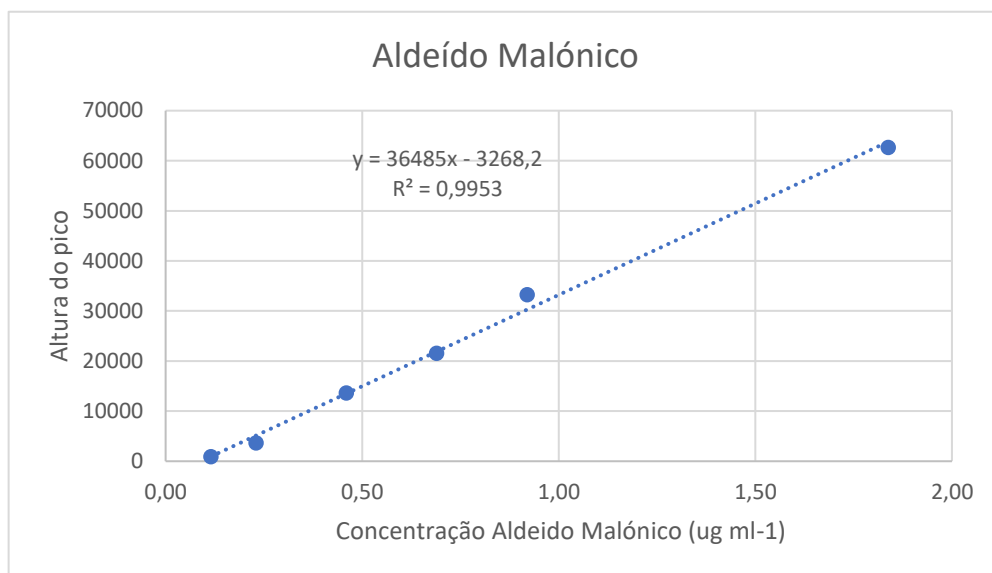


Gráfico 10. Curva Padrão do Aldeído Malónico

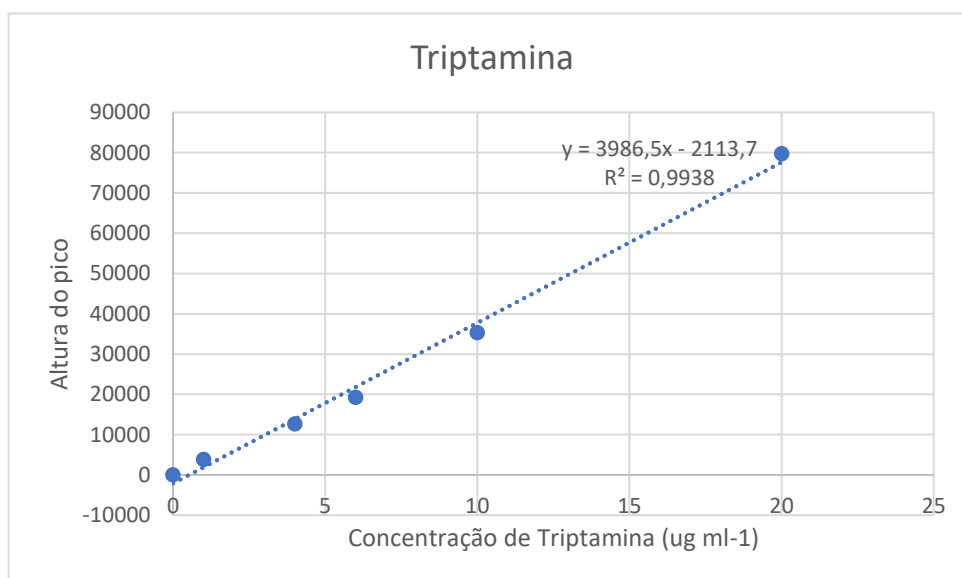


Gráfico 11. Curva padrão da Triptamina

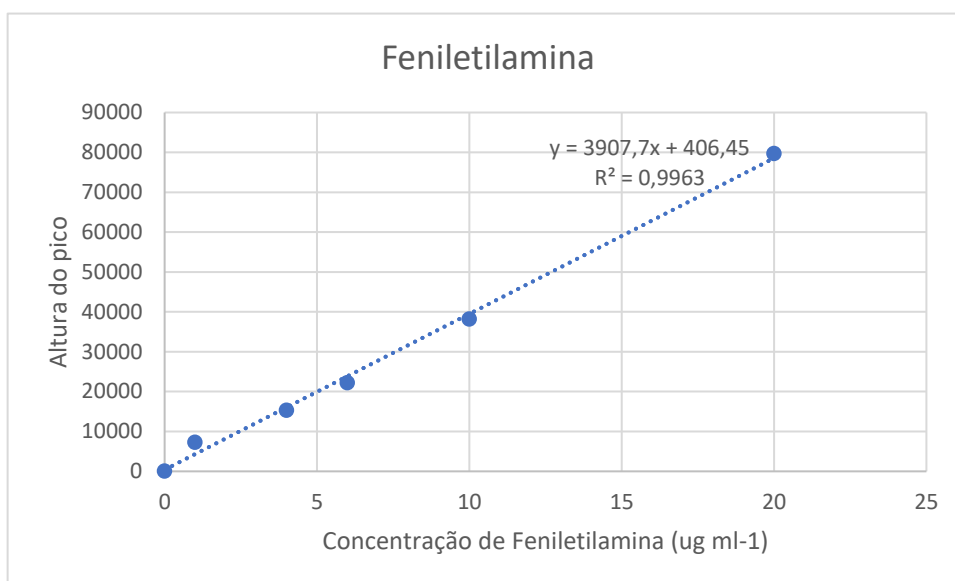


Gráfico 12. Curva padrão da Feniletilamina

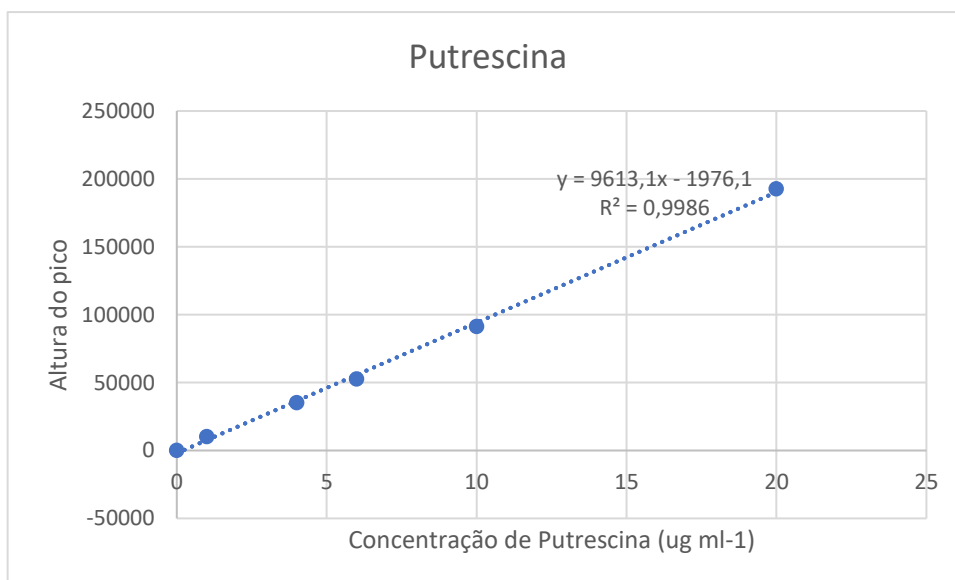


