



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária



Efeito das Altas Pressões nas características nutricionais, sensoriais e microbiológicas de um produto de salsicharia

Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar

António Sérgio Alves Rebelo

Orientadores

Luís Pinto de Andrade
Cristina Miguel Pintado
Paulo Antunes

Junho de 2014



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária



CATAA
CENTRO DE APOIO TECNOLÓGICO
AGRO ALIMENTAR

Efeito das Altas Pressões nas características nutricionais, sensoriais e microbiológicas de um produto de salsicharia

António Sérgio Alves Rebelo

Orientadores

Luís Pinto de Andrade

Cristina Miguel Pintado

Paulo Antunes

Dissertação da tese de mestrado apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Pinto de Andrade do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Junho de 2014

Composição do júri

Presidente do júri

Doutora Cristina Maria Batista Santos Pintado

Vogais

Doutor Luís Pedro Mota Pinto de Andrade, ESA-IPCB

Doutor António Manuel Moitinho Nogueira Rodrigues, ESA-IPCB

Doutora Cristina Miguel Pintado, CATAA

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que de algum modo contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta importante etapa da minha vida.

Ao CATAA por ter fornecido toda a infraestrutura para a realização deste trabalho, e pelo apoio dos seus técnicos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Luís Pinto de Andrade, Doutora Cristina Miguel Pintado e Doutor Paulo Antunes por todo o apoio e orientação.

À INCARPO por disponibilizar as amostras necessárias á realização deste trabalho, em especial ao Eng.º Luís Folhas.

Ao CYCITEX, a todo o grupo das altas pressões hidrostática e em especial à Dra. Maria do Rosário Ramirez Bernabé.

À Mestre Mafalda Resende por toda a dedicação e apoio na realização das análises físico-químicas e provas sensoriais.

Ao Eng.º André Nunes pela sua colaboração na realização das provas sensoriais.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco e em especial à Eng^a Conceição Vitorino.

À Tânia por toda a paciência, carinho e dedicação durante a realização deste trabalho e nos últimos 10 anos.

Ao Joaquim Carvalho pela amizade, apoio e disponibilidade ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus pais e meus amigos por estarem sempre presentes e disponíveis para ajudar.

A todos o meu muito obrigado!

Resumo

Ao longo dos tempos diferentes técnicas e métodos têm sido utilizados na conservação dos alimentos. Novas tecnologias têm vindo a ser implementadas com o avanço no conhecimento científico como, as Altas Pressões Hidrostáticas, que são uma tecnologia muito recente na indústria de alimentos, e que tem sido aplicada por este fim desde 1990.

Os nitritos e/ou nitratos são adicionados aos produtos de salsicharia com o objetivo de conservar o produto, desenvolver e fixar a cor, melhorar o sabor e os aromas. Ultimamente tem sido feito um esforço para diminuir ou eliminar o uso destes por apresentarem risco de toxicidade para o consumidor.

No presente estudo, avaliou-se o efeito das Altas Pressões Hidrostáticas (600 Mpa por 10 min) e a não incorporação de nitritos e nitratos com aplicação de altas pressões nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do bacon durante 120 dias de conservação a 4 °C.

As análises microbiológicas revelaram que o tratamento HPP obteve uma contagem de microrganismos a 30 °C inferior ao tratamento Controlo e S/Nitr + HPP. Quanto às características físico-químicas, verificou-se que estas não foram muito afetadas pelas altas pressões e ausência de nitrito/nitrato, sendo que a cor do Bacon sem nitritos/nitratos apresentou uma coloração mais amarela e menos vermelha no final do tempo de conservação e o teor de nitritos diminuiu ao longo do período de conservação nos tratamentos Controlo e HPP.

Pela análise sensorial podemos verificar que o Bacon sem nitritos teve uma menor intenção de compra, reuniu menor preferência e os consumidores menos gostaram. Sendo o Bacon com tratamento HPP o mais apreciado pelos consumidores.

Palavras chave

Altas Pressões Hidrostáticas, Bacon, Nitritos/nitratos.

Abstract

Over the times different techniques and methods have been used in food preservation. New technologies have been implemented with the advancement in scientific knowledge as the High Hydrostatic Pressures, which are a very recent technology in the food industry, and has been applied for this purpose since 1990.

The nitrite and/or nitrate are added to meat products aiming to preserve the product, develop and fix the color, enhance flavor and aromas. Lately there has been an effort to reduce or eliminate the use of these because they present risk of toxicity to the consumer.

In the present study, was evaluated the effect of High Hydrostatic Pressure (600 MPa for 10 min) and the non-incorporation of nitrites and nitrates with the application of high pressure on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of bacon during 120 days of storage at 4 ° C.

Microbiological analysis revealed that HPP treatment obtained a score of microorganisms at 30 °C lower than the control and without nitrites treatments. As for the physicochemical characteristics, it was found that these were not too affected by high pressure and absence of nitrite/nitrate, and the color of bacon without nitrites/nitrates had a redder and less yellow color at the end of shelf-life and nitrite content decreased throughout the storage period in control and HPP treatments.

Through the sensory analysis we can verify that the bacon without nitrites had a lower purchase intent, brought together lowest preference and panelists liked fewer. Being the bacon with HPP treatment the most appreciated by the panelists.

Keywords

High Hydrostatic Pressures, Bacon, nitrites/nitrates.

Índice geral

Resumo.....	V
Abstract	VII
Índice geral.....	IX
Índice de figuras	XI
Lista de tabelas.....	XII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XIII
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 – Produtos cárneos.....	2
2.1.1 - Produção de bacon	3
2.1.2 - Nitritos e nitratos	4
2.2 - Tecnologia de alta pressão hidrostática.....	6
2.2.1 - Desenvolvimento histórico da tecnologia de altas pressões	6
2.2.2 - Princípios gerais	7
2.2.3 - Descrição do processo HPP	8
2.2.4 - Fatores que influenciam a eficácia da aplicação de altas pressões hidrostáticas e seus efeitos nos alimentos	9
2.2.5 - Efeito sobre os componentes dos alimentos.....	15
2.2.6 - Alterações na cor	15
2.2.7 - Aplicação de tratamentos combinados	16
2.2.8 - Aplicação da HPP na indústria de produtos cárneos	17
CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. – Obtenção das amostras.....	20
3.2. - Delineamento experimental	20
3.3. - Processamento a alta pressão	21
3.4. - Análises Microbiológicas.....	21
3.4.1 Preparação da amostra	22
3.4.2. – Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	22
3.4.3. – Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	22
3.4.4. - Contagem de bactérias sulfito-redutoras em anaerobiose	23
3.4.5. - Contagem de <i>Escherichia coli</i>	23
3.4.6. - Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C	23

3.5. - Análises Físico-químicas	24
3.5.1. - Determinação do pH	24
3.5.2. - Determinação de Humidade	24
3.5.3. - Determinação da atividade da água (a_w)	24
3.5.4. - Determinação da proteína total.....	24
3.5.5. - Determinação da Gordura Total	25
3.5.6. - Análise instrumental da Cor	25
3.5.7. - Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA).....	25
3.5.8. - Determinação do índice de peróxidos	26
3.5.9. - Determinação do teor em nitritos e nitratos	26
3.5.10. - Determinação do perfil em ácidos gordos	26
3.6. – Análise Sensorial.....	27
3.6.1 - Constituição do painel de consumidores	27
3.6.2 - Preparação e apresentação das amostras	27
3.7. – Análise Estatística	28
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. - Análises microbiológicas	29
4.2. - Análises Físico-químicas	30
4.2.1. Determinação da Proteína, Gordura e Humidade.	30
4.2.2. – Determinação do pH	31
4.2.3. – Determinação da Atividade da Água (a_w).....	32
4.2.4. - Determinação do Índice do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	33
4.2.5. - Determinação do Índice de Peróxidos	34
4.2.6. – Determinação da Análise Instrumental da Cor	35
4.2.7. - Determinação do Teor de Nitritos e Nitratos	36
4.2.8. - Determinação dos Ácidos Gordos	37
4.3. - Análise Sensorial	39
CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
CAPÍTULO VI – BIBLIOGRAFIA.....	45
ANEXOS	53

Índice de figuras

Figura 1: Fluxograma geral do processamento de bacon (Incarpo, 2014).	3
Figura 2. Distribuição de equipamentos de altas pressões nos diferentes sectores da indústria alimentar (Hyperbaric, 2013 <i>cit. por</i> Perés, 2013).	7
Figura 3: Evolução da Temperatura e Pressão durante o processamento de altas pressões (Balasubramaniam <i>et al.</i> , 2008; Yordanov e Angelova, 2010; Nguyen e Balasubramaniam, 2011). T1-Temperatura inicial do alimento. T2-Temperatura do alimento após pressurização. T3-Temperatura do alimento após um determinado período de pressurização. T4- Temperatura final do alimento, após descompressão do equipamento. P1-Pressão inicial. P2-Pressão após compressão. P3-Pressão do alimento antes da descompressão. P4- Pressão após despressurização.	14
Figura 4: Cronograma de realização das análises microbiológicas.	20
Figura 5: Equipamento de Altas Pressões Hidrostáticas (Hyperbaric Wave 600/55).	21
Figura 6: Intenção de compra pelos consumidores no Dia 0 com base na apreciação visual das amostras de bacon e após provar.	39
Figura 7: Intenção de compra pelos consumidores no Dia 60 com base na apreciação visual das amostras de bacon e após provar.	40
Figura 8: Nível de satisfação global dos tratamentos Controlo, HPP e S/Nitr + HPP no Dia 0.	41
Figura 9: Nível de satisfação global dos tratamentos Controlo, HPP e S/Nitr + HPP no Dia 60.	41
Figura 10: Percentagem de consumidores que gostaram dos tratamentos Controlo, HPP e S/Nitr + HPP na prova de ordenação nas duas datas de prova.	42
Figura 11: Preferência global das amostras de bacon nas duas datas de prova (de 1 – a que menos gostou a 3 – a que mais gostou).	42

Lista de tabelas

Tabela 1 – Classificação de produtos cárneos transformados (adaptado de Vandendriessche, 2008).	2
Tabela 2: Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. e de <i>Listeria monocytogenes</i> e contagem de <i>Escherichia coli</i> e de bactérias sulfito redutoras ao longo do período de armazenamento.	29
Tabela 3: Efeito do tratamento na contagem de microrganismos a 30 °C do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão) (Log UFC g ⁻¹).	30
Tabela 4: Efeito do tratamento na Humidade, Proteína total e Gordura total do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).	31
Tabela 5: Efeito do tratamento no pH do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).	32
Tabela 6: Efeito do tratamento na atividade da água (a _w) do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).	32
Tabela 7: Efeito do tratamento no índice de peróxidos ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão) (mEq O ₂ kg ⁻¹ de gordura extraída).	35
Tabela 8: Efeito do tratamento nos parâmetros de coloração (L*, a* e b*) do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).	35
Tabela 9: Efeito do tratamento no teor de nitritos de bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão) (mg NaNO ₂ kg ⁻¹).	36
Tabela 10: Efeito do tratamento no teor de nitratos do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão) (mg NaNO ₃ kg ⁻¹).	37
Tabela 11: Efeito do tratamento no perfil de ácidos gordos do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).	38

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

a*	Vermelhidão
ANOVA	Análise de Variância
a _w	Atividade da água
b*	Amarelo
HPP	Altas Pressões Hidrostáticas
L*	Luminosidade
log	Logaritmo
MDA	Malondialdeído
MPa	Mega Pascal
NMP	Número mais provável
NP	Norma Portuguesa
rpm	Rotações por minuto
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UFC	Unidades formadoras de colónias
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultra Violeta

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Os produtos de transformação cárnea apresentam uma grande variedade de sabores, texturas e formas, como resultado da diversidade das matérias-primas, dos ingredientes e dos processos de fabrico utilizados.

O termo 'salsicharia' é mundialmente conhecido e engloba alguns produtos de transformação cárnea. Destes fazem parte não só os enchidos mas também todas as carnes curadas como os presuntos, as pás e o bacon. Em Portugal é utilizada, predominantemente, a carne de porco.

Os consumidores têm uma preferência crescente por produtos alimentares com aspeto idêntico ao produto fresco, saudáveis, minimamente processados, com aroma e sabor naturais e vida de prateleira prolongada. Na última década foram propostas tecnologias de conservação alternativas não térmicas, como processamento de altas pressões hidrostáticas (HPP), irradiação, pulsos de luz, conservantes naturais, complementadas com embalagens ativas (Aymerich *et al.*, 2008).

O método de alta pressão hidrostática possibilita o processamento do alimento à temperatura ambiente ou a temperaturas mais baixas, produzindo a transmissão uniforme da pressão sobre o alimento, independentemente da sua forma e tamanho, possibilitando o aumento da vida útil dos produtos e a melhoria da segurança alimentar por inativação microbiana (podendo atingir reduções decimais de 5 log.) (Torres e Velázquez, 2005).

Para além de inativarem bactérias vegetativas, as altas pressões hidrostáticas inativam enzimas, garantindo a preservação de vitaminas, aminoácidos e outros compostos de baixo peso molecular, que não são afetados pelas altas pressões, minimizando assim as alterações nas propriedades organolépticas e nutricionais dos alimentos (Patterson, 2005; Norton e Sun, 2008).

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a evolução das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais em bacon submetido a três tratamentos diferentes: Controlo (bacon fatiado embalado em atmosfera modificada); HPP (bacon fatiado embalado a vácuo e submetido a 600 MPa durante 10 min) e S/Nitr + HPP (bacon sem adição de nitritos/nitratos, fatiado, embalado a vácuo e submetido a 600 MPa durante 10 min) ao longo de 120 dias de conservação a 4 °C.

As características microbiológicas foram avaliadas em 3 períodos: Dia 0 (realizada no 1º dia de conservação), Dia 60 (realizada após 60 dias de conservação) e Dia 73 (realizada após 73 dias de conservação). As análises físico-químicas foram realizadas em 4 períodos, Dia 0, Dia 60, Dia 90 (realizada após 90 dias de conservação) e Dia 120 (realizada após 120 dias de conservação). A análise sensorial foi realizada em 2 períodos Dia 0 e Dia 60.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Produtos cárneos

Os produtos cárneos fumados e curados, principalmente de carne de porco, têm um enorme impacto na economia portuguesa e dos países do sudoeste europeu.

Com exceção de alguns países em desenvolvimento, onde a cadeia de refrigeração não está amplamente estabelecida, a fumagem ou a cura de um alimento tem como principal objetivo dotá-lo de características organolépticas diferenciadas de acordo com o modo de produção, a cultura gastronómica ou o território onde este é fabricado.

Os produtos cárneos são caracterizados por serem alimentos preparados total ou parcialmente com carne, subprodutos e gordura animal, possivelmente com adição de ingredientes de origem vegetal, de condimentos, de especiarias e de aditivos alimentares (Lidon e Silvestre, 2008).

Segundo Vandendriessche (2008), os produtos cárneos podem ser classificados conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação de produtos cárneos transformados (adaptado de Vandendriessche, 2008).

	Músculo Inteiro		Carne picada	
Sem tratamento térmico	I	Presunto Curado	II	Salsichas
Com tratamento térmico	III	Fiambre cozido	IV	Merenda de Carne

A maioria dos produtos processados de carne que existem no mercado encaixa numa destas quatro categorias. Consideram-se com tratamento térmico, produtos sujeitos a tratamento térmico que, durante o seu processamento atingem temperaturas superiores a 50 °C no seu âmago; ao contrário dos que não são submetidos a este tipo de tratamento, nos quais a temperatura se mantém abaixo do valor indicado e não há indício de qualquer tipo de desnaturação de proteínas miofibrilares da carne induzida pelo calor. Os produtos das categorias I e II têm um tempo de vida útil mais extenso devido a valores de a_w muito baixos obtidos por salga e secagem, ou efeito combinado da diminuição dos valores de a_w e pH (fermentação). Nas categorias III e IV a tecnologia de preservação é essencialmente o tratamento térmico, que contribui para a destruição de microrganismos patogénicos e esporos (Vandendriessche, 2008).

É importante desenvolver novos conceitos e tecnologias que permitam aumentar o valor comercial deste produtos e, paralelamente, dinamizar o setor sem descuidar os seus processos típicos de produção, a sua origem e as suas gentes.

2.1.1 - Produção de bacon

De acordo com NP 725:1969, entende-se por Toucinho Fumado (bacon), o preparado de salsicharia constituído exclusivamente pelas entremeadas de porco, tratadas por salga a seco ou por salmoura, e pelo fumo.

Os parâmetros físico-químicos (pH, humidade, lípidos, cinzas, proteínas), devido à natureza anatómica da matéria-prima, não têm valores regulamentados pela sua alta variabilidade, exceto os previstos na legislação de aditivos intencionais.

O processamento da carne suína para produção de bacon segue basicamente as etapas descritas na Figura 1.

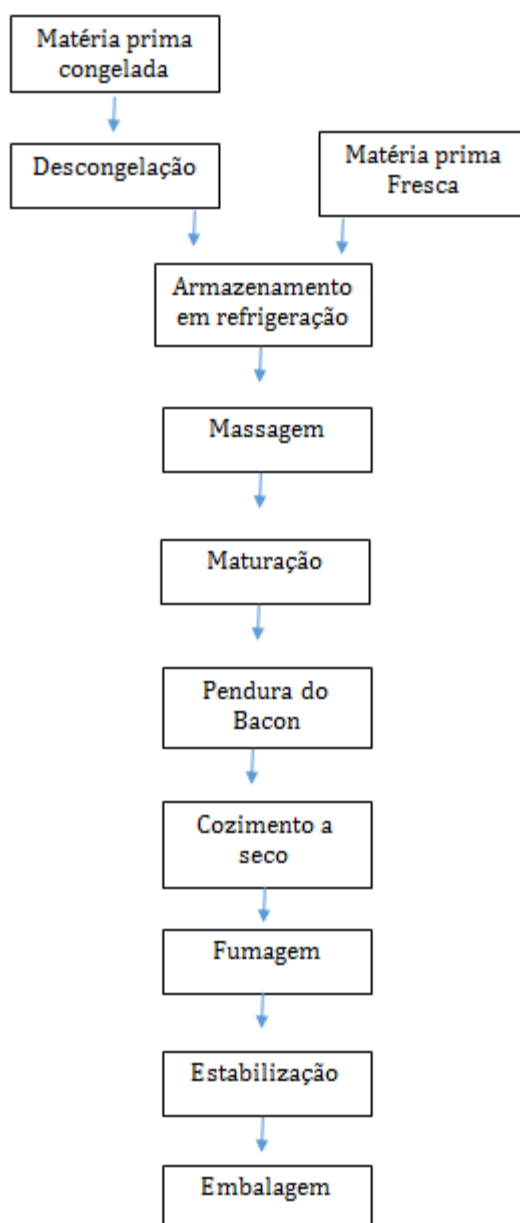


Figura 1: Fluxograma geral do processamento de bacon (Incarpo, 2014).