Gráfico 13. Curva padrão da Putrescina

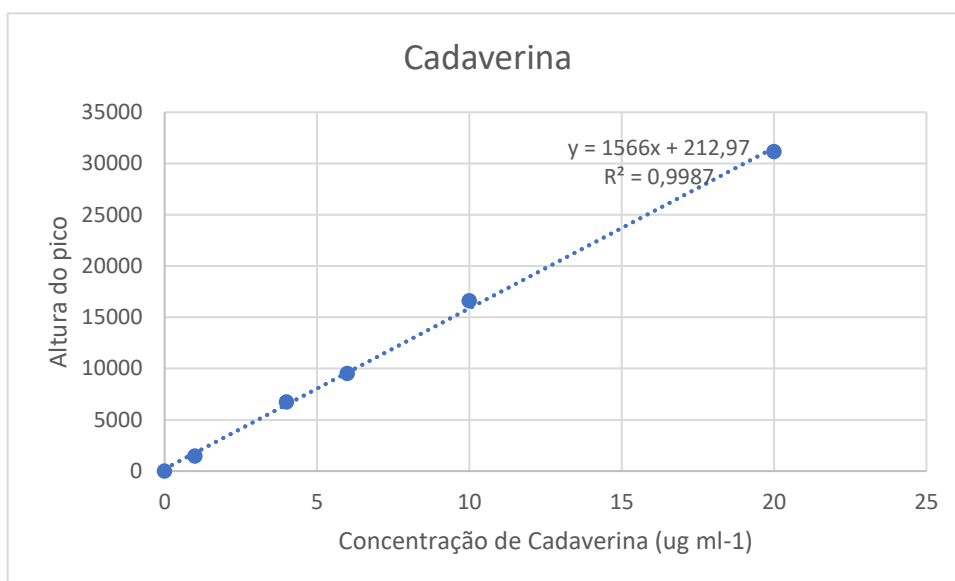


Gráfico 14. Curva padrão da Cadaverina

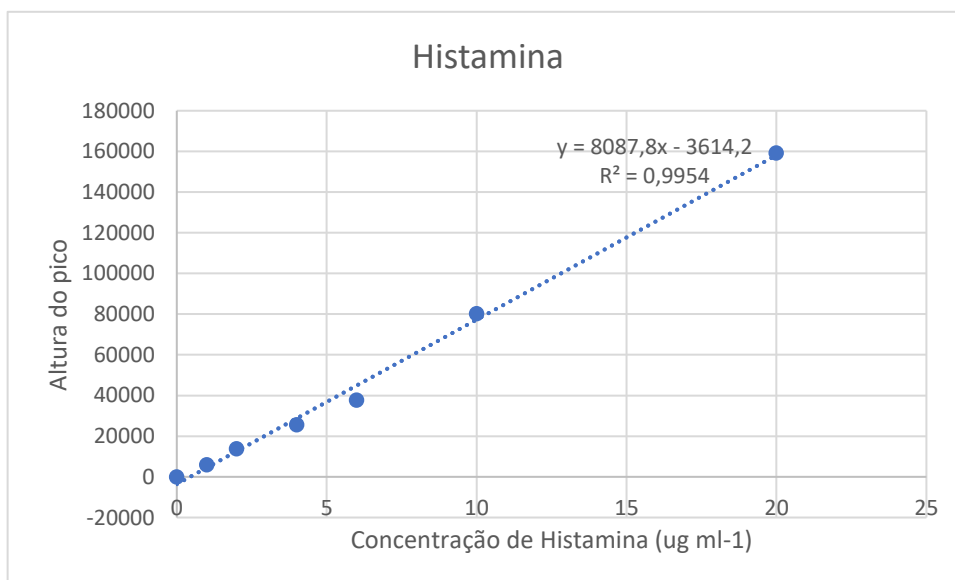


Gráfico 15. Curva padrão da Histamina

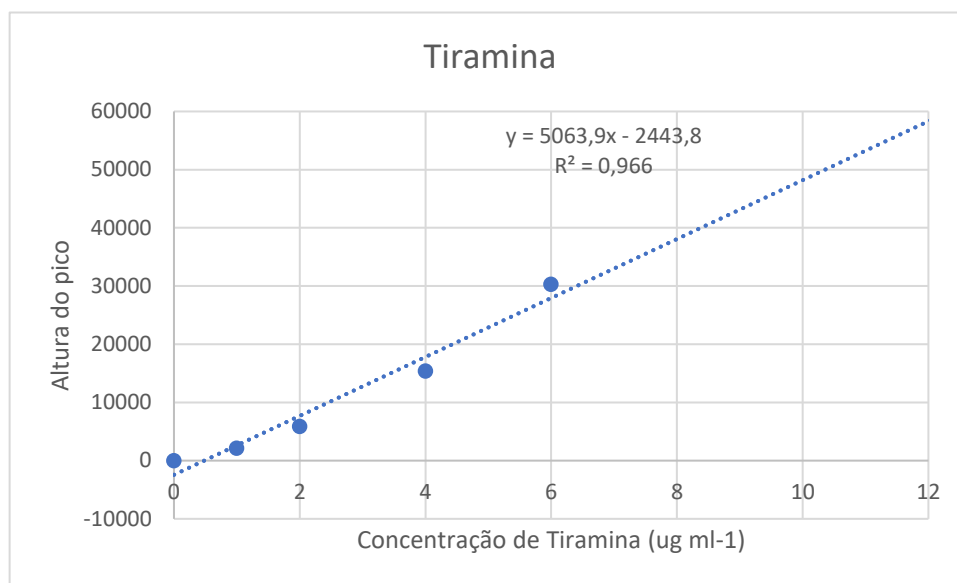