A matéria-prima utilizada é barriga suína, que deve ter parte de suas gorduras aparadas e apresentar uma camada fina de carne sem costelas.

A etapa subsequente consiste na massagem com injeção da salmoura, que é feita através de injetora com agulhas múltiplas com a finalidade de assegurar uma distribuição homogênea dos ingredientes de cura (cloreto de sódio, nitrito de sódio e nitrato de potássio) no interior das peças. Após a injeção da salmoura no produto, são adicionados os temperos e o produto é submetido à maturação

No processo de maturação ocorre a libertação do excesso de água das peças de bacon, a secagem do produto e a uniformização dos sais de cura na carne (1 a 3 dias). Decorrida a uniformização dos sais de cura no bacon, as peças são penduradas e cozidas sem humidade, à temperatura de 82 °C, até que a temperatura do centro térmico atinge 66 °C.

As peças seguem para a fumagem, que remove a humidade superficial e também contribui para o desenvolvimento da cor do produto, seguida de um período de estabilização.

Quando o produto estiver estabilizado segue para o fatiamento e embalagem a vácuo ou em atmosfera modificada, sendo posteriormente conservado a 4 °C.

2.1.2 - Nitritos e nitratos

Os nitritos são ingredientes básicos no fabrico de produtos cárneos. Há séculos que são conhecidos como excelentes agentes conservantes sais de rocha que contêm naturalmente baixos níveis de nitritos (Weiss *et al.*, 2010).

O processo de cura consiste no tratamento de carnes com sal, com conservantes como os nitritos e/ou nitratos e outros ingredientes, com o objetivo de conservar o produto, desenvolver e fixar a cor, melhorar o sabor e os aromas e aumentar o rendimento de produção (Faria *et al.*, 2001, Sebranek e Bacus, 2007, Weiss *et al.*, 2010). O uso de nitritos, na forma de sais de sódio ou de potássio, são conservantes permitidos que podem ser adicionados no processo de produção de produtos de salchicharia curados devido aos vários papéis que desempenha (Lidon e Silvestre, 2008).

Os nitritos inibem o crescimento de *Clostridium botulinum* e, assim, a formação da toxina botulínica (Sebranek e Bacus, 2007; Lidon e Silvestre, 2008).

Segundo Honikel (2008), os nitritos estão também envolvidos em várias reações químicas interativas que ocorrem nos produtos cárneos curados. Por se tratar de um composto muito reativo, os nitritos podem desempenhar o papel de agente oxidante, agente redutor ou ainda agente nitrosante (transferência de óxido nítrico).

Os nitritos também contribuem para a cor em carnes curadas através da formação de nitrosilmioglobina; contribuem para a estabilidade oxidativa dos lípidos onde os nitritos desempenham um papel antioxidante (Flores e Toldrá, 1993); contribuem para o desenvolvimento do sabor e do aroma típicos dos produtos cárneos curados, embora a formação e a identificação dos compostos voláteis responsáveis por tais características ainda não seja totalmente conhecida (Ramarathnam, 1998 *cit por* EFSA Journal, 2003).

Os nitratos, podem funcionar como um obstáculo ao crescimento de microrganismos patogênicos, atuando como antioxidantes (Feiner, 2006). São também agentes primários para o desenvolvimento da cor rosa desejada, devido à redução dos nitratos a nitritos por ação microbiana (*Lactobacillus* e *Micrococcus*) e contribuem para obter o sabor específico de produtos de salsicharia cozidos ou curados (Feiner, 2006; Vignolo *et al.*, 2010).

A cor, sabor, vida útil e segurança alimentar típicos de presunto, bacon e enchidos são amplamente reconhecidos pelos consumidores que esses nomes de produtos são considerados “padronizados” e “tradicionais” pelo USDA para a rotulagem do produto e não requer qualquer esclarecimento para comunicar as propriedades do produto esperados para os consumidores. Por outro lado, produtos semelhantes, mas elaborados sem nitrito ou nitrato, devem ser claramente identificados como “não curados”, isto porque as versões “não curadas” de produtos normalizados, como presunto, bacon e enchidos são significativamente diferentes dos produtos tradicionais (Sebranek e Bacus, 2007).

Tradicionalmente, produtos cárneos curados são caracterizados por adição de nitratos e/ou nitritos. Apesar de outros ingredientes, particularmente cloreto de sódio, serem essenciais nos produtos curados, são os nitratos/nitritos que lhes conferem as propriedades distintas (Sebranek e Bacus, 2007).

Independentemente dos benefícios tecnológicos, a redução no uso de nitritos tornou-se uma questão-chave para a indústria. Isso ocorre porque o nitrito pode, em certas circunstâncias (baixo pH e alta temperatura), reagir com aminas para formar nitrosaminas (Jakszyn e Gonzalez, 2006). Embora os níveis atualmente aprovados em produtos cárneos sejam consideradas seguros, continua a haver pressão por parte do consumidor para reduzir ainda mais ou eliminar o uso de nitrato (Weiss *et al.*, 2010).

Os nitratos são controversos, uma vez que poderão ser prejudiciais para a saúde do consumidor, estando diretamente relacionados com o aparecimento de neoplasias gástricas, devido à formação de nitrosaminas (Roncalés, 2007).

O nitrito de sódio (E-250), normalmente utilizado juntamente com o nitrato de potássio (E-252), apresentam, também, riscos para o consumidor, nomeadamente o risco de toxicidade aguda visto que é capaz de unir-se à mioglobina da mesma forma que se une à mioglobina da carne, formando metahemoglobina, substância incapaz de transportar o oxigénio (Ruiz de Huidobro *et al.*, 2005; Sebranek e Bacus, 2007).

A legislação em vigor sugere que, nos produtos à base de carne (com exceção dos produtos à base de carne esterilizados e dos produtos tradicionais à base de carne), a quantidade de nitrito adicionada poderá no máximo ser igual a 150 mg de NaNO₂/kg de peso (comercializado numa mistura com sal ou um substituto do sal) (DL 33/2008 de 25 de Fevereiro de 2008). Segundo estudos efetuados pelo Scientific Committee on Food no ano de 2007, neste tipo de produtos alimentares, a quantidade de nitrito presente é suficiente para a inibição do crescimento de *Clostridium botulinum*. A comunidade científica sugere que a verificação da quantidade de nitritos presentes nestes produtos cárneos seja determinada após o processo de massagem e imediatamente antes da aplicação de tratamento térmico (EFSA Journal, 2003; Comissão das Comunidades Europeias, 2007).

2.2 - Tecnologia de alta pressão hidrostática

2.2.1 - Desenvolvimento histórico da tecnologia de altas pressões

A alta pressão hidrostática, como método para conservar alimentos, é conhecida desde o século XIX, o seu estudo sistemático foi iniciado em 1899 por Bert Hite em leite, carne, frutas e vegetais (Télez-Luis *et al.*, 2001, Patterson, 2005). No entanto, estudos relacionados a essa tecnologia foram intensificados somente na década de 80 do século XX (Earnshaw, 1996).

A aplicação comercial de altas pressões está a aumentar de forma exponencial em todo o mundo. Mais de 80 % dos equipamentos presentes nas indústrias alimentares foram instalados a partir do ano 2000 (Balasubramaniam *et al.*, 2008; Jofré *et al.*, 2010).

Em 2009, cerca de 140 equipamentos de alta pressão foram instalados em 75 unidades fabris, tanto pequenas empresas como em grandes indústrias, verificando-se que cerca de 100 unidades fabris comercializaram produtos pressurizados, com uma produção de 250 000 toneladas de alimentos/ano, em que a produção anual de produtos cárneos foi 90 315 toneladas (Jung *et al.*, 2011).

Cerca de 55 % do equipamento para altas pressões encontra-se nos E.U.A, Canadá e México, países onde o tratamento não térmico tem enorme aceitação. Os restantes 45% estão distribuídos da seguinte maneira: 25 % em dez países europeus, com destaque para Espanha com o maior número de equipamentos, 15 % na Ásia (Japão, Coreia do Sul e China) e 5 % na Austrália e Nova Zelândia. Até ao momento, não há indícios da existência de equipamentos de altas pressões no continente africano (Jung *et al.*, 2011).

Nas indústrias alimentares, a maioria dos equipamentos para conservação em alta pressão destina-se a produtos vegetais (28 %) e a produtos cárneos (26 %) (Figura 2).

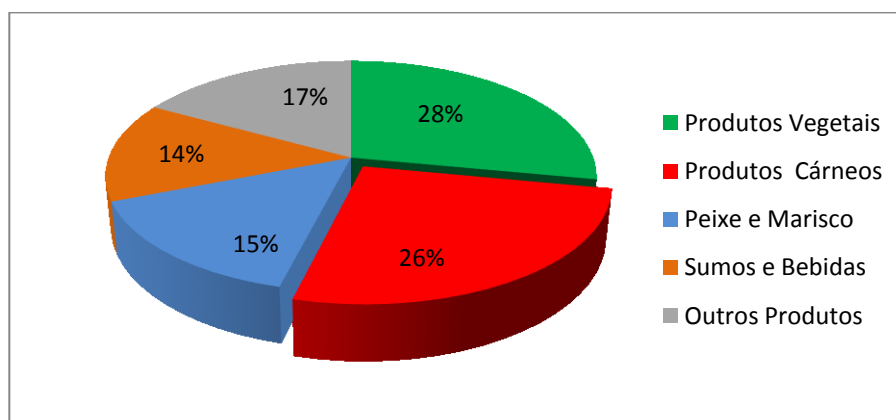


Figura 2. Distribuição de equipamentos de altas pressões nos diferentes sectores da indústria alimentar (Hyperbaric, 2013 cit. por Perés, 2013).

A comercialização dos alimentos sujeitos a altas pressões tem de estar de acordo com o Regulamento CE nº 258/97, de 27 de Janeiro, que define como novo alimento o que tenha sido objeto de um processo de fabrico não utilizado correntemente e que não apresenta um risco para o consumidor.

Embora esta técnica necessite de um investimento inicial elevado, ela é económica e tecnicamente viável, pois é caracterizada por uma poupança de energia, tendendo os custos de processamento a diminuir com o aumento da automatização do processo (Aymerich *et al.*, 2008; Norton e Sun, 2008; Garriga e Aymerich, 2009; Zhou *et al.*, 2010).

Graças aos avanços tecnológicos nos equipamentos, a aplicação industrial estende-se para uma gama de pressões de 100-800 MPa, dependendo do objetivo pretendido (Rendueles *et al.*, 2011).

2.2.2 - Princípios gerais

A pressão hidrostática é gerada por aumento da energia livre, que pode ser conseguido por compressão física durante o tratamento de pressão no sistema fechado por redução mecânica de volume. Normalmente a HPP é acompanhada por um aumento moderado da temperatura, aquecimento adiabático, que depende da composição do produto alimentar (Balasubramaniam *et al.*, 2004).

Há dois princípios operacionais fundamentais, subjacentes a HPP, o princípio de Le Chatelier e o princípio isostático. De acordo com o primeiro quando a pressão é aplicada a um sistema em equilíbrio, o sistema reage de modo a neutralizar a pressão aplicada. As reações que resultam em redução de volume vão ser promovidas pela alta pressão, tais reações podem resultar na inativação de microrganismos ou enzimas (Cheftel, 1995). O segundo princípio, princípio isostático, diz que quando os

produtos alimentares são comprimidos por pressão uniforme em todas as direções e, em seguida, retomam a sua forma original quando a pressão é liberada (Olsson, 1995). Os produtos são comprimidos, independentemente do seu tamanho e geometria, porque a transmissão de pressão para o núcleo não é dependente da relação massa/tempo (Cheftel, 1995), daí a HPP é também chamada de técnica de processamento isostático.

O mecanismo de altas pressões tem a capacidade de destruir microrganismos indesejáveis (incluindo os patogénicos) nos alimentos, de forma a aumentar a sua vida útil, dando primazia à segurança, mas deixa intactos as vitaminas e os compostos de baixo peso molecular (Garriga *et al.*, 2003; Norton e Sun, 2008).

A maior vantagem desta tecnologia é permitir que os alimentos sejam tratados à temperatura ambiente e conservem os parâmetros de qualidade do produto original (Garriga *et al.*, 2002).

2.2.3 - Descrição do processo HPP

No sistema descontínuo, os alimentos, que vão ser tratados por altas pressões, são embalados em recipientes de plástico esterilizados e flexíveis (tolerância até 15 % às reduções de volume), para resistirem às forças de compressão e permitirem que o alimento pressurizado mantenha a sua integridade física. As embalagens têm um papel importante na viabilidade do processamento não térmico, pois aumentam a durabilidade dos alimentos, permitindo não só a transmissão de pressão adequada aos alimentos, como uma boa capacidade de selagem. Após a libertação da pressão, as embalagens, normalmente de polietileno e polipropileno, recuperam o volume inicial (Min e Zhang, 2007).

Uma vez carregada com os produtos alimentares a serem pressurizados, a câmara é fechada. De seguida, o sistema de bombagem substituirá o ar da câmara pelo fluido de pressurização, normalmente água, até ficar completamente cheia, aplicando-se então uma pressão até ao nível que se pretende, ou seja, é exercida uma pressão que comprime a água ao redor do alimento, diminuindo o volume deste (Sangronis *et al.*, 1997).

Uma vez alcançada a pressão pretendida, uma válvula fecha o circuito permitindo a manutenção da pressão sobre o produto sem gastos energéticos adicionais. Como as propriedades físico-químicas da água são diferentes consoante a pressão aplicada, à temperatura ambiente (22 °C) o volume da água diminui 4 %, 12 % e 15 % por aplicações de pressões de 100 MPa, 400 MPa e 600 MPa, respectivamente (Cheftel e Culioli, 1997). O facto de o volume ser pouco comprimido torna o processo pouco perigoso, sempre que se usa água como meio de pressurização (Sangronis *et al.*, 1997).

Findo o período de processamento, a câmara é descomprimida, através da abertura da válvula permitindo que a água utilizada para a compressão se expanda e

volte à pressão atmosférica. O alimento tratado está então pronto para ser expedido e o equipamento está preparado para o começo de um novo ciclo (Sangronis *et al.*, 1997; Chawla *et al.*, 2011).

No sistema descontínuo, há uma prevenção de contaminação cruzada, uma vez que os alimentos são embalados e carregados no interior do vaso, sem ser necessária uma limpeza prévia entre as execuções, estando o alimento sujeito a pressão durante um determinado tempo, que é variável, dependendo do tipo de alimento e a da temperatura de processamento (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

Nos sistemas semicontínuos utilizados para tratar alimentos líquidos não embalados, a pressão é exercida diretamente no produto através de um pistão móvel, que é utilizado para aumentar a compressão. Após este processo, o produto é embalado assepticamente (Chawla *et al.*, 2011).

2.2.4 - Fatores que influenciam a eficácia da aplicação de altas pressões hidrostáticas e seus efeitos nos alimentos

A eficácia do tratamento por altas pressões é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos, como a pressão aplicada e a taxa de despressurização, o tempo de tratamento e a temperatura. Além disso, fatores como o efeito da pressão na água, o aquecimento adiabático, a dissipação do calor, a composição do alimento e o estado físico dos microrganismos a serem inativados têm também efeito na produção de alimentos seguros e de qualidade (Rendueles *et al.*, 2011).

O processamento de alta pressão compreende uma combinação de três fatores (Pressão × Temperatura × Tempo), sendo denominado um sistema tridimensional, em detrimento dos tratamentos térmicos que apenas são função da Temperatura × Tempo (sistema bidimensional).

A eficácia da inativação microbiana, pela aplicação das altas pressões depende de uma série de fatores, como:

- Tempo, temperatura de processamento e pressão aplicada;
- Tipo de microrganismos e características das estirpes (dado que as bactérias Gram-positivas são mais resistentes do que as bactérias Gram-negativas);
- Morfologia da célula bacteriana (os cocos são mais resistentes à pressão do que os bacilos);
- Estádio de crescimento dos microrganismos (os microrganismos na fase estacionária são mais resistentes ao efeito da pressão do que as bactérias que se encontram numa fase exponencial do seu crescimento) (Cheftel e Culioli, 1997; Pereda *et al.*, 2005; Aymerich *et al.*, 2008);
- Matriz alimentar: quanto mais nutritivo é o alimento, maior é a capacidade de sobrevivência dos microrganismos às altas pressões, pelo que, os produtos cárneos transformados, sendo ricos do ponto de vista nutritivo, apresentam um efeito protetor;

- Associação da tecnologia de altas pressões com outros tratamentos físico-químicos (ultravioleta, ionização, radiação) (Demazeau e Rivalain, 2011).

O processamento de altas pressões (a temperaturas baixas ou moderadas) causa a destruição e inativação de células microbianas vegetativas, conservando as características nutricionais (vitaminas e nutrientes dos alimentos) e sensoriais (cor, odor e sabor) dos produtos alimentares, sem a necessidade de recorrer a tratamentos térmicos (Patterson, 2005; Aymerich *et al.*, 2008; Garriga e Aymerich, 2009; Bover-Cid *et al.*, 2010; Yordanov e Angelova, 2010; Demazeau e Rivalain, 2011).