Gráfico 16. Curva padrão da Tiramina

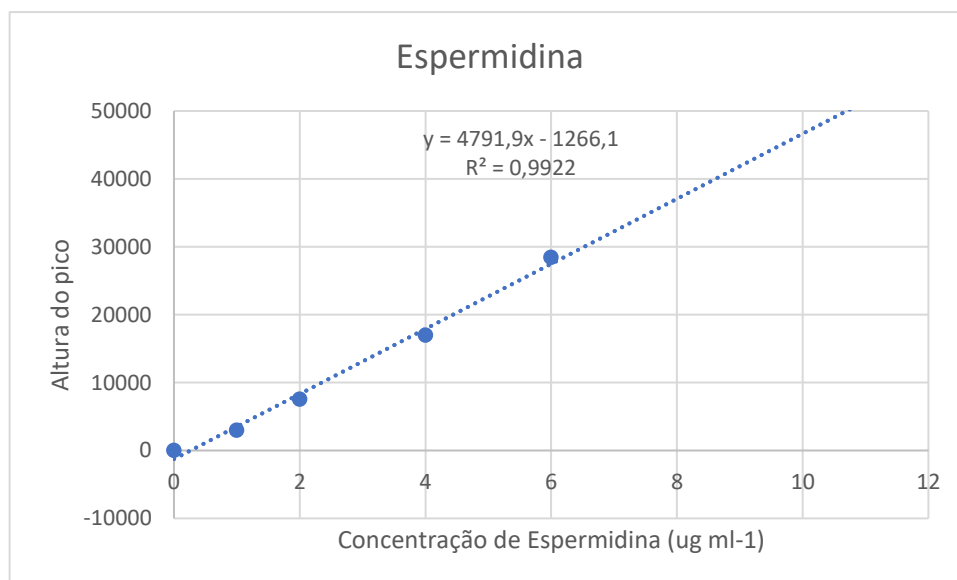


Gráfico 17. Curva padrão da Espermidina

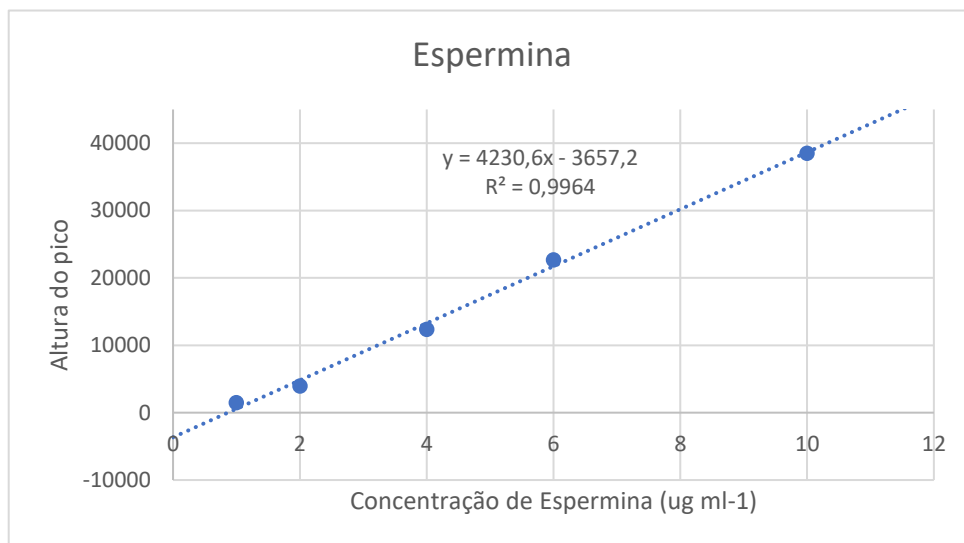


Gráfico 18. Curva padrão da Espermina

Anexo II – Comunicações

^{1,2}Canhoto, L., ¹Gonçalves, H., ¹Serrano, C., ^{1,2}Santos, C., ^{1,2}Roseiro, C. (2022). “Influence of pH on lipid oxidation, lipolysis and proteolysis susceptibility of pork dry cured sausage”. Poster apresentado no XVI Encontro de Química dos Alimentos, que decorreu em Castelo Branco, no Cine-Teatro Avenida de 23 a 26 de outubro de 2022.