Mediante a aplicação de altas pressões hidrostáticas, as ligações covalentes dos componentes químicos, que têm baixa compressibilidade, mantêm-se inalteradas e não são quebradas, dentro de intervalos de pressão estipulados, verificando-se que a estrutura primária das proteínas, hidratos de carbono e moléculas de baixo peso molecular nos alimentos (responsáveis pela manutenção das características sensoriais e nutricionais) permanecem intactas. A maioria das vitaminas e aminoácidos não é modificada nos alimentos frescos (Lamballerie-Anton *et al.*, 2002).

As ligações de hidrogénio, responsáveis pela manutenção da estrutura helicoidal das proteínas são fragilizadas pela ação da pressão, como resultado da diminuição do volume (Cheftel e Culioli, 1997; Rendueles *et al.*, 2011), podendo originar a desnaturação das proteínas, sendo as moléculas de elevado peso molecular sensíveis à pressão, como é o caso das proteínas e hidratos de carbono, resultando em alterações nas suas funções (Butz e Tauscher, 2002; Norton e Sun, 2008).

Como consequência da rutura das ligações de hidrogénio, responsável pelo enrolamento da cadeia peptídica, a estrutura secundária das proteínas é modificada a pressões de 300- 700 MPa e a estrutura terciária deste composto sofre mudanças acima dos 200 MPa enquanto a estrutura quaternária é mantida pelas interações hidrofóbicas entre os componentes, sendo muito sensível à pressão e normalmente dissociada a pressões inferiores a 150 MPa (Hendrickx *et al.*, 1998; Murchie *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2007; Yordanov e Angelova, 2010; Rendueles *et al.*, 2011).

2.2.4.1 - Efeito sobre os microrganismos

A membrana dos microrganismos é composta por uma bicamada, uma externa ou hidrófila (formada por ácidos gordos) e uma interna ou hidrofóbica (formada por glicerol). A pressão exercida sobre a célula microbiana causa redução do volume, afetando a permeabilidade da membrana e originando danos ou morte celular

A pressão não inibe ou destrói uma função celular específica mas interfere numa combinação de processos, que são reversíveis a baixas pressões (<200 MPa) mas irreversíveis a altas pressões (>300 MPa). Assim, a morte celular resulta de múltiplos danos que ocorrem no interior da célula, como a destabilização estrutural e a integridade funcional da membrana citoplasmática, a desnaturação das proteínas e a inibição de mecanismos genéticos (Hugas *et al.*, 2002).

A membrana celular é o componente da célula mais afetado pelas altas pressões (Hugas *et al.*, 2002; Patterson, 2005; Aymerich *et al.*, 2008). A sua fluidez tem grande importância na inativação por pressão, verificando-se que, quanto mais rígida é a membrana, maior é a resistência à pressão (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

Por outro lado, a tecnologia de altas pressões provoca alterações na atividade de enzimas responsáveis pelo crescimento de microrganismos, diferindo as enzimas na sua capacidade de suportar a pressão (Pereda *et al.*, 2005; Patterson, 2005; Rendueles *et al.*, 2011).

No entanto, um tratamento de alta pressão nem sempre inativa completamente os microrganismos presentes no alimento, podendo alterar uma proporção de bactérias, que podem ser recuperadas após o tratamento. O recurso a agentes antimicrobianos, como ácidos orgânicos, lisozinas ou bacteriocinas, após o tratamento a alta pressão pode controlar a proliferação dessas bactérias (Patterson, 2005).

Quase todos os microrganismos podem crescer até valores de 20-30 MPa. Os que sobrevivem a pressões mais altas (40-50 MPa) são denominados de barófilos, sendo os barófilos incapazes de crescer a pressões de 30-40 MPa, e os que crescem num intervalo 1-50 MPa são euribáricos. Os microrganismos barodúricos sobrevivem a pressões de 50- 200 MPa, mas não podem crescer. As altas pressões produzem danos sub-letais nas células microbianas que após um período de adaptação podem-se recuperar e multiplicar de novo no alimento, o que tem importância na eficácia do tratamento (Cheftel e Culioli, 1997; Pereda *et al.*, 2005).

A barotolerância dos microrganismos presentes num determinado alimento depende do pH, da a_w e da presença de outros constituintes (sal e açúcar).

O pH dos alimentos é um dos fatores que afeta o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos, considerando que todas as bactérias têm um pH ótimo, favorável ao seu crescimento (Norton e Sun, 2008).

O tratamento por altas pressões é caracterizado por alterar o pH do meio, diminuindo-o, uma vez que favorece a ionização de ácidos orgânicos (agentes inibidores do crescimento microbiano) presentes na forma dissociada (Téllez-Luis *et al.*, 2001; Moerman *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2008; Bover-Cid *et al.*, 2010).

O pH do meio não só garante a inativação da flora microbiana durante o tratamento com altas pressões, como inibe o crescimento das células danificadas pela pressão (Patterson, 2005).

Em geral, verifica-se que um pH ácido aumenta a sensibilidade dos microrganismos às altas pressões. Contudo, há que ter em conta que bolores e leveduras são resistentes a baixo pH e dificilmente são inativados pela pressão a pH inferior a 4,0 (Pereda *et al.*, 2005).

Altas pressões combinadas com um baixo pH permitem a diminuição da viabilidade de células pressurizadas de muitos patogénicos, como a *Listeria monocytogenes*. A modificação do pH deve ser determinada para cada processo e para cada tipo de alimento (Jofré *et al.*, 2010).

A água no estado líquido é essencial para o crescimento de todos os organismos vivos. A quantidade de água disponível para o crescimento microbiano é geralmente expressa em a_w (Norton e Sun, 2008).

A redução da a_w tem um efeito baroprotetor sobre os microrganismos, ou seja, baixos valores de a_w conferem proteção às células microbianas contra a tecnologia de altas pressões hidrostáticas (Garriga *et al.*, 2004; Aymerich *et al.*, 2008; Yordanov e Angelova, 2010; Demazeau e Rivalain, 2011). Defende-se que uma a_w reduzida provoca uma atrofia celular e um espessamento da membrana celular, reduzindo o tamanho da célula com conseqüente aumento da tolerância. Assim, valores inferiores a 0,90 conferem um efeito baroprotetor independentemente dos solutos (sacarose, glucose ou NaCl) que são utilizados para reduzir a_w do produto (Rendueles *et al.*, 2011).

Diversos estudos verificaram o efeito baroprotetor da a_w dos microrganismos submetidos a altas pressões. Por outro lado, microrganismos danificados por pressão são geralmente mais sensíveis a baixa a_w e a sua recuperação pode ser inibida por esta (Hugas *et al.*, 2002; Marcos *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2007b; Ruiz-Capillas *et al.*, 2007; Hayman *et al.*, 2008; Porto-Fett *et al.*, 2010; Hereu *et al.*, 2011).

A composição do substrato influencia a resposta dos microrganismos à pressão a que estão sujeitos, adotando comportamentos distintos em diferentes alimentos. Alimentos ricos em hidratos de carbono, proteínas e lípidos têm um efeito protetor na inativação bacteriana, aumentando a resistência microbiana à pressão (Patterson, 2005; Garriga e Aymerich, 2009; Rendueles *et al.*, 2011).

A carne é um alimento rico do ponto de vista nutritivo, permitindo, assim, o aumento da resistência dos microrganismos quando é aplicada a técnica de altas pressões hidrostáticas (Aymerich *et al.*, 2008).

Molina-Hoppner *et al.* (2001) e Hereu *et al.* (2011) constataram que, para além do teor de gordura, o conteúdo em sal do produto tem um efeito baroprotetor, preservando a integridade da membrana celular.

Relativamente ao tipo de microrganismos verifica-se que as bactérias Gram-positivas são mais resistentes à pressão em comparação com as bactérias Gram-negativas, fungos e leveduras. Os esporos são os mais resistentes pois apenas são inativados a pressões superiores a 1000 MPa. Os vírus são muito heterogêneos e a sua resistência à pressão varia consideravelmente, sendo os poliovírus os mais resistentes (Fonberg-Broczek *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2007a; Escriu e Mor-Mur, 2009; Clariana *et al.*, 2011).

A sensibilidade aos agentes externos, como por exemplo as altas pressões, por parte das bactérias Gramnegativas pode ser explicada pela complexidade da membrana celular destes organismos, tornando-os mais suscetíveis a mudanças ambientais causadas pela pressão (Murchie *et al.*, 2005; Aymerich *et al.*, 2008). As diferenças na composição química e nas propriedades estruturais da membrana celular dos microrganismos determinam as diferenças na resistência a altas pressões (Rendueles *et al.*, 2011). A pressão também afeta outras estruturas celulares, como mitocôndrias e citoplasma.

O tratamento de altas pressões previne o crescimento de *Enterobacteriaceae* (*Salmonella* spp. e *Escherichia coli*), dado estas serem Gramnegativas (Garriga e Aymerich, 2009). Os organismos com maior grau de organização e complexidade estrutural são mais sensíveis à ação das altas pressões. Assim, os procariotas são normalmente mais resistentes à pressão que estruturas eucariotas. As leveduras estão entre os organismos mais sensíveis e os esporos entre os mais resistentes (Patterson, 1999).

Os microrganismos psicotróficos, que crescem a baixas temperaturas e contêm elevados níveis de ácidos gordos polinsaturados, são normalmente mais resistentes à pressão, confirmando que o fluido da membrana, rico em ácidos gordos insaturados, é responsável pela resistência a efeitos letais da tecnologia de altas pressões (Rendueles *et al.*, 2011).

A flora microbiana endógena dos alimentos é, também, mais resistente à pressão do que os microrganismos utilizados como starters (Cheftel e Culioli, 1997; López-Caballero, 2002).

2.2.4.2 - Fatores relacionados com o processo tecnológico

Regra geral, temperaturas de processamento, tempo e pressão mais elevados, significam maior número de microrganismos inativados. Normalmente, a inativação de bactérias por efeito da pressão segue uma cinética de primeira ordem, embora em alguns casos se observem desvios de reações, transformando-se numa de segunda ordem (Sangronis *et al.*, 1997). Tal depende, sobretudo, da temperatura a que se dá o processo. A taxa de inativação microbiana, com o tratamento de altas pressões, realizada à temperatura ambiente, pode ser menor do que no processo que ocorre a temperaturas maiores ou menores que 20 °C (Rendueles *et al.*, 2011).

O aumento da inativação microbiana a temperaturas de refrigeração, ocorre com um decréscimo da resistência à pressão em células vegetativas a baixas temperaturas (<5 °C), devido a mudanças na estrutura da membrana plasmática, ruturas das ligações hidrofóbicas e cristalização dos fosfolípidos (Rendueles *et al.*, 2011). Por outro lado, o emprego de temperaturas muito elevadas (40-60 °C) aumenta a inativação de microrganismos patogénicos, mas pode provocar modificações indesejáveis nas propriedades organolépticas dos produtos (Patterson, 2005).

Temperaturas de congelamento (-20 °C) em tratamentos com pressões de 100 a 400 MPa, durante 20 min aumentam a inativação microbiana, face a produtos pressurizados a 20 °C, confirmando a eficácia da tecnologia de altas pressões na inativação bacteriana quando as temperaturas são negativas (Rivalain, 2009 citado por Demazeau e Rivalain, 2011).

A nível industrial, é difícil o controlo da temperatura de processamento. Os alimentos são colocados em grandes câmaras, podendo sofrer aquecimento adiabático como consequência da compressão, com aumento de 3 °C da água por cada 100 MPa. Por outro lado, a gordura aumenta 8-9 °C e as proteínas e hidratos de carbono um valor intermédio por cada 100 MPa (Balasubramaniam *et al.*, 2008).

De acordo com a Figura 3, é possível observar o efeito da pressão e da temperatura durante o processamento de altas pressões. A temperatura do alimento (T1-T2) aumenta como resultado da compressão física (P1-P2), enquanto, a temperatura do produto (T2-T3) durante a ação da pressão (P2-P3), é independente da taxa de compressão, verificando-se que as trocas de calor entre o produto e o ambiente que o rodeia são insignificantes. Visto tratar-se de um sistema adiabático, o produto retoma, após a descompressão (P3-P4), a temperatura inicial. Mas, na prática, a temperatura final do produto (T4) é ligeiramente inferior à inicial (T1), como resultado das perdas de calor que ocorrem durante a fase de compressão (Balasubramaniam *et al.*, 2008; Yordanov e Angelova, 2010). O que se pretende é que as variações de temperatura sejam minimizadas por meio de trocas térmicas entre a água, o produto alimentar e o equipamento (Cheftel e Culioli, 1997).

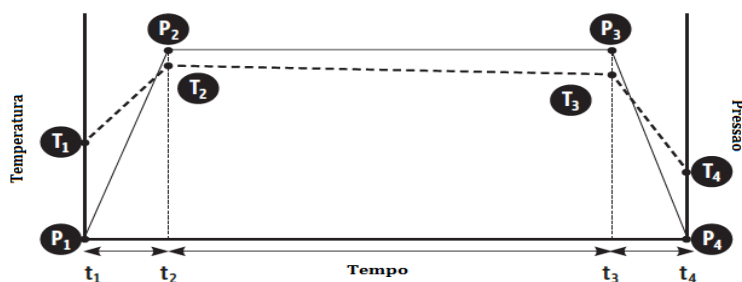


Figura 3: Evolução da Temperatura e Pressão durante o processamento de altas pressões (Balasubramaniam *et al.*, 2008; Yordanov e Angelova, 2010; Nguyen e Balasubramaniam, 2011). T1-Temperatura inicial do alimento. T2-Temperatura do alimento após pressurização. T3-Temperatura do alimento após um determinado período de pressurização. T4- Temperatura final do alimento, após descompressão do equipamento. P1-Pressão inicial. P2-Pressão após compressão. P3-Pressão do alimento antes da descompressão. P4- Pressão após despressurização.

Para que o processo seja otimizado, os ciclos de pressurização\despressurização devem ser efetuados num curto espaço de tempo (< 10 min), uma vez que este se reflete no rendimento (Nguyen e Balasubrananiam, 2011).

Assim, verifica-se que, para alcançar um determinado objetivo de inativação, é preferível aumentar a intensidade da pressão e reduzir o mais possível o tempo de tratamento (Bover- Cid *et al.*, 2010).

2.2.5 - Efeito sobre os componentes dos alimentos

A desnaturação das proteínas pela pressão é um fenómeno complexo que depende da estrutura da proteína, do intervalo de pressão, da temperatura, do pH e da composição do solvente (Marques *et al.*, 2007; Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera, 2009). Geralmente a estrutura primária não é modificada pela pressão, já as estruturas secundária e terciária, são modificadas a uma pressão de 200 MPa (Lamballerie-Anton *et al.*, 2002). As estruturas oligoméricas são dissociadas a pressões relativamente baixas (200 MPa), sendo as proteínas rapidamente desnaturadas a pressões compreendidas entre 400-600 MPa (Han, 2007).

A baixas pressões, as proteínas são desnaturadas a temperaturas mais reduzidas, enquanto com altas pressões a desnaturação proteica não aumenta com a temperatura. A tecnologia de altas pressões permite a ativação ou a inativação enzimática, dependendo das proteínas (Marques *et al.*, 2007; Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera, 2009), podendo a inativação enzimática ser atribuída a uma alteração na estrutura intermolecular ou a mudanças na conformação da enzima.

Baixas pressões (100 MPa) permitem a ativação de algumas enzimas monoméricas (Hendrickx *et al.*, 1998). Por outro lado, altas pressões induzem, geralmente, a inativação de enzimas, que pode ser reversível a pressões de 100-300 MPa, dependendo do grau de distorção da molécula. Com pressões superiores a 300 MPa, a reativação das enzimas diminui, como consequência das alterações moleculares (Ferreira *et al.*, 2008).

Tanto a ativação como a inativação enzimática têm uma forte influência na qualidade dos produtos alimentares (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

O estado físico dos lípidos, juntamente com as proteínas das membranas celulares, desempenha um papel fulcral na atividade das enzimas, havendo evidências de que a pressão tende a diminuir o contacto entre as enzimas associadas e a superfície da membrana, como consequência de mudanças do estado físico dos lípidos que controlam a atividade enzimática (Regueiro *et al.*, 2008).

2.2.6 - Alterações na cor

Segundo Mor-Mur e Yuste (2003), a carne fresca e produtos derivados podem sofrer modificações na coloração quando submetidos ao processo de HPP, dependendo das condições de processo aplicadas (pressão, tempo e temperatura), devido a possíveis mudanças na mioglobina, tais como desnaturação da globina, liberação do grupo heme e oxidação do átomo de ferro. Como resultado, a cor da carne torna-se mais clara devido à coagulação da proteína causada pela pressurização, que afeta as propriedades de estrutura e superfície dos produtos com aumento na relação luz refletida: luz absorvida. Ainda segundo outros autores (Carlez *et al.*, 1995; Goutefongea *et al.*, 1995; Cheftel e Curioli, 1997; Tanzi *et al.*, 2004; Andrés *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2007), quando produtos cárneos são cozidos antes de

serem submetidos ao processo de HPP, há formação do composto estável nitrosohemocromo, que não é afetado pela HPP. Goutefongea *et al.* (1995) pressurizaram presunto cozido e constataram que a cor não sofreu mudanças significativas durante a vida de prateleira deste produto. Serra *et al.* (2007), em pesquisa realizada com presunto suíno, verificaram que a pressurização não afetou os parâmetros de L^* e a^* em amostras pressurizadas em comparação com amostras controle.