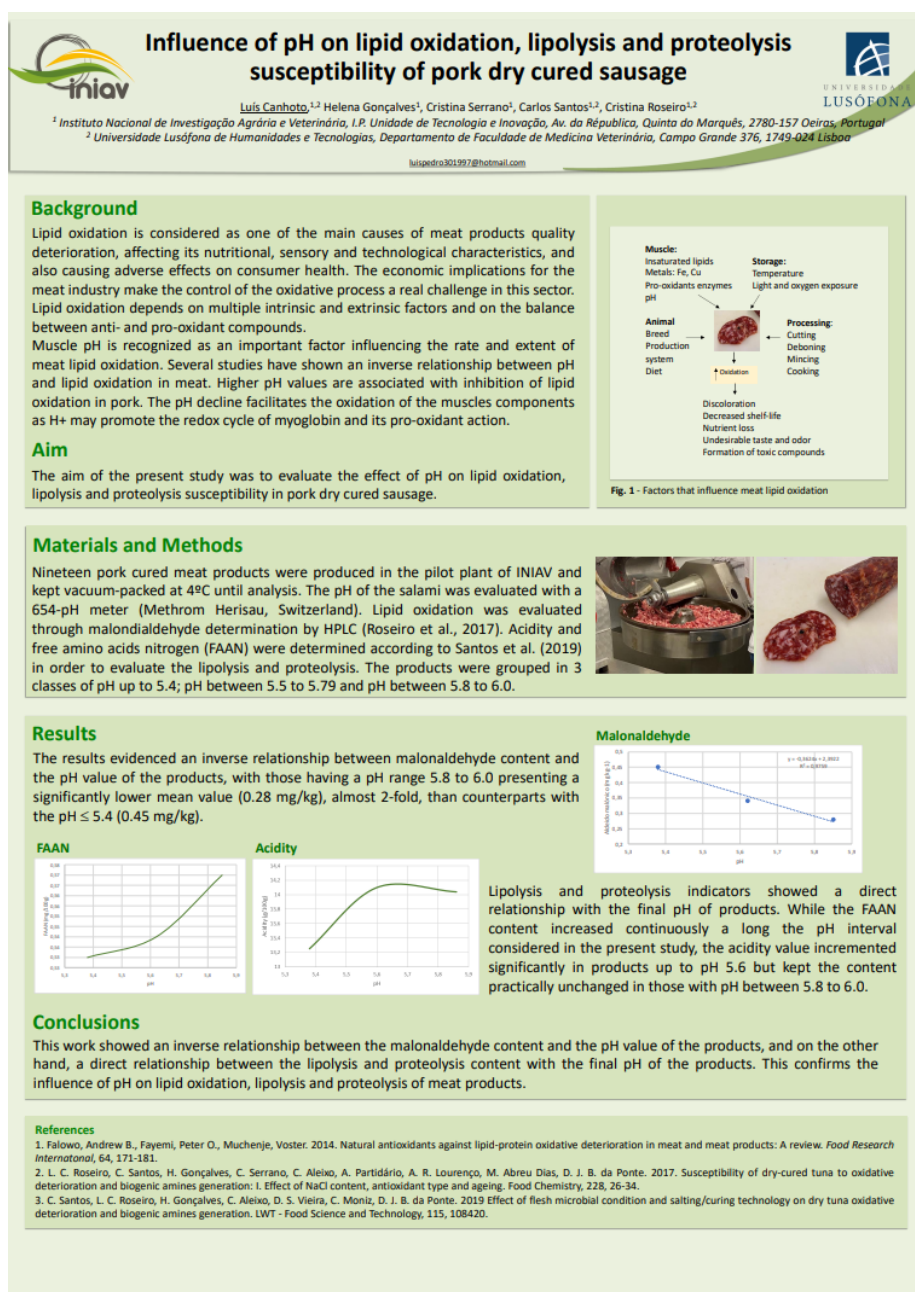


Figura 4. Poster “Influence of pH on lipid oxidation, lipolysis and proteolysis susceptibility of pork dry cured sausage”