Produtos cárneos que não são adicionados de nitrito e submetidos ao processo de HPP podem sofrer mudanças significativas na sua coloração. Tanzi *et al.* (2004) em pesquisa realizada com presunto de Parma (produto ausente de nitrito) constataram um decréscimo na intensidade visual da cor desse produto após a pressurização. Similarmente, Andrés *et al.* (2006) reportaram um aumento na luminosidade nas amostras de presunto ibérico pressurizado. Serra *et al.* (2007) relataram que mudanças na coloração durante a vida de prateleira de presuntos pressurizados podem ser devido à oxidação do composto nitrosohemocromo. Segundo Gandemer (2002), o conteúdo de lípidos (especialmente ácidos gordos insaturados) presente em produtos cárneos (por exemplo, presunto) afetou fortemente os parâmetros de cor. Assim, segundo estes autores, enquanto os valores de intensidade de vermelho (a^*) e de luminosidade (L^*) decresceram em presunto fatiado embalado a vácuo e submetido ao processo de HPP, a oxidação lipídica aumentou ao longo da vida de prateleira.

2.2.7 - Aplicação de tratamentos combinados

A tecnologia de altas pressões, por si só, poderá não ser um processo suficientemente seguro. Assim, é necessária a aplicação de determinadas condicionantes ao crescimento microbiano, possível através da combinação do método de altas pressões com diferentes processos ou fatores antimicrobianos (Patterson, 1999; Garriga e Aymerich, 2009).

A aplicação do método de altas pressões e de obstáculos adicionais (como a utilização de bactérias ácido lácticas ou os compostos produzidos por estas: as bacteriocinas) exercem um papel fundamental na conservação dos enchidos fermentados e secos, uma vez que funcionam como barreiras físico-químicas no controlo de microrganismos patogénicos, assegurando a qualidade destes produtos (Hugas *et al.*, 2002; Garriga e Aymerich, 2009).

As bacteriocinas são polipéptidos ribossomais produzidos pelas bactérias, capazes de matar ou inibir o crescimento de bactérias indesejáveis. Apesar de terem sido testadas várias bacteriocinas, a nisina é a única a ser utilizada como aditivo alimentar (embora não seja aplicada em produtos cárneos) pois é eficaz contra o crescimento de patogénicos Gram-positivos, garantindo, assim, a obtenção de produtos estáveis e seguros (Aymerich *et al.*, 2008).

Para além das bacteriocinas, outros fatores limitativos do crescimento microbiano são um baixo valor de pH, pois aumenta a sensibilidade das bactérias à ação das altas pressões (Patterson, 2005; Norton e Sun, 2008); a adição de ácidos carboxílicos para a conservação dos alimentos (Rendueles *et al.*, 2011); e as embalagens ativas, que possuem a capacidade de controlar o crescimento de agentes patogénicos em alimentos prontos a consumir, aumentando o tempo de vida útil e melhorando a segurança do alimento ou as propriedades sensoriais do mesmo (Jofré *et al.*, 2010; Aymerich *et al.*, 2008; Garriga e Aymerich, 2009). A combinação da embalagem ativa com a tecnologia de alta pressão pode ser considerada como uma técnica alternativa para o aumento da eficácia dos compostos antimicrobianos, cuja atividade poderá ser reduzida pela interação com a matriz alimentar (Garriga e Aymerich, 2009).

Por seu lado, a pressurização favorece a ionização dos ácidos orgânicos, que são considerados agentes inibidores do crescimento bacteriano na sua forma não dissociada (Pereda *et al.*, 2005). Diez *et al.* (2008) constataram que a combinação de ácidos orgânicos com a tecnologia de alta pressão inibe a ativação microbiana, permitindo a manutenção das características organolépticas dos enchidos fermentados e secos (morcela de Burgos) por um longo período de tempo.

Pode-se, então, concluir que elevados efeitos sinérgicos antimicrobianos são alcançados pela conjugação da tecnologia de alta pressão com o calor, baixo pH, dióxido de carbono, ácidos orgânicos, bacteriocinas como as nisinas, embalagem a vácuo e armazenamento refrigerado (Garriga e Aymerich, 2009).

2.2.8 - Aplicação da HPP na indústria de produtos cárneos

A matriz da carne é um substrato rico do ponto de vista nutritivo, sendo constituído principalmente por água, proteína, gordura, oligonutrientes e vitaminas (sobretudo as do grupo B), criando um ambiente favorável para a proliferação de microrganismos (Hugas *et al.*, 2002).

Os produtos cárneos transformados e secos, prontos para o consumo, podem representar um risco para a saúde humana, uma vez que os agentes patogénicos podem crescer ou simplesmente sobreviver no substrato como resultado de uma possível contaminação cruzada que surge após as etapas de processamento, devido às manipulações a que são sujeitos. Contudo, um tratamento adicional com altas pressões hidrostáticas, após processamento, é eficaz na destruição deste tipo de microrganismos (Garriga e Aymerich, 2009).

Garriga *et al.* (2004) avaliaram o tratamento de altas pressões (600 MPa, 6 min, 31 °C) no presunto curado fatiado e embalado a vácuo, observando que este tratamento reduziu a contagem de microrganismos a 30 °C em 2 log. Estes autores submetem ao mesmo tratamento de altas pressões, lombo bovino marinado, verificando reduções de 4 log nos microrganismos a 30 °C. Estas amostras acusaram presença de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em 25 g na maioria das amostras não tratadas no

tempo 0, (carne contaminada no matadouro, maneoio ou armazenamento refrigerado inadequado). Em amostras submetidas a HPP, o número de sobreviventes permaneceu inalterados e abaixo do limite de deteção ($< 10^2$ UFC g⁻¹) durante todo o período de armazenamento (120 dias), enquanto que as amostras não tratadas atingiu 10^8 UFC g⁻¹ após 30 dias de armazenamento.

Hereu *et al.* (2011) constataram que a aplicação de pressões de 600 MPa durante 5 min a 15 °C em presunto curado seco garantiu a redução de *Listeria monocytogenes*.

Garriga *et al.* (2003) analisaram o tratamento em produtos de salsicharia fermentados e secos (fuet e chouriço) no início da fase de maturação (300 MPa, durante 10 min, a 17 °C) e no fim do processo (400 MPa, durante 10 min a 17 °C), constatando que a tecnologia é mais eficaz no fim da maturação, uma vez que é possível a manutenção de características sensoriais do produto e a inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis, como *Salmonella spp.* Contudo, não é totalmente eficaz no controlo de *Listeria monocytogenes*.

Ruiz-Capillas *et al.* (2007) verificaram que os níveis de aminas biogénicas (putrescina, cadaverina e tiramina) eram reduzidos no chouriço espanhol fermentado seco, quando submetido à ação da pressão a 350 MPa durante 15 min a 20 °C.

O tratamento por altas pressões leva a mudanças na estrutura das proteínas miofibrilares, com a despolimerização como o principal efeito (Suzuki *et al.*, 2006 citado por Campus *et al.*, 2008).

Fuentes *et al.* (2010) e Clariana *et al.* (2011) encontraram forte estabilidade lipídica em amostras de produtos cárneos secos tratadas a 600 MPa durante 6 min. O mesmo sucedeu com Campus *et al.* (2008) ao analisarem amostras tratadas a 300-400 MPa durante 10 min, armazenadas à temperatura de refrigeração durante 45 dias. Andrés-Nieto *et al.* (2004) não observaram diferenças significativas nos valores de oxidação lipídica entre amostras tratadas a 400 MPa, durante 15 min, e não tratadas.

Cava *et al.* (2009) mostraram que, depois do tratamento do presunto ibérico com altas pressões (200/300 MPa durante 15/30 min), a oxidação lipídica das amostras aumentou mas depois de um período de armazenamento de 90 dias, os valores de oxidação lipídica foram similares tanto nas amostras tratadas como nas não tratadas. Quanto à oxidação das proteínas, não foram observadas diferenças significativas neste estudo.

Regueiro *et al.* (2008) constataram que a composição de ácidos gordos na carne não sofre alterações pela ação da pressão, não apresentando grande influência sobre a oxidação lipídica.

Clariana *et al.*, 2011 não encontraram diferenças significativas no teor de proteína em presunto curado sujeito a 600 MPa por 6 min.

Cava *et al.* (2009) encontraram um aumento na oxidação de proteínas, após 90 dias de armazenamento refrigerado, tanto presunto curado não pressurizado como pressurizado a 200 MPa por 30 min.

Outros autores não encontraram diferenças na humidade ou no teor de gordura em presunto curado pressurizado a 600 MPa/3-6 min (Fulladosa *et al.*, 2009; Serra, *et al.*, 2007).

A aplicação de 400 MPa durante 10 min a 20 °C em lombo curado provocou alterações na atividade das catepsinas e aminopeptidases levando a uma diminuição de cerca de 20 % de sua atividade inicial (Campus *et al.*, 2008).

A tecnologia de altas pressões tem, assim, elevado potencial de aplicação nos produtos cárneos, como método de conservação, sendo utilizada não só para melhoria da higiene do produto, mas também para aumentar a sua durabilidade, minimizando-se alterações nas propriedades sensoriais do mesmo (Garriga e Aymerich, 2009).

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. - Obtenção das amostras

Foram utilizadas amostras de bacon obtido a partir de barriga de suíno, em embalagem com 150 g de produto. Estas foram divididas em três grupos, embaladas em atmosfera modificada, embaladas a vácuo e bacon sem nitritos embaladas a vácuo. Estas foram transportadas em caixas isotérmicas com placas de gelo até ao CICYTEX, onde foram submetidas a alta pressão.

As amostras foram mantidas em temperatura de refrigeração (4 °C) durante o período de conservação.

3.2. - Delineamento experimental

Foram obtidas 105 amostras de bacon (45 amostras por grupo) divididas em três tratamentos com três repetições por tratamento:

1 - Controlo (embalado em atmosfera modificada (60 % Azoto e 40 % CO₂) e sem tratamento HPP) (Este tratamento reflete as condições em que a empresa comercializa o bacon);

2 - HPP (embalada a vácuo e pressurizada a 600 MPa durante 10 min);

3 - S/Nitr + HPP (bacon sem adição de nitritos embalada a vácuo e pressurizada a 600 MPa durante 10 min).

As análises microbiológicas foram realizadas em 3 períodos, Dia 0 (realizada no 1º dia de conservação), Dia 60 (realizada após 60 dias de conservação) e Dia 73 (realizada após 73 dias de conservação) de acordo com o cronograma seguinte:

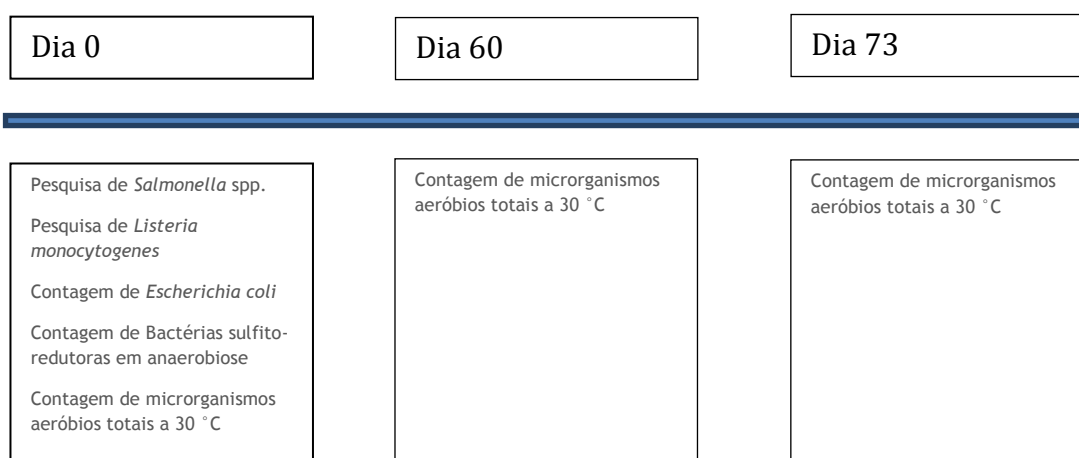


Figura 4: Cronograma de realização das análises microbiológicas.

As análises físico-químicas foram realizadas em 4 períodos, Dia 0, Dia 60, Dia 90 (realizada após 90 dias de conservação) e Dia 120 (realizada após 120 dias de conservação). Os parâmetros analisados em todas as datas foram: pH, Humidade, Proteína Total, Gordura Total, a_w , Cor, Índice do Ácido tiobarbitúrico (TBA), Índice de Peróxidos, Teor em Nitritos e Nitratos e Perfil em Ácidos Gordos.

A análise sensorial foi realizada em 2 períodos Dia 0 e Dia 60. Foi realizada uma Prova de Intenção de Compra e uma Prova de Ordenação.

3.3. - Processamento a alta pressão

A pressurização das amostras foi realizada no INTAEX em Badajoz utilizando um equipamento Hyperbaric Wave 600/55 com pressão máxima de 600 Mpa e capacidade para 55 L (Figura 5).

Todas as amostras dos tratamentos HPP e S/Nitr + HPP foram colocadas dentro de um cilindro perfurado e submetidas a pressão de 600 MPa durante 10 min. O tratamento Controlo, embalado em atmosfera modificada, não foi submetido a altas pressões.



Figura 5: Equipamento de Altas Pressões Hidrostáticas (Hyperbaric Wave 600/55).

3.4. - Análises Microbiológicas

No Dia 0 realizou-se a pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* (de acordo com o Regulamento (CE) N^o 2073/2005) e a contagem de *Escherichia coli* e de Bactérias sulfito redutoras em anaerobiose em 5 amostras e a contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C em 3 amostras. Efetuou-se posteriormente, no Dia 60 e Dia 73 a contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C em 3 amostras.

3.4.1 Preparação da amostra

A amostra para análise obteve-se pela recolha, com os devidos cuidados de assepsia, de algumas fatias da embalagem de bacon que se picaram e pesaram em recipiente adequado e esterilizado. Adicionou-se água peptonada tamponada (Merck, Alemanha) para obter uma proporção de 1/10 e procedeu-se à homogeneização a 320 rpm durante 1 min num homogeneizador peristáltico Stomacher 400 circulator.

3.4.2. - Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi efetuada através de teste imunoenzimático que permite a deteção de antigénios específicos pelo método ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), com o sistema automatizado multiparamétrico de imunoanálise (VIDAS *bioMérieux*), utilizando o método *Easy Salmonella* que tem uma performance equivalente à da norma ISO 6579:2002 e certificado com a AFNOR Validation (Nº BIO 12/16-09/05).

Efetou-se o pré-enriquecimento em 25 g de amostra num saco tipo Stomacher, adicionando água peptonada tamponada (*bioMérieux*) numa proporção de 1/10. Procedeu-se à incubação a 37 ± 1 °C durante 16 a 22 h.

O enriquecimento foi efetuado após a incubação, transferindo 0,1 ml da suspensão para 10 ml de caldo SX2 (*bioMérieux*) e incubando a $41,5 \pm 1$ °C durante 22 a 26 h. Após incubação, homogeneizou-se o caldo SX2 e transferiu-se 0,5 ml do caldo para o poço da barrete VIDAS; aqueceu-se a 95-100 °C durante 15 min e arrefeceu-se durante 10 min. A análise foi efetuada no VIDAS.

Os resultados foram expressos como Ausência em 25 g ou Presença em 25 g.

3.4.3. - Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi efetuada utilizando o teste descrito no ponto anterior, utilizando o método VIDAS LMO2 que tem uma performance equivalente à da norma ISO 11290-1:2004 e certificado com a AFNOR Validation (Nº BIO 12/09-07/02).

O enriquecimento para pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi efetuado adicionando 25 g de amostra num saco tipo Stomacher em caldo ½ Fraser (*bioMérieux*) incubando a 30 ± 1 °C durante um período de 24 a 26 h.

Os resultados foram expressos como Ausência em 25 g ou Presença em 25 g.

3.4.4. - Contagem de bactérias sulfito-redutoras em anaerobiose

A contagem de bactérias sulfito-redutoras em anaerobiose foi efetuada de acordo com a norma ISO 15213:2003.

Para a determinação das bactérias sulfito-redutores, a amostra foi colocada em tubos de ensaio com 0,1 ml, 1 ml, 5 ml e 10 ml e foi inativada em banho-maria a 80 °C durante 10 minutos. O meio RCA (Reforced Clostridial Agar), enriquecido com sulfito de sódio e citrato de ferro, foi preparado e adicionado, ainda quente, às amostras anteriores. O volume de meio colocado em cada tubo foi cerca de 3 vezes o volume de amostra. Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C durante 10 dias.

Os resultados foram expressos em logaritmo decimal do número de unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (log UFC g⁻¹).

3.4.5. - Contagem de *Escherichia coli*

A contagem de *Escherichia coli* foi realizada através do sistema automatizado TEMPO. O teste TEMPO EC é composto por um frasco de meio de cultura e por uma carta específica do teste. O meio de cultura, após incubação, é semeado com a amostra a testar. O conjunto é transferido para os 48 poços de três volumes diferentes da carta, através do TEMPO Filler. A carta é constituída por 3 séries de 16 poços (pequenos, médios e grandes), com uma diferença de volume de um log entre cada série de poços. A carta, concebida para simular o método do NMP, é selada hermeticamente para garantir a sua manipulação posterior sem risco de contaminação. No decurso da incubação, através da sua atividade β -glucuronidase, *Escherichia coli* presente na carta degrada o substrato do meio de cultura e permite o aparecimento de um sinal fluorescente detetado pelo TEMPO Reader. Em função do número e do tamanho dos poços positivos, o sistema deduz o número de *Escherichia coli* presentes inicialmente na amostra.

Este teste tem uma performance equivalente à da norma ISO 16649-2, e o procedimento tem protocolo certificado AFNOR Validation (Nº BIO 12/13-02/05)

Os resultados foram expressos em logaritmo decimal do número de unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (log UFC g⁻¹).

3.4.6. - Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C

A contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C foi realizada através do sistema automatizado TEMPO. O teste TEMPO TVC é composto por um frasco de meio de cultura e por uma carta específica do teste. O procedimento é semelhante ao efetuado no ponto anterior.

Este teste tem uma performance equivalente à da norma ISO 4833:2003 e o procedimento tem protocolo certificado AFNOR Validation (Nº BIO 12/15-09/05).

Os resultados foram expressos em logaritmo decimal do número de unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (log UFC g⁻¹).

3.5. - Análises Físico-químicas

3.5.1. - Determinação do pH

A determinação do pH foi feita de acordo com a NP-3441 (2008), recorrendo a um potenciómetro portátil C861 (Consort, Bélgica) munido de um elétrodo SP10B do mesmo fabricante. O valor do pH obteve-se da média aritmética de duas determinações consecutivas, cumprindo os requisitos de repetibilidade e expresso com duas casas decimais.

3.5.2. - Determinação de Humidade

Determinou-se a percentagem da humidade segundo a NP: 1614, (2009), pelo método de secagem em estufa (Binder KB115) a 103±2 °C, até obtenção de massa constante.

Os resultados foram expressos em %.

3.5.3. - Determinação da atividade da água (a_w)

A determinação do a_w fez-se com recurso a um aparelho previamente calibrado, modelo ROTRONIC HYGROSKOP DT (Zurique, Suíça), equipado com uma estação de medida do tipo WA14-TH termicamente estável a 25 °C.

3.5.4. - Determinação da proteína total

A determinação da proteína total foi efetuada de acordo com a nota de aplicação FOSS ASN3139.

A determinação do azoto total pelo método de Kjeldahl, consiste numa destilação em meio alcalino, do sulfato de amónio formado após mineralização da amostra em meio sulfúrico e titulação final da amónia recolhida por destilação.

O cálculo do teor em proteína total é feito automaticamente pelo aparelho multiplicando o teor de azoto total pelo fator empírico 6,25, que resulta do pressuposto de que todas as proteínas da carne contêm 16 % de azoto.

A determinação do teor da proteína total foi efetuada em duplicado e expresso em g/100 g de amostra, com uma casa decimal.

3.5.5. - Determinação da Gordura Total

O teor em gordura foi determinado de acordo com a NP 1613 (1979). Este método baseia-se na hidrólise com uma solução de ácido clorídrico em ebulição, seguindo-se uma filtração, lavagem e pré-secagem da matéria gorda retida no filtro. Posteriormente extrai-se a gordura total com um solvente orgânico (éter de petróleo) no Soxtec. Por último, a eliminação do solvente por evaporação, secagem e pesagem do extrato.

A determinação do teor de gordura foi efetuada em duplicado e expresso em g/100 g de amostra, com uma casa decimal.

3.5.6. - Análise instrumental da Cor

A cor expressa em valores de L^* , a^* e b^* foi determinada na amostra embalada, foram efetuadas 3 leituras em cada amostra de cada músculo. Foi usado um colorímetro “Minolta chromameter CR400”, com uma área de medição de 8 mm de diâmetro e iluminante d/65. As coordenadas L^* , a^* e b^* , são a luminosidade, teor de vermelho e teor de amarelo respetivamente. Este aparelho foi calibrado com o sistema de cor CIE-LAB contra um azulejo branco standard através da embalagem da amostra.

3.5.7. - Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)

Por índice do ácido tiobarbitúrico (TBA) entende-se a quantidade, em miligramas, de aldeído malónico, por cada 1000 gramas de produto. O índice do ácido tiobarbitúrico é um indicador do grau de oxidação lipídica dos alimentos, que não é inativado pelo frio.

Uma das principais causas de alteração no sabor de um alimento é a oxidação lipídica, que afeta os ácidos gordos em geral e os ácidos gordos poli-insaturados em particular (Fennema, 1993).

O teste TBA induzida por ferro, adaptado do método de Kornbrust e Mavis (1980), foi realizado para medir a oxidação lipídica em bacon foi homogeneizada 1,5 g de amostra em 13,5 ml de KCl (1,15 %); foram misturados 200 µL de homogeneizado com 1 mL de tampão 80 mM Tris-maleato (pH 7,4), µL 400 de ácido ascórbico (2 mM) e 400 µL de sulfato de ferro (5 mM), e incubou-se durante 150 min a 37 °C num banho de água agitada suavemente. Foram adicionados quatro mililitros de uma solução combinada contendo 26 mM TBA, 0,92 M de ácido tricloroacético e 0,8 mM de HCl, a cada amostra seguido de 15 min em água fervente. As amostras foram arrefecidas até à temperatura ambiente e centrifugados a 2000 g durante 15 min, a absorvância do sobrenadante foi medida a 532 nm. Foram também medidos os brancos, contendo todos os reagentes exceto o homogeneizado.

A extensão da oxidação lipídica foi expressa como nanomoles de malondialdeído (MDA) por miligrama de amostra.

3.5.8. - Determinação do índice de peróxidos

O índice de peróxidos foi determinado na gordura das amostras, após extração segundo o método descrito por *Bligh e Dyer* (1959) que consiste na extração da gordura pela ação combinada de clorofórmio, metanol e água. Os peróxidos são determinados através da oxidação do iodeto de potássio pelo oxigénio ativo de uma massa conhecida de gordura, em meio acético, e determinação da quantidade correspondente de iodo libertado, por titulação com uma solução aferida de tiosulfato de sódio, na presença de amido como indicador.

Os resultados foram expressos em miliequivalentes de oxigénio ativo/kg de gordura extraída.

3.5.9. - Determinação do teor em nitritos e nitratos

Após extração por meio de água quente, defecação e filtração, o teor em nitritos foi determinado por técnica fotométrica, medindo-se a absorvância com um espectrofotómetro UV/Visible CINTRA 202 (GBC, Austrália) de acordo com a técnica descrita na NP-1846 (2006).

O teor de nitritos é obtido por recurso à extração por meio de água quente, defecação e filtração da amostra. A obtenção de uma coloração vermelha por adição de cloreto de sulfanilamida e de cloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina é medida fotométrica a um comprimento de onda de 538 nm. Os resultados são expressos em mg NaNO_2 /kg de amostra.

O teor de nitratos é obtido pela de redução dos nitratos a nitritos pelo cádmio metálico, e posterior medição do teor de nitritos totais. O teor de nitratos corresponde à diferença entre o valor obtido e o teor de nitritos determinado previamente. Os resultados são expressos em mg NaNO_3 /kg de amostra.

3.5.10. - Determinação do perfil em ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi determinado com base no método proposto por Lepage e Roy (1986), modificado por Cohen *et al.* (1988), por cromatografia de fase gasosa. Este método consiste numa trans-esterificação, onde os ácidos gordos dos triacilgliceróis das amostras liofilizadas são convertidos em ésteres metílicos. À amostra liofilizada adiciona-se uma solução metanólica BF_3 a 5 % no tubo de Falcon e agita-se no vortex. De seguida coloca-se o tubo de Falcon no banho a 80 °C durante 1 hora e arrefece-se rapidamente com recurso a banho de gelo. Depois adiciona-se água ultrapura para remover o excesso de BF_3 . Adiciona-se n-heptano e agitar no vortex durante 1 min centrifugar a 2000 rpm durante 5 min à temperatura ambiente. Por fim, a fase orgânica onde se encontram os ésteres é filtrada para um vial de GC através de uma coluna preparada com algodão com sulfato de sódio anidro.

Para a determinação do perfil de ácidos gordos utilizou-se um cromatógrafo gasoso AGILENT 7890 A, injetor split/splitless com coluna HP Omegawax (30 mm x 25 mm i. d. x 3,25µm) e detetor FID. A área dos picos foi determinada pelo software ChemStation. A % de ácido gordo é a razão entre a área do pico e a área total dos picos identificados.

A determinação de ácidos gordos foi efetuada em duplicado e expresso em %.

3.6. - Análise Sensorial

Análise sensorial, baseada nas definições de Sensory Evaluation Division of the Institute of Food Technologists, pode ser entendida como a disciplina que interpreta, evoca, avalia e mede reações às características de um produto, após estímulos ao ser humano em relação à visão, ao tato, ao odor e ao sabor e como esses estímulos são percebidos pelos órgãos do sentido (Stone e Sidel, 1993).

A análise sensorial foi realizada em cabines no laboratório de análise sensorial do Centro de Apoio Tecnológico e Agro-alimentar de Castelo Branco, que está de acordo com a norma ISO 8589:2010.

3.6.1 - Constituição do painel de consumidores

A análise sensorial foi efetuada por um painel de constituído por 15 consumidores, sendo 7 do sexo masculino e 8 do sexo feminino, com idades compreendidas entre 29 e 50 anos. Todos os elementos do painel de consumidores conheciam, enquanto consumidores, o produto em prova, e não lhes foi transmitida qualquer informação sobre o método tecnológico a que haviam sido sujeitas as amostras.

A análise sensorial foi efetuada de acordo com a NF V09-500:2012.

3.6.2 - Preparação e apresentação das amostras

No começo da prova foi realizada uma prova sensorial para saber sobre a intenção de compra, primeiro fundamentada na apreciação visual e depois com base na prova das amostras.

Foi realizada uma apresentação monádica das amostras embaladas dos três tratamentos e foi-lhes perguntado se considerando o aspeto, compravam o produto e se não compravam, porquê.

Depois, as amostras foram cozinhadas em forno elétrico a 180 °C durante 4 min. As amostras de bacon cozinhado foram seccionadas em partes idênticas e distribuídos em pratos codificados, com códigos de 3 números, e apresentadas aos consumidores. Após provarem foi-lhes perguntado se compravam o produto e qual o nível de satisfação global, em que:

- 1 – Extremamente desagradável
- 2 – Não gosto
- 3 – Indiferente
- 4 – Gosto
- 5 – Extremamente agradável

Os consumidores preencheram individualmente e em silêncio, na cabine, a ficha de prova apresentada (Anexo I).

Posteriormente foi realizada uma prova de ordenação baseada na preferência global, em que foram apresentadas as três amostras em simultâneo aos consumidores.

Relativamente à amostra preferida, perguntou-se o que mais gostaram e o que menos gostaram (Anexo II).

As observações dos consumidores estão transcritas no Anexo III.

3.7. - Análise Estatística

Para a análise dos resultados microbiológicos e físico-químicos utilizou-se o programa estatístico IBM SPSS Statistics, Versão 19.0 em ambiente Windows. Para cada um dos parâmetros foi efetuada análise de variância unifatorial e o teste de Scheffé para comparar as médias dos diferentes tratamentos. O nível de significância utilizado foi $\alpha = 5 \%$.

Na análise sensorial, para a análise das proporções na prova de aceitação foi utilizado o teste z e para as provas de ordenação o teste de Friedman. O nível de significância utilizado foi $\alpha = 5 \%$.

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. - Análises microbiológicas

Os microrganismos no bacon estão principalmente presentes na superfície e chegam ao produto fatiado durante o corte e embalagem (Campus *et al.*, 2008).

Tabela 2: Pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* e contagem de bactérias sulfito redutoras e de *Escherichia coli*.

Tratamento	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bactérias sulfito redutoras (UFC g ⁻¹)	<i>Escherichia coli</i> (UFC g ⁻¹)
Controlo	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	<10	<10
HPP	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	<10	<10
S/Nitr + HPP	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	<10	<10

A pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* resultou na ausência destes microrganismos em 25g de bacon. A contagem de *Escherichia coli* e de bactérias sulfito redutoras estava abaixo do limite de deteção nas amostras de bacon analisadas (< 10 UFC g⁻¹). Estes resultados refletem a qualidade sanitária do produto e as boas práticas da preparação.

A contagem de microrganismos totais a 30 °C permite estimar a totalidade dos microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos presentes num alimento, sem contudo especificar a que grupos mais restritos pertencem, nomeadamente as bactérias lácticas, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras (Mossel e Garcia, 1985).

Pela análise da Tabela 3 pode-se verificar que o tratamento HPP provocou um decréscimo significativo na contagem de microrganismos a 30 °C, mantendo uma menor carga, quando comparado com os restantes tratamentos durante o período de conservação. Após 60 dias de refrigeração ocorreu uma redução de 3 unidades log provocada por HPP.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os relatados por Garriga *et al.* (2004) em fiambre embalado a vácuo pressurizado a 600 MPa por 6 min. Da mesma forma, em lombo seco curado foi relatado um decréscimo na contagem de aeróbios quando pressurizado entre 350 e 400 MPa, durante 45 dias de armazenamento (Campus *et al.*, 2008).

Os estudos realizados sobre os produtos cárneos curados indicam diminuições consistentes nas populações microbianas após o tratamento de alta pressão na gama de 400-600 MPa, com a restante população bastante estável para o resto da vida de

prateleira (Cheftel, 1995; Yuste *et al.*, 2000; Garriga *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2007a; Patterson *et al.*, 2010; Clariana *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2011).

Tabela 3: Efeito do tratamento na contagem de microrganismos a 30 °C do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão) (Log UFC g⁻¹).

Tratamento	Data		
	Dia 0	Dia 60	Dia 73
Controlo	3,86 ^a ± 0,07	7,45 ^{bA} ± 0,67	7,79 ^{bA} ± 0,61
HPP	3,86 ± 0,07	4,25 ^B ± 0,77	3,20 ^B ± 0,49
S/Nitr + HPP	3,86 ^a ± 0,07	7,00 ^{bA} ± 0,32	7,28 ^{bA} ± 1,25

^{a, b, c} Médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05)

^{A, B} Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05)

Não se verificaram diferenças significativas entre o tratamento Controlo e o tratamento S/Nitr + HPP na contagem de microrganismos a 30 °C, evidenciando o efeito do HPP na substituição dos nitritos e nitratos, mostrando ser uma alternativa ao poder conservante destes químicos.

4.2. - Análises Físico-químicas

4.2.1. Determinação da Proteína, Gordura e Humidade.

Como pode ser verificado na Tabela 4 nem o tratamento nem o período de conservação provocaram alterações nos teores de proteína, gordura e humidade presente nas amostras de bacon, estes resultados estão de acordo com vários autores que também não encontraram diferenças nestes parâmetros provocadas pelas altas pressões nem pelo período de conservação.

Clariana *et al.* (2011) não observou alterações no teor de humidade e proteína quando submeteu presunto fatiado a 600 MPa durante 6 min nem pela pressão nem pelo armazenamento por 50 dias.

Serra *et al.* (2007) descreveram o efeito da alta pressão hidrostática de 400 a 600 MPa em presunto curado na fase inicial de cura e na fase final, e avaliaram os parâmetros físico-químicos (pH, aw, proteína total), oxidação de lípidos e a atividade de enzimas proteolíticas, não observando diferença significativa entre os resultados das amostras pressurizadas em comparação com as amostras controlo para estes parâmetros.

Rubio *et al.* (2007b) analisaram os efeitos da HPP em Salsichão embalado a vácuo e tratada com 500 MPa durante 5 min e armazenado a 6 °C durante 210 dias, não encontrando diferenças significativas nos parâmetros físico-químicos e sensoriais. Estes autores não encontraram diferenças significativas no pH e no A_w entre amostras pressurizadas ou não nem durante o período de armazenamento.

Tabela 4: Efeito do tratamento na Humidade, Proteína total e Gordura total do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).

Parâmetro	Tratamento	Data			
		Dia 0	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Proteína (%)	Controlo	15,86 ± 0,85	18,45 ± 2,31	19,62 ± 2,59	16,79 ± 2,11
	HPP	18,61 ± 0,28	18,42 ± 1,41	20,12 ± 0,64	18,57 ± 1,40
	S/Nitr + HPP	19,00 ± 0,50	19,62 ± 0,97	19,59 ± 0,55	19,22 ± 0,84
Gordura (%)	Controlo	27,27 ± 3,24	21,48 ± 10,02	15,72 ± 7,40	28,75 ± 8,39
	HPP	13,62 ± 2,20	20,10 ± 7,41	20,28 ± 3,84	21,23 ± 6,31
	S/Nitr + HPP	20,56 ± 3,99	23,41 ± 3,37	19,53 ± 1,54	22,94 ± 3,68
Humidade (%)	Controlo	52,57 ± 3,11	56,16 ± 4,89	59,47 ± 3,59	51,98 ± 4,14
	HPP	61,77 ± 1,58	55,99 ± 5,32	54,69 ± 4,64	55,58 ± 5,92
	S/Nitr + HPP	56,70 ± 3,29	54,87 ± 1,95	58,44 ± 0,71	55,14 ± 2,47

4.2.2. - Determinação do pH

O potencial hidrogeniónico (pH) é a medida que indica o grau de acidez de um alimento e é um fator muito influente no crescimento e metabolismo dos microrganismos. Como diferentes bactérias toleram diferentes valores de pH, este é também responsável por alguma seleção da flora microbiana de um alimento. De um modo geral quanto menor o valor de pH, maior a dificuldade de desenvolvimento dos microrganismos existentes num determinado produto. Contrariamente, os alimentos com pH mais elevado oferecem melhores condições para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos. É ainda de salientar que grande parte dos microrganismos potencialmente patogénicos prolifera melhor em produtos com pH neutro (Lawrie e Ledward, 2006).

Segundo Cheftel (1995) o pH dos alimentos representa um importante fator na determinação do efeito da HPP sobre microrganismos. A dissociação iónica da água (e de vários ácidos fracos) é aumentada sob pressão, ocasionando uma diminuição do pH do meio. Essa redução provoca a desnaturação de proteínas e a inativação de microrganismos presentes no alimento que foi submetido a este processo. Vários

autores observaram que o processo HPP causa uma redução nos valores de pH, favorecendo a ionização, resultando em grandes danos às células de microrganismos (Rubio *et al.*, 2007a; Smelt, 1998).

Tabela 5: Efeito do tratamento no pH do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).

Tratamento	Data			
	Dia 0	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Controlo	6,03 ± 0,06	6,00 ± 0,30	5,97 ± 0,25	6,43 ± 0,85
HPP	6,10 ± 0,00	6,27 ± 0,12	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00
S/Nitr + HPP	6,03 ± 0,06	6,13 ± 0,06	6,17 ± 0,06	6,07 ± 0,06

No entanto, na presente pesquisa (Tabela 5), isto não foi observado, pois não houve diferença significativa no pH das amostras controlo, HPP e S/Nitr + HPP à semelhança do observado por Rubio *et al.* (2007b) e Serra *et al.* (2007).

4.2.3. - Determinação da Atividade da Água (a_w)

O a_w é um parâmetro físico-químico que permite avaliar a fração de água disponível nos alimentos para participar na atividade enzimática, reações físico-químicas e no metabolismo microbiano, constituindo uma importante, e frequentemente utilizada, referência para a determinação da estabilidade e segurança sanitária dos géneros alimentícios (Le Meste *et al.*, 2006; Sablani *et al.*, 2007).

Com valores que podem variar entre 0 e 1, o a_w tem um efeito inibidor sobre o desenvolvimento dos microrganismos num determinado alimento, tanto maior quanto menor for o seu valor, pois limita a disponibilidade de água e perturba os mecanismos de regulação osmótica das células; os limites inibitórios da grande maioria dos microrganismos são conhecidos (Leistner e Gould, 2002).

Tabela 6: Efeito do tratamento na atividade da água (a_w) do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).

Tratamento	Data			
	Dia 0	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Controlo	84,60 ^a ± 0,44	87,03 ^{bA} ± 0,35	90,67 ^c ± 0,74	93,03 ^d ± 0,25
HPP	83,60 ^a ± 0,10	85,03 ^{aB} ± 0,90	89,83 ^b ± 0,75	92,83 ^c ± 0,31
S/Nitr + HPP	83,57 ^a ± 0,15	86,13 ^{bAB} ± 0,06	91,43 ^c ± 0,59	93,37 ^c ± 0,31

^{a, b, c, d} Médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

^{A, B} Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Pela análise da Tabela 6 pode-se verificar que os valores de a_w aumentaram significativamente ao longo do tempo de conservação para os três tratamentos. Quanto aos tratamentos, verifica-se que no dia 60 houve uma diferença significativa em que o tratamento HPP apresentou valores de a_w inferiores aos outros tratamentos, o que pode dever-se à análise deste parâmetro visto que apenas podia ser analisada uma amostra de cada vez sendo que o processo foi por vezes demorado devido à dificuldade de manter a temperatura da sala constante a 25 °C. Estes valores não deveriam apresentar diferenças significativas conforme relatado por alguns autores que não encontraram diferenças significativas nos valores de a_w ao longo do período de armazenamento nem entre amostras tratadas com HPP e não tratadas.

Rubio *et al.* (2007b) fizeram análises de a_w em bifes curados “Cecina de León” embalados a vácuo, até o 210º dia de cura deste produto, e não verificaram mudanças expressivas nos valores de a_w . Resultados semelhantes também foram encontrados por Marcos *et al.* (2007) em salsichas embaladas a vácuo submetidas ao processo de HPP e armazenadas por 28 dias.

4.2.4. - Determinação do Índice do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Os lípidos constituem uma importante fração de praticamente todos os alimentos, pelo que o conhecimento e compreensão das alterações físico-químicas que lhes são características, e respetivas consequências, devem obrigatoriamente ser considerados em qualquer abordagem relativa à qualidade dos alimentos (Richards, 2006).

Na carne e nos produtos cárneos, adicionalmente à atividade microbiana, a principal causa de deterioração são as alterações na gordura, limitando frequentemente a vida útil das carnes congeladas e dos produtos cárneos, devido a alterações provocadas na cor, odor e sabor (Kanner, 1994; Botsoglou *et al.*, 2003).

A oxidação lipídica é difícil de ser controlada, principalmente devido à sua complexidade e variedade. É uma reação química que pode ser potencializada por ação microbiológica e pela redução do conteúdo de água dos alimentos (Ramirez-Suarez e Morrissey, 2006; Cheach, Ledward, 1996).

Os lípidos são importantes componentes dos produtos cárneos, conferindo características desejáveis de suculência, sabor e aroma, valor nutricional e propriedades tecnológicas. Contudo, os mesmos são facilmente oxidáveis, levando à rancificação, com a produção de toxinas indesejáveis e comprometendo a qualidade e a vida útil dos produtos alimentícios. As substâncias tóxicas produzidas são cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos e hidrocarbonetos, responsáveis pelo odor e gosto característico de ranço (Olivo, 2006).

Os nitritos têm um efeito protetor na rancificação das gorduras, a incorporação de 50 ppm de nitrito em carne bovina picada, carne de porco, frango e cozidos, reduziu os valores de TBA em 50 a 64 % na carne bovina, suína e frango, e cerca de 35 % no

peixe. Com concentrações de nitrito de 100 ppm as reduções de TBA foram de 57 a 72 %, e 200 ppm reduziu valores de TBA de 87 a 91% (Morrissey e Techivangana, 1985).

A oxidação lipídica é um importante parâmetro de qualidade e valor nutricional em carne curada. De acordo com estudos anteriores, a aplicação de alta pressão poderia induzir a oxidação de lípidos, danificando membrana celular (Orlien *et al.*, 2000) e em seguida promovendo a oxidação durante o armazenamento (Beltran *et al.*, 2004). No entanto, no presente estudo não foram encontradas diferenças nos níveis de TBARS durante o tempo de armazenamento nem entre tratamentos, sendo que estes valores ficaram abaixo do limite de deteção para todas as amostras analisadas.

Os resultados de TBA encontrados em bibliografia divergem, sendo que alguns autores não encontram diferenças com o tratamento de altas pressões e ao longo do período de armazenamento em diferentes produtos cárneos (Andrés-Nieto *et al.*, 2004; Marcos *et al.*, 2007; Clariana *et al.*, 2011). Cava *et al.* (2005) apontaram que os valores de TBA em presunto ibérico tratado com alta pressão (200-300 MPa e 15-30 min) aumentaram, embora após armazenamento durante 90 dias, valores de TBA semelhantes foram encontrados em as amostras tratadas e não tratadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Rubio *et al.* (2007b) e Campus *et al.* (2008).

O TBA permite avaliar o grau de rancificação dos lípidos num alimento, sendo uma determinação com elevada correlação relativamente à apreciação sensorial na deteção da oxidação lipídica, apesar das metodologias laboratoriais mais utilizadas variarem muito no grau de precisão. Os teores podem surgir por defeito, quando a extração dos produtos de oxidação não é completa, ou por excesso, quando provocado pelas altas temperaturas ou interferência de outras substâncias presentes nos alimentos, como por exemplo a glucose, maltose, sacarose e o sorbitol, que também originam cor ao reagirem com o ácido tiobarbitúrico (Wang *et al.*, 2002; Richards, 2006).

4.2.5. - Determinação do Índice de Peróxidos

A primeira fase da oxidação dos lípidos ocorre a uma taxa relativamente baixa produzindo peróxidos, mas, após se atingir um determinado nível de oxidação inicia-se uma segunda fase de reação, com formação de compostos secundários voláteis e não voláteis que desde o primeiro instante fazem sentir os efeitos do ranço (Kanner, 1994).

Os peróxidos são os produtos iniciais maioritariamente presentes no processo de autooxidação, e frequentemente utilizam-se para monitorizar a evolução das primeiras etapas da oxidação lipídica. Ao longo do processo oxidativo o seu valor cresce até um máximo a partir do qual volta a diminuir e embora algumas vezes se tenha já correlacionado a sua presença com o desenvolvimento de aromas e sabores a ranço os resultados são frequentemente inconsistentes (Richards, 2006).

Pela análise da Tabela 7, verifica-se que os coeficientes de variação são extremamente elevados, facto que para além de poder ser reflexo da fragilidade da técnica usada, pode dever-se à heterogeneidade das amostras analisadas quanto ao teor em gordura. Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos nem ao longo do período de armazenamento, o que pode ser justificado pela grande variabilidade dos resultados.

Tabela 7: Efeito do tratamento no índice de peróxidos ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão) (mEq O₂ kg⁻¹ de gordura extraída).

Tratamento	Data			
	Dia 0	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Controlo	1,67 ± 1,53	27,37 ± 41,80	8,30 ± 7,51	9,97 ± 13,30
HPP	3,57 ± 0,49	2,77 ± 1,77	2,93 ± 1,47	7,63 ± 6,56
S/Nitr + HPP	0,90 ± 0,82	10,47 ± 7,31	5,67 ± 2,04	3,77 ± 0,80

4.2.6. - Determinação da Análise Instrumental da Cor

A cor é um parâmetro importante na aceitação pelo consumidor. Cheftel e Culioli (1997) relataram que a cor de carnes curadas é relativamente resistente à pressão elevada (igual ou superior a 400 MPa). A resistência do pigmento nitrosilmioglobina à oxidação provavelmente pode explicar a estabilidade da cor de produtos cárneos curados. Pelo contrário, HPP induz mudanças drásticas na cor do músculo vermelho de carne fresca, devido a mudanças na mioglobina, o que significa que o produto final fica com uma aparência cozida e não pode ser vendido como carne fresca (Hogan *et al.*, 2005).

Tabela 8: Efeito do tratamento nos parâmetros de coloração (L*, a* e b*) do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).

Parâmetro	Tratamento	Data			
		Dia 0	Dia 60	Dia 90	Dia 120
CIE L*	Controlo	64,84 ± 9,49	61,19 ± 7,02	60,22 ± 7,61	64,84 ± 7,06
	HPP	53,72 ± 14,83	52,25 ± 7,04	54,33 ± 8,50	57,78 ± 9,84
	S/Nitr + HPP	61,82 ± 11,64	62,11 ± 10,68	64,51 ± 10,36	61,33 ± 7,76
CIE a*	Controlo	13,34 ± 4,50	12,21 ^B ± 2,31	10,79 ^{AB} ± 2,91	8,89 ± 2,70
	HPP	14,25 ± 3,23	14,19 ^B ± 2,92	12,04 ^B ± 3,16	11,82 ± 4,39
	S/Nitr + HPP	10,40 ± 5,48	8,02 ^A ± 3,62	7,25 ^A ± 3,29	7,87 ± 2,84
CIE b*	Controlo	6,48 ^A ± 1,32	6,93 ± 1,52	6,99 ± 1,65	8,24 ^A ± 2,94
	HPP	6,01 ^A ± 1,87	7,26 ± 1,76	6,69 ± 1,63	6,68 ^A ± 1,75
	S/Nitr + HPP	8,75 ^B ± 2,07	8,54 ± 1,88	8,99 ± 2,61	9,63 ^B ± 1,77

^{A, B} Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p < 0,05)

A Luminosidade (L^*) não foi significativamente afetada pelo tratamento nem ao longo do período de armazenamento (Tabela 8), à semelhança de outros autores que também não encontraram diferenças significativas ao submeter produtos cárneos a pressões entre 400 e 600 MPa (Marcos *et al.*, 2007; Rubio *et al.* 2007; Fuentes *et al.*, 2010) (Tabela 5). Foi verificado um valor inferior na vermelhidão (a^*) no dia 60 e 90 entre o tratamento S/Nitr + HPP e o controlo e HPP, visto a cor vermelha dos produtos de charcutaria é um dos efeitos importantes do nitrito em produtos cárneos (Honikel, 2008).

A cor amarela (b^*) ao fim de 120 dias apresentou um valor superior para o tratamento sem nitritos.

4.2.7. - Determinação do Teor de Nitritos e Nitratos

O nitrato teve uma enorme preponderância na indústria de carnes, que atualmente é ocupada pelo nitrito por ser este que realmente intervém no processo de cura. Porém, o facto de o nitrato poder passar a nitrito por via enzimática e microbiana, faz com que ainda seja usado em mistura com o nitrito, constituindo assim uma reserva adicional que permite a posterior formação de nitritos (Ferreira *et al.*, 1994).

Hugas *et al.* (2002) verificaram uma diminuição no teor de ferro em lombo marinado pressurizado a 600 MPa, o que pode indicar a perda da estrutura nativa da mioglobina. Além disso, Andrés *et al.* (2006) verificaram que o conteúdo em nitrosilmioglobina reduziu com a pressurização de presunto curado a 400 MPa, e Goutefongea *et al.* (1995) observaram que quando pressurizar uma solução de nitrosilmioglobina a 600 MPa, o pigmento foi parcialmente insolubilizado, indicando que HPP poderia induzir alterações na nitrosilmioglobina.

Pela análise da Tabela 9 é possível observar que ao longo do período de armazenamento o teor de nitritos decresce, apesar da grande variabilidade nos resultados obtidos.

Tabela 9: Efeito do tratamento no teor de nitritos de bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão) ($\text{mg NaNO}_2 \text{ kg}^{-1}$).

Tratamento	Data			
	Dia 0	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Controlo	97,33 ^{ab} ± 32,66	0,00 ^b ± 0,00	39,00 ^{ab} ± 49,33	4,33 ^b ± 2,08
HPP	127,67 ^{ab} ± 6,51	16,67 ^b ± 21,55	5,67 ^b ± 1,16	10,33 ^b ± 5,13
S/Nitr + HPP	0,00 ^A ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,33 ± 1,53	0,00 ± 0,00

^{a, b} Médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

^{A, B} Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Gry *et al.* (1983) cit por EFSA Journal (2003) verificaram que, para a grande maioria dos produtos cárneos curados analisados, ocorre uma redução de cerca de 50 % da concentração de nitrito nos primeiros dias após o seu processamento. A concentração de nitritos pode reduzir-se para valores inferiores a 10 % após algumas semanas de armazenamento.

Clariana *et al.* (2011) também observaram uma grande variabilidade de resultados nas amostras, durante o armazenamento.

Foram verificadas claras diferenças entre o tratamento S/Nitr + HPP e os restantes em todos os tempos de conservação, o que seria expectável visto que não foi adicionado nitrito ou nitrato a estas amostras aquando da sua elaboração.

Tabela 10: Efeito do tratamento no teor de nitratos do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão) ($\text{mg NaNO}_3 \text{ kg}^{-1}$).

Tratamento	Data			
	Dia 0	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Controlo	88,67 ± 38,00	67,33 ^{AB} ± 82,95	26,67 ± 14,57	44,67 ^{AB} ± 34,02
HPP	112,33 ^a ± 38,44	128,00 ^{bb} ± 16,7	86,00 ^a ± 10,58	145,0 ^{bb} ± 10,58
S/Nitr + HPP	3,67 ± 6,35	0,00 ^A ± 0,00	8,67 ± 1,16	9,00 ^A ± 2,00

^{a, b} Médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

^{A, B} Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Na Tabela 10 estão representados os resultados obtidos para o teor de nitratos, em que devido à sua enorme variabilidade não permite tirar quaisquer conclusões, embora se verifique, como seria de esperar, valores tendencialmente mais baixos no tratamento S/Nitr + HPP, uma vez que neste tratamento não foram adicionados nitratos na sua elaboração.

4.2.8. - Determinação dos Ácidos Gordos

A pressurização e o tempo de armazenamento não mostraram qualquer efeito sobre o teor de ácidos gordos (Tabela 11).

A pressurização e o tempo de armazenamento também não provocaram alterações no perfil de ácidos gordos de produtos cárneos em estudos de vários autores (Clariana *et al.*, 2011).

A aplicação da HPP não mostrou qualquer efeito na composição em ácidos gordos de outros produtos, tais como tofu pressurizado a 350 MPa (Préstamo e Fontecha, 2007) ou leite de vaca pressurizado entre 50 e 350 MPa (Rodríguez-Alcalá *et al.*, 2009).

Tabela 11: Efeito do tratamento no perfil de ácidos gordos do bacon ao longo do período de armazenamento (Média e desvio-padrão).

Parâmetro	Tratamento	Data			
		Dia 0	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Ácido mirístico (C14:0)	Controlo	1,71±0,05	1,79±0,14	1,69±0,12	1,66±0,14
	HPP	1,56±0,06	1,62±0,09	1,6±0,03	1,6±0,22
	S/Nitr + HPP	1,6±0,14	1,4±0,01	1,51±0,15	1,53±0,14
Ácido palmítico (C16:0)	Controlo	28,12±0,63	28,61±0,35	28,09±0,23	27,03±1,42
	HPP	27,41±0,95	27,71±1,6	27,18±0,46	26,9±2,23
	S/Nitr + HPP	27,47±1,15	25,98±1,1	27,13±1,24	25,81±0,6
Ácido palmitoleico (C16:1)	Controlo	3,44±0,25	3,32±0,35	3,72±0,62	3,21±0,27
	HPP	3,28±0,15	4,06±0,56	4,07±0,67	3,51±0,93
	S/Nitr + HPP	3,42±0,41	3±0,25	2,82±0,43	3,06±0,23
Ácido esteárico (C18:0)	Controlo	12,86±0,52	13,76±1,5	13,23±1,35	12,24±1,03
	HPP	13,6±0,56	12,39±1,66	11,58±1,49	12,16±0,6
	S/Nitr + HPP	13,86±0,44	14,63±1,64	15,5±2,61	10,57±3,82
Ácido oleico (C18:1)	Controlo	46,09±0,27	45,45±0,6	45,8±1,58	44,65±1,75
	HPP	46,69±1,14	46,54±0,63	47,39±0,47	46,95±0,85
	S/Nitr + HPP	46,6±1,35	45,17±2,24	44,2±0,32	45,01±2,28
Ácido linoleico (C18:2)	Controlo	5,91±1,01	5,32±1,12	4,79±1,05	6,94±1,54
	HPP	4,72±1,29	5,81±2,39	4,77±1,23	7,09±3,13
	S/Nitr+ HPP	4,98±0,3	7,93±0,18	6,72±3,22	9,2±1,97
Ácido eicosenóico (C20:1)	Controlo	0,57±0,05	0,6±0,22	1,39±0,46	0,88±0,19
	HPP	1,43±0,28	0,67±0,06	1,25±0,33	0,49±0,18
	S/Nitr+ HPP	1,1±0,14	0,72±0,17	1,02±0,2	0,66±0,02
Ácido eicosadi-enóico (C20:2)	Controlo	0,08±0,14	0±0	0±0	0,2±0,04
	HPP	0±0	0,08±0,14	0±0	0,18±0,08
	S/Nitr + HPP	0±0	0,26±0,02	0,11±0,19	0,3±0,06
Ácido eicosatetra-enóico (C20:4)	Controlo	0,2±0,06	0,31±0,1	0,28±0,05	0,19±0,06
	HPP	0,26±0,08	0,24±0,12	0,23±0,07	0,26±0,12
	S/Nitr + HPP	0,15±0,03	0,32±0,03	0,28±0,12	0,21±0,05
Ácido docosenóico (C22:1)	Controlo	0,66±0,3	0,41±0,38	0,53±0,04	1,35±0,82
	HPP	0,53±0,35	0,5±0,08	0,61±0,08	0,54±0,11
	S/Nitr + HPP	0,32±0,02	0,42±0,09	0,42±0,12	0,4±0,12

4.3. - Análise Sensorial

A análise sensorial é uma ferramenta com um amplo espectro de utilização no desenvolvimento de novos produtos, na reformulação dos produtos já estabelecidos no mercado, em estudos de vida de prateleira (*shelf life*), na determinação das diferenças e similaridades apresentadas entre produtos concorrentes, na identificação da preferência do consumidor e, finalmente, na otimização e melhoria da qualidade.

A análise sensorial tem desempenhado uma importante função na avaliação e interpretação das propriedades sensoriais de alimentos (textura, sabor, aroma, aparência e cor), em função da sua composição química, de processamento, condições de embalagem e armazenamento.

No que concerne à prova em que foi avaliada a intenção de compra dos consumidores apresentam-se os resultados na Figura 6.

No Dia 0, considerando o aspeto, 67 % dos consumidores comprava o produto HPP e 40 % o Controlo (estas percentagens não são significativamente diferentes (Anexo III.1)); nenhum dos consumidores compraria o tratamento S/Nitr + HPP, justificando frequentemente esta opção com a cor do produto (Anexo III.2).

Após provar 93 % compraria o produto do tratamento HPP e 80 % o Controlo, não se verificando diferenças significativas entre estes (Anexo III.3) e 27% dos consumidores comprariam o S/Nitr + HPP. Os comentários tecidos pelos consumidores para justificar a não aquisição dos tratamentos Controlo, HPP e S/Nitr + HPP são similares, destacando o sabor pouco agradável (Anexo III.4).

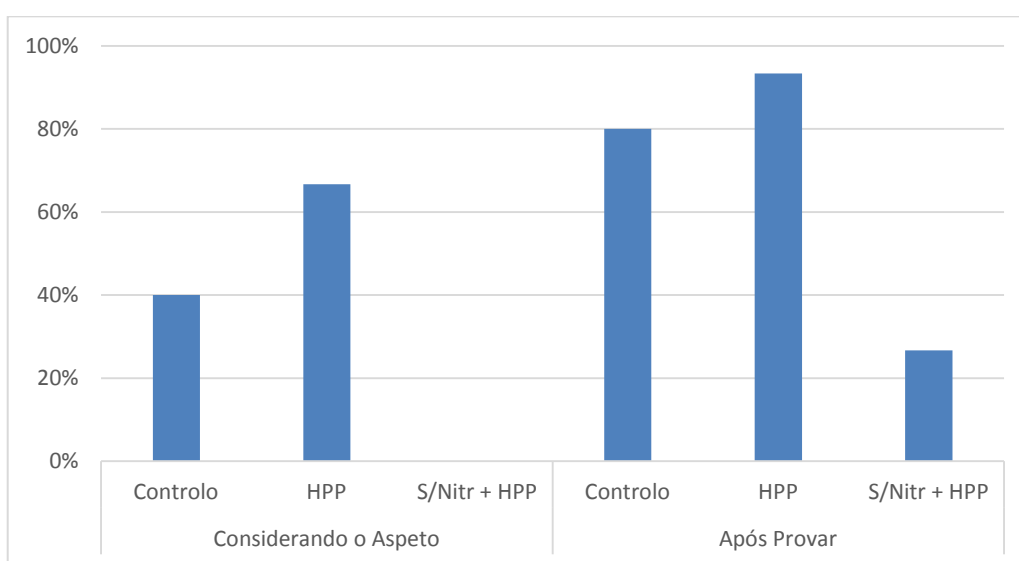


Figura 6: Intenção de compra pelos consumidores no Dia 0 com base na apreciação visual das amostras de bacon e após provar.

No Dia 60, considerando o aspeto 87 % dos consumidores comprariam o tratamento HPP e 60 % o Controlo (sem diferenças significativas entre eles (Anexo III.5)) e apenas 7 % adquiriria o produto do tratamento S/Nitr + HPP (Figura 7). À semelhança do Dia 0 a cor do tratamento S/Nitr + HPP foi referida pela maioria dos consumidores como característica negativa (Anexo III.6).

Depois de degustarem todos os consumidores comprariam o produto do tratamento HPP e 87 % compraria o Controlo (não há diferenças significativas entre estes tratamentos (Anexo III.7)). O produto do tratamento S/Nitr + HPP seria adquirido por 40 % dos consumidores; os que não compravam este produto justificaram a sua opção principalmente com o sabor pouco intenso (Anexo III.8).

Os consumidores referiram a cor e o sabor como aspetos justificativos da não aquisição do tratamento S/Nitr + HPP, o que está de acordo com as funções desempenhadas pelos nitritos no bacon, nomeadamente, desenvolver e fixar a cor e melhorar o sabor e os aromas (Faria *et al*, 2001, Sebranek e Bacus, 2007, Weiss *et al*, 2010).

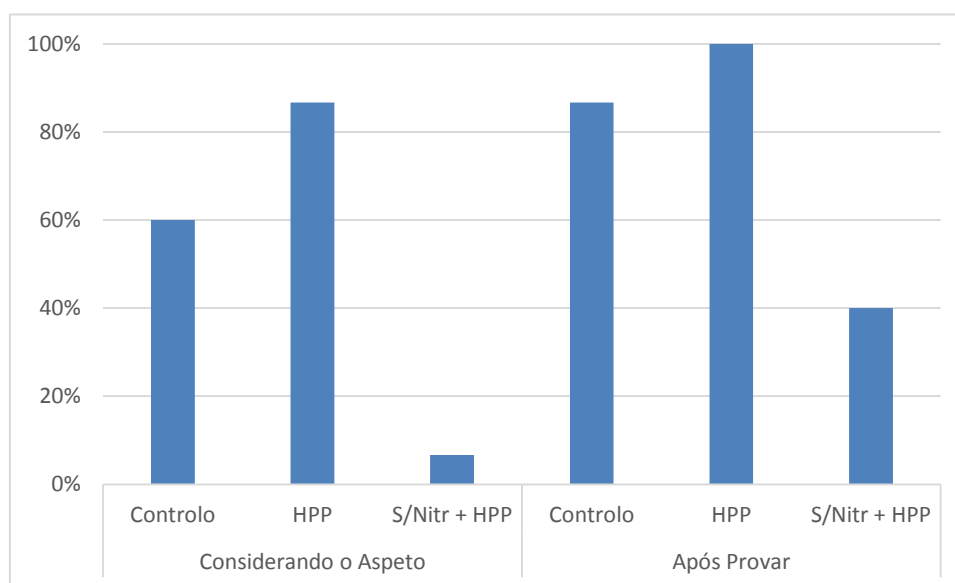


Figura 7: Intenção de compra pelos consumidores no Dia 60 com base na apreciação visual das amostras de bacon e após provar.

Quanto ao nível de satisfação global, no Dia 0 o tratamento S/Nitr + HPP destacou-se uma vez mais pela negativa, em que quase metade dos consumidores não gostaram. Quanto ao tratamento HPP, 94 % dos consumidores gostaram ou ficaram extremamente agradados. Por sua vez o tratamento Controlo reuniu 87 % de consumidores que gostaram ou ficaram extremamente agradados (Figura 8).

Na Figura 9 podemos observar que, no Dia 60, 27 % dos consumidores não gostaram e 40 % mostraram-se indiferentes ao produto do tratamento S/Nitr + HPP. Todos os consumidores gostaram ou ficaram extremamente agradados com o produto do tratamento HPP. Quanto ao Controlo, 20 % gostaram e 60 % ficaram indiferentes, sendo que, embora indiferentes, 87% respondeu que compraria este produto (Figura 9).

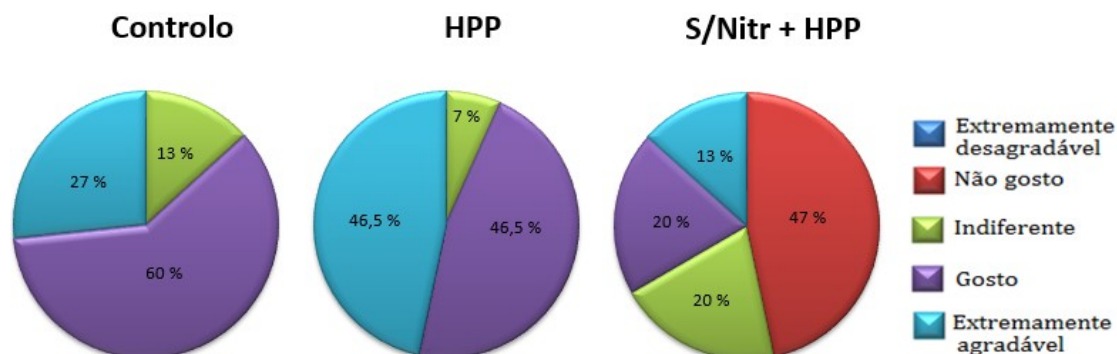


Figura 8: Nível de satisfação global dos tratamentos Controlo, HPP e S/Nitr + HPP no Dia 0.

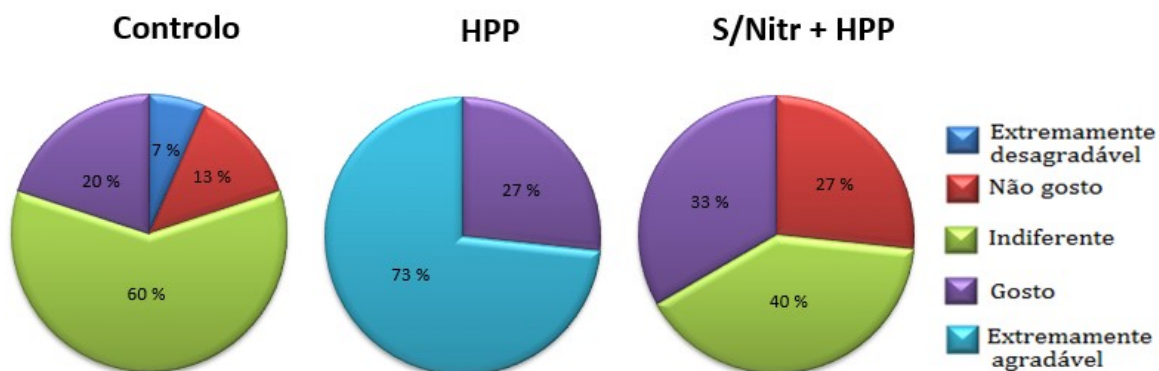


Figura 9: Nível de satisfação global dos tratamentos Controlo, HPP e S/Nitr + HPP no Dia 60.

Perante o reduzido nº de consumidores (15), após a realização da prova de aceitação pediu-se aos consumidores para avaliarem outras amostras perguntando-lhes se gostaram do produto apresentado e solicitando que ordenassem as amostras segundo a preferência global. Realizaram-se estas duas provas para verificar a consistência dos resultados.

Ao perguntar aos consumidores se gostaram ou não dos produtos, no Dia 0, a proporção de consumidores que gostaram do produto foi similar para Controlo e HPP (Anexo IV.1). O tratamento menos apreciado pelos consumidores foi o S/Nitr + HPP. O mesmo foi verificado no Dia 60 (Figura 10 e Anexo IV.2).

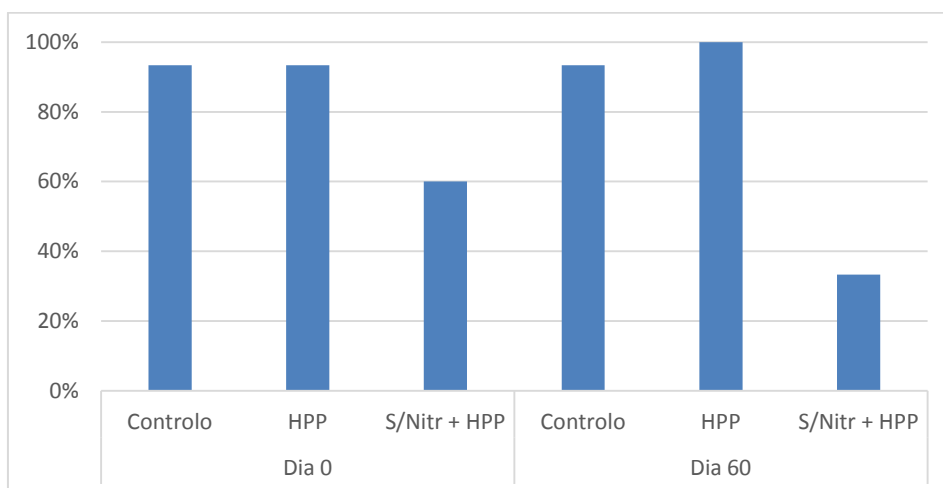


Figura 10: Percentagem de consumidores que gostaram dos tratamentos Controlo, HPP e S/Nitr + HPP na prova de ordenação nas duas datas de prova.

Relativamente à ordenação das amostras segundo a preferência global, (Figura 11) no Dia 0 não houve diferenças significativas entre os tratamentos em estudo (Anexo IV.3), em que os consumidores referiram frequentemente o sabor e a textura como aspetos que gostaram (Anexo IV.4).

No Dia 60 os consumidores preferiram o produto do tratamento HPP, seguido do Controlo e por último o S/Nitr + HPP (Anexo IV.5 e IV.6), destacando o sabor, a textura e a cor como características que mais gostaram (Anexo IV.7).

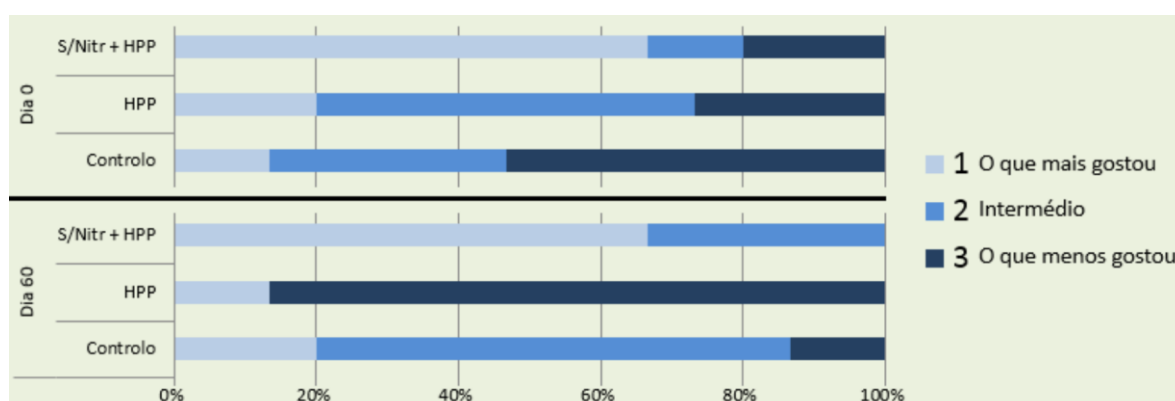


Figura 11: Preferência global das amostras de bacon nas duas datas de prova (de 1 - o tratamento que menos gostou a 3 - o tratamento que mais gostou).

Estes resultados estão de acordo com Téllez-Luis *et al.* (2001) que refere que na maioria das vezes as características sensoriais dos alimentos melhoram ou não sofrem modificações após o tratamento com HPP. A sua influência sobre as características sensoriais depende do tipo de alimento e das condições de pressurização (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

Segundo Honikel (2008), os nitritos conferem aos produtos uma cor vermelha estável e um sabor agradável, sendo estes os atributos mais enunciados pelos consumidores como prejudativos no tratamento S/Nitr + HPP.

Rubio *et al.* (2007b) constataram que a carne curada seca “Cecina de Leon”, sujeita a um tratamento de 500 MPa durante 5 min a 18 °C, mantinha as propriedades sensoriais após a pressurização e durante o período de armazenamento a temperaturas de refrigeração.

CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos resultados permitiu concluir que o HPP é um eficiente método para prolongamento da vida de prateleira do bacon fatiado embalado, pois o mesmo leva a uma diminuição do crescimento de microrganismos deteriorantes e não provocou mudanças físicas e químicas indesejáveis no produto.

O teor de ácidos gordos não foi afetado pela pressurização nem pela ausência de nitritos durante o período de armazenamento.

A oxidação lipídica em todas as amostras ficou abaixo do limite de deteção, mesmo nas amostras sem nitritos, em que seria de esperar uma maior oxidação lipídica pelo efeito protetor deste na rancificação das gorduras. Isto pode dever-se ao facto de as amostras sem nitritos terem sido sujeitas a HPP colmatando a ausência dos nitritos no bacon.

A cor é um parâmetro importante na aceitação pelo consumidor. Sendo que esta não foi afetada pelas altas pressões, mas foi afetada pela ausência de nitritos em que as amostras apresentaram uma coloração menos vermelha após 60 dias de conservação. A variação na coloração foi também detetada na prova sensorial, em que os consumidores referiram a cor como aspeto negativo no tratamento S/Nitr + HPP.

A prova sensorial realizada pelos consumidores não revelou diferenças significativas entre os tratamentos Controlo e HPP e o tratamento S/Nitr + HPP destacou-se dos outros tratamentos, sendo o menos apreciado pelos consumidores o tratamento S/Nitr + HPP.

De salientar que no Dia 60, 40 % dos consumidores não comprariam o produto do tratamento S/Nitr + HPP considerando o aspeto, mas comprá-lo-iam após provar. Mais ainda, os consumidores não tinham informação sobre os tratamentos aplicados, podendo estar dispostos a adquirir um produto com cor menos apelativa se soubessem que não continha nitritos e nitratos.

Apesar de o investimento inicial ser muito alto, o tratamento com alta pressão melhora a qualidade microbiológica, não afetando a qualidade nutricional e sensorial do bacon, o que pode tornar vantajosa sua implantação e comercialização futura, como já vem sendo feito em vários países.

CAPÍTULO VI - BIBLIOGRAFIA

- Andrés, A. I., Adamsen, C. E., Möller, J. K. S., Ruiz, J., Skibsted, L. H. (2006). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, 222: 486-491.
- Andrés-Nieto, A. I., Møller, J., Adamsen, C., Ruiz, J., e Skibsted, L. (2004). Efecto de la aplicación de alta presión hidrostática (APH) sobre el color y estabilidad oxidativa de jamón ibérico loncheado y envasado en atmosfera modificada. *Eurocarne*, 131: 1-6.
- Aymerich, T., Picouet, P. A., Monfort, J. M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78: 114-129.
- Balasubramaniam, V. M., Farkas, D., Turkey, E. (2008). High-Pressure Processing. *Food Technology*, 11: 33-38.
- Balasubramaniam, V. M., Ting, E. Y., Stewart, C. M., Robbins, J. A. (2004). Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5: 299-306.
- Beltran, E., Pla, R., Yuste, J., Mor-Mur, M. (2004). Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. *Meat Science*, 66: 719-725.
- Botsoglou, N., Grigoropoulou, S., Botsoglou, E., Govaris, A., Papageorgiou, G. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigeration. *Meat Science*, 65 (3): 1193-1200.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T. (2010). Inactivación de *Listeria monocytogenes* por altas presiones en jamón curado: desarrollo, validación y aplicación de un modelo predictivo. *Eurocarnes*, 189: 60-68.
- Butz, P., Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: Chemical aspects. *Food Research International*, 35: 279- 284.
- Campus, M., Flores, M., Martinez, A., Toldrá, F. (2008). Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin. *Meat Science*, 80: 1174-1181.
- Carlez, A., Veciana-Nogues, T., Cheftel, J. C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced meat due to high pressure processing. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie*, 28: 528-538.
- Cava, R., González, S., Ladero, L., Carrasco, J. A. (2005). Efecto de las altas presiones (ap) sobre el color y la oxidación lipídica en jamón ibérico loncheado durante el almacenamiento a refrigeración. *Carnica 2000*, 263: 94-102.
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., Ramírez, M. R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science e Emerging Technologies*, 10: 76-81.
- Chawla, R., Patil, G. R., Singh, A. K. (2011). High Hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 48: 260-268.
- Cheach, P. B., Ledward, D. A. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43 (2): 123-134.
- Cheftel J. C. (1995). High-pressure, microbial inactivation and food preservation. Review. *Food Science and Technology International*, 1: 75-90.
- Cheftel, J. C., Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46: 211-236.

- Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., Díaz, I., Valero, A., García-Regueiro J. A. (2011). Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. Effects along the storage period. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12: 456–465.
- Comissão das Comunidades Europeias (2007). Relatório da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho sobre os progressos realizados no âmbito da reavaliação dos aditivos alimentares. Relatório Final nº 418, Bruxelas.
- Decreto-lei 33/2008 (2008). Estabelece as condições a que deve obedecer a utilização dos aditivos alimentares, com exceção dos corantes e edulcorantes. *Diário da República* nº 39, I Série de 25 de Fevereiro de 2008 (pp.1215-1221).
- Demazeau, G., Rivalain, N. (2011). The development of High Hydrostatic pressure processes as an alternative to other pathogen reduction method. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 1359-1369.
- Diez, A. M., Santos, E. M., Jaime, I., Rovira, J. (2008). Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. *Food Microbiology*, 25: 154-161.
- Earnshaw, R. (1996). High pressure food processing. *Nutrition & Food Science*, 2: 8-11.
- EFSA Journal (2003). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *EFSA Journal*, 14: 1-34.
- Eisenmenger, M. J., Reyes-De-Corcuera, J. I. (2009). High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45 (5): 331-347.
- Escriu, R., Mor-Mur, M. (2009). Role of quantity and quality of fat in meat models inoculated with *Listeria innocua* or *Salmonella Typhimurium* treated by high pressure and refrigerated stored. *Food Microbiology*, 26: 834-840.
- Faria, J. A. F., Felício, P. E., Neves, M. A., Romano, M. A. (2001). Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados. Revisão. *Revista TeC Carnes*, 3 (2): 16-22.
- Feiner, G. (2006). Raw fermented salami Meat products handbook. In *Feiner, G., Meat products Handbook Practical Science and Technologic*. Reino Unido: Woodhead Publishing Limited (pp. 314-375).
- Fennema, O., R. (1993). *Química de los alimentos*. 2.ed. Zaragoza: Acribia.
- Ferreira, M., Oliveira, M., Ferreira, I., Andrade, P. (1994). Aditivos dos produtos cárneos. 1. Aditivos azotados: Características e metodologias de doseamento. *Revista Portuguesa de Nutrição*, VI (3): 44-45.
- Ferreira, L., Afonso, C., Vila-Real, H., Alfaia, A. J., Ribeiro, M. H. L. (2008). Evaluation of the effect of high pressure on naringin hydrolysis in grapefruit juice with naringinase immobilised in calcium alginate beads. *Food Technology and Biotechnology*, 46: 146-150.
- Flores, J., Toldrá, F. (1993). Curing. In: *MaCrae, R., Robinson, R. K., Sadler M. J. Academic Encyclopedia of Food Science. Food Technology and Nutrition*. London, UK: Ed. Press (pp 1277-1282).
- Fonberg-Broczek, M., Windyga, B., Szczawinski, J., Szczawinska, M., Pietrzak, D., Prestamo, G. (2005). High Pressure for food safety. *Acta Biochimica Polonica*, 52: 721-724.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M., Ventanas, S. (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat Science*, 85: 506–514.
- Fulladosa, E., Serra, X., Gou, P., Arnau, J. (2009). Effects of potassium lactate and high pressure on transglutaminase restructured dry-cured hams with reduced salt content. *Meat Science*, 82: 213-218.

- Gandemer, G. (2002). Lipids in muscle and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62: 309-312.
- Garriga, M., Grèbol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M., Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science e Emerging Technologies*, 5: 451-457.
- Garriga, M., Aymerich, M. T., Costa, S., Monfort, J. M., Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology*, 19: 509-518.
- Garriga, M., Aymerich, T. (2009). Advanced Decontamination Technologies. High Hydrostatic Pressure on Meat Products. In Toldrá, F., *Safety of Meat and Processed Meat Food Microbiology and Food Safety*. Nova York, E.U.A: Springer (pp. 183- 202).
- Garriga, M., Marcos, B., Aymerich, T., Hugas, M. (2003). Prospectiva de aplicación de altas presiones para la minimización de riesgos asociados a *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en embutidos madurados en frío. *Eurocarnes*, 12: 1-6.
- Garriga, M., Marcos, B., Martín, B., Veciana-Nogués, T., Bover-Cid, S., Hugas, M., Aymerich, T. (2005). Starter Cultures and High-Pressure Processing to improve the Hygiene and Safety of Slightly Fermented Sausages. *Journal of Food Protection*, 68: 2341-2348.
- Goutefongea, R., Rampon, V., Nicolas, N., Dumont, J. P. (1995). Meat color changes under high pressure treatment. *Proceedings 41st International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 384–385).
- Han, J. H. (2007). Packaging for NonThermal processed Foods. In Han, J. H. *Packaging for Nonthermally processed foods*. Reino Unido: Blackwell Publishing (pp. 3-16).
- Han, Y., Jiang, Y., Xu, X., Sun, X., Xu, B., Zhou, G. (2011). Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Science*, 88: 682–688.
- Hayman, M. M., Kouassin, G. K., Anantheswaran, R. C., Floros, A. J., Knabel, S. J. (2008). Effect of water activity on inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactate dehydrogenase during high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 21-26.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 197-203.
- Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T. (2011). High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the food safety objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 154 (3):107-112.
- Hogan, E., Kelly, A., Sun, D. W. (2005). High pressure processing of foods: An overview. In Da-Wen Sun (Ed.). *Emerging technologies for food processing*. Dublin, Ireland (pp. 3–32).
- Honikel, K. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78: 68-76.
- Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: High pressure as a model technology. *Meat Science*, 62: 359-371.
- Incarpo (2014). Comunicação pessoal.
- ISO 11290-1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuff – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part1: Detection Method.
- ISO 15213:2003. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Sulfite-reducing Bacteria Growing under Anaerobic Conditions. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs_ Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronidase. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 °C. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 8589:2010. Sensory analysis. General guidance for the design of test rooms.

Jakszyn, P., Gonzalez, C. A. (2006). Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. *World Journal of Gastroenterology*, 12 (27): 4296-4303.

Jofré, A., Aymerich, T., Bover-Cid, S., Garriga, M. (2010). Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *International Microbiology*, 13: 105-112.

Jung, S., Samson, C. T., de Lamballerie, M. (2011). High hydrostatic pressure food processing. In, Proctor, A. Alternatives to conventional food processing. E.U.A.: RSC Publishing (pp. 254- 296).

Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, 36 (1-2): 169-189.

Lamballerie-Anton, M. D., Taylor, R. G., Culioli, J. (2002). High pressure processing of meat. In: Kerry, J., Kerry, J., Ledward, D. Meat processing: Improving quality. Cambridge: Woodhead Publishing Limited (pp. 313-324).

Lawrie, R. A., Ledward, D. A. (2006). Lawrie's Meat Science. Seventh Edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Le Meste, M., Roudaut, G., Champion, D., Blonde, G., Simatos, D. (2006). Interaction of water with food components. In: Gaonkar, A., McPherson, A. Ingredient interactions - Effects on food quality. Second Edition. Boca Raton: Taylor & Francis (pp. 87-138).

Leistner, L., Gould, G. (2002). Hurdle technologies - Combination treatments for food stability, safety and quality. Food engineering series. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Lidon, F., Silvestre, M., M. (2008). Conservação de Alimentos. Princípios e Metodologias. Escolar Editora, 1ª edição, Lisboa.

López-Caballero, M. E., Carballo, J., Solas, M. T., Colmenero, J. (2002). Responses of *Pseudomonas fluorescens* to combined high pressures/temperature treatments, *European Food Research and Technology*, 214: 511-515.

Marcos, B., Aymerich, T., Garriga, M. (2005). Evaluation of high pressure processing as an additional hurdle to control *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in low-acid fermented sausages. *Journal of Food Science*, 70: 339-344.

Marcos, B., Aymerich, T., Guardia, M. D., Garriga, M. (2007). Assessment of high hydrostatic pressure and starter culture on the quality properties of low-acid fermented sausages. *Meat Science*, 76: 46-53.

Marques, J., Vila-Real, H. J., Alfaia, A. J., Ribeiro, M. H. L. (2007). Modelling of the high pressure - temperature effects on naringin hydrolysis based on response surface methodology. *Food Chemistry*, 105: 504-510.

- Min, S., Zhang, Q. H. (2007). Packaging for high-pressure processing, irradiation and pulsed electric field processing. In Han, J. H. Packaging for Nonthermal Processing of Food. Blackwell Publishing. Iowa, E.U.A. (pp 67-83).
- Moerman, F., Mertens, B., Demey, L., Huyghebaert, A. (2001). Reduction of *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Streptococcus faecalis* in meat batters by temperature-high hydrostatic pressure pasteurization. *Meat Science*, 59: 115-125.
- Molina-Hoppener, A., Doster, W., Vogel, R. F., Ganzle, M. G. (2001). Protective effect of sucrose and sodium chloride on *Lactococcus lactis* during sub lethal and lethal High-pressure Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2013-2020.
- Mor-Mur, M., Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: physical properties and sensory analysis. *Meat Science*, 65: 1187-1191.
- Morrissey, P. A., Techivangana, J. Z. (1985). The antioxidant activities of nitrite and nitrosylmyoglobin in cooked meats. *Meat Science*, 14 (3):175-190.
- Mossel, D., Garcia, B. (1985). *Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*. Editorial Acribia 1ª ed. Española. Zaragoza.
- Murchie, L. W., Cruz-Romero, M., Kerry, J. P., Linton, M., Patterson, M. F., Smiddy, M., Kelly, A. L. (2005). High pressure processing of Shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6: 257-270.
- NF V09-500:2012. *Analyse sensorielle - Méthodologie - Directives générales pour la réalisation d'épreuves hédoniques effectuées avec des consommateurs dans un espace contrôlé*.
- Nguyen, L. T., Balasubramaniam, V. M. (2011). *Fundamentals of food processing using High pressure*. In, Zhang, H. Q., Barbosa-Cánovas, G., Balasubramaniam, V. M., Dunne, C. P., Farkas, D., Yuan, J. T. C. *Nonthermal processing technology for food*. Wiley. Blackwell. Iowa, E.U.A. (pp 3-19).
- Norton, T., Sun, D. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food Bioprocess Technology*, 1: 2-34.
- NP-725 (1969). *Toucinho fumado. Definição, classificação e características*.
- NP 1613 (1979). *Determinação da matéria gorda total. Método de Referência*. IPQ, Lisboa.
- NP 1614-1 (2009). *Determinação do teor de humidade. Parte 1: Método de referência*. IPQ, Lisboa.
- NP 1846 (2006). *Determinação do teor de nitritos. Método de Referência*. IPQ, Lisboa.
- NP 3441 (2008). *Medição do pH. Método de Referência*. IPQ, Lisboa.
- Olivo, R. (2006). Alterações oxidativas em produtos cárneos. In: Shimokomaki, M., Olivo, R., Terra, N. N., Franco, B. D. G. M. *Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes* (pp. 155-162).
- Orlien, V., Hansen, E., Skibsted, L. H. (2000). Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: Critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Food Research and Technology*, 211: 99-104.
- Patterson, M. (1999). High Pressure Treatment of food. In, Robinson, R. K., Batt, C. A., Patel, P. D. *Encyclopedia of food microbiology*. Reino Unido: Academic Press (pp. 1059-1065).
- Patterson, M. F. (2005). A review: Microbiology of Pressure – Treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1400-1409.
- Patterson, M. F., McKay, A. M., Connolly, M., Linton, M. (2010). Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures. *Food Microbiology*, 27 (2): 266-273.

- Pereda, J. A. O., Cosano, G. Z., Navarro, A. B., Carballeira, A. O., López, B. G. (2005). La aplicación de altas presiones en la carne. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 1: 36-71.
- Perés, D. (2013). Evolución de la implementación industrial de las altas presiones. Jornada nuevas tecnologías en seguridad e calidad de los productos lácteos. Cáceres, España.
- Porto-Fett, A. C. S., Call, J. E., Shoyer, B. E., Hill, D. E., Pshebniski, C., Cocoma, G. J., Luchansky, J. B. (2010). Evaluation of fermentation drying and/or high pressure processing on viability of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp, and *trichinella spiralis* in raw pork and genoa salami. *International Journal of Food Microbiology*, 140: 61-75.
- Préstamo, G., Fontecha, J. (2007). High pressure treatment on the tofu fatty acids and acylglycerols content. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8: 188-191.
- Ramirez-Suarez, J., Morrissey, M. T. (2006). Effect of high pressure processing (HPP) on shelf life of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) minced muscle. *Innovative Food Science and Technology*, 7: 19-27.
- Regueiro, J. A. G., Clariana, M., Diaz, I. (2008). Efecto del tratamiento con altas presiones en la composición de ácidos grasos en jamon curado loncheado. *Eurocarnes*, 163: 1-4.
- Regulamento (CE) nº 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Janeiro de 1997, relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares
- Regulamento (CE) Nº 2073/2005 Da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alfonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT, Food Science and Technology*, 44: 1251-1260.
- Richards, M. P. (2006). Lipid chemistry and biochemistry. In: Hui, Y. *Handbook of food science technology and engineering*. Volume 1. Taylor & Francis (pp. 8.1-8.21).
- Rodríguez-Alcalá, L. M., Harte, F., Fontecha, J. (2009). Fatty acid profile and CLA isomers content of cow, ewe and goat milks processed by high pressure homogenization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10, 32-36.
- Roncalés, P. (2007) Additives. In Toldrá, F, *Handbook of fermented meat and poultry*. Blackwell Publishing. Iowa, E.U.A. (pp. 77-86).
- Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán M. D., Rovira, J., Jaime, I. (2007b). Effect of High pressure preservation on quality of dry cured beef “Cecina de Leon”. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8: 102-110.
- Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán, M. D., Rovira, J., Jaime, I. (2007a). The effects of high pressure treatment and of storage periods on the quality of vacuum-packed “salchichón” made of raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 180-187.
- Ruiz de Huidobro E., Miguel, B., Blazquez, E., Onega, A. (2005). Comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Science*, 69: 527-536.
- Ruiz-Capillas, C., Colmenero, J. F., Carrascosa, A. V., Muñoz, R. (2007). Biogenic amine production in Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high- pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*, 77: 365-371.
- Sablani, S., Kasapis, S., Rahman, M. (2007). Evaluating water activity and glass transition concepts for food stability. *Journal of Food Engineering*, 78 (1): 57-62.

- Sangronis, E., Pothakamury, U., Ramos, A. M., Ibaraz, A., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. (1997). La Alta Presion Hidrostatica: Una alternativa en el processamiento no térmico de alimentos. *Alimentaria*, 33: 33-43.
- Sebranek, J. G., Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?. *Meat Science*, 77: 136-147.
- Serra, X., Grebol, N., Guàrdia, M. D., Guerrero, L., Gou, L., Masoliver, P., Gassiot, M., Sárraga, C., Monfort, J. M., Arnau, J. (2007). High pressure applied to frozen ham at different process stages. 2. Effect on the sensory attributes and on the colour characteristics of dry-cured ham. *Meat Science*, 75: 21-28.
- Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiological of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 152-158.
- Stone, H., Sidel, J