Anexo III – Materiais e Reagentes utilizados em cada técnica

1. Preparação da amostra:

- Picadora (Moulinex, Spain)

2. Avaliação do pH:

- Potenciómetro 654 pH-Meter (Metrohm Herisau, Switzerland);
- Eléctrodo de vidro (Mettler Toledo, Switzerland);
- Soluções padrões de pH 4 e 7;
- Balança digital (Sartorius, Germany);
- Água Destilada;
- Gobelé;
- Vareta de vidro

3. Avaliação da atividade da água (a_w):

- Cápsulas de porta amostras;
- Medidor de a_w (Rotronic HygroLab);
- Sonda AWVC-DIO (Rotronic AG, Switzerland)

4. Avaliação da gordura:

- Balança digital (Sartorius, Germany);
- Método de Folch;
- Polytron® modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland);
- Papel de filtro nº1238 (Filter-Lab, Barcelona);
- Bomba de vácuo (Gast, U.S.A);
- Cloreto de sódio (NaCl) 0,73 %;
- Ampola de decantação;
- Balão de erlenmeyer de 250 ml;
- Evaporador rotativo (Heidolph, Germany);
- Estufa (Mettmert, Germany);
- Exsicador;
- Balança analítica (Mettler Toledo, Switzerland)

5. Avaliação do aldeído malónico:

- Balança digital (Sartorius, Germany);
- Ácido tricloroacético 7,5 %;
- Polytron® modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland);
- Papel de filtro nº 1238 (Filter-Lab, Barcelona);
- Funil;
- Seringa;
- Acrodisc 0,45 μm ;
- Micropipeta;
- Vial;
- 2,4-Dinitrofenilhidrazina;
- HPLC;
- Coluna “Phenomenex Gemini C18”;
- Água destilada;
- Acetonitrilo;
- Ácido acético glacial

6. Avaliação das aminas biogénicas:

- Balança digital (Sartorius, Germany);
- Ácido perclórico 0,4 M;
- Polytron® modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland);
- Tubos de centrífuga;
- Centrífuga modelo RC-5C (Sorvall® Instruments, Newtown);
- Funil;
- Papel de filtro nº1238 (Filter-Lab, Barcelona);
- Balão volumétrico de 100 ml;
- Vortex (Heidolph, Germany);
- Micropipeta;
- Hidróxido de sódio 2N;
- Cloreto de dansilo (cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo);
- Bicarbonato de sódio saturado;
- Estufa (Mettler, Germany);
- Acetona;
- Amónia;
- Tubos de ensaio;
- Acetonitrilo;
- Seringa;
- Acrodisc 0,45 μm ;
- Vial;
- HPLC;
- Acetato de amónio 0,1M;
- Acetonitrilo

7. Avaliação do azoto dos aminoácidos livres:

- Balança digital (Sartorius, Germany);
- Frasco de schott 250 ml;
- Água destilada;
- Ácido tricloroacético 20 %;
- Polytron® modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland);
- Frigorífico (Liebherr, Germany);
- Balão Volumétrico 200 ml;
- Funil;
- Papel de filtro nº1238 (Filter-Lab, Barcelona);
- Balão de erlenmeyer de 250 ml;
- Fenolftaleína (1%);
- Conta gotas;
- NaOH 1,5N;
- Hotte;
- Formol 40 %;
- NaOH 0,02 N;
- Agitador magnético (Ikamag® RCT, Germany);
- Bureta;
- Pipeta

8. Avaliação da acidez:

- Balança digital (Sartorius, Germany);
- Diclorometano;
- Polytron® modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland);
- Funil;
- Papel de filtro nº1238 (Filter-Lab, Barcelona);
- Sulfato de sódio anidro;
- Balão volumétrico de 100 ml;
- Balão de erlenmeyer de 250 ml;
- Evaporador rotativo (Heidolph, Germany);
- Estufa (Mettler, Germany);
- Exsicador;
- Balança analítica (Mettler Toledo, Switzerland);
- Pipeta;
- Etanol 95 %;
- Hotte;
- NaOH 0,1N;
- Fenolftaleína (1%);
- Bureta;
- Agitador magnético (Ikamag® RCT, Germany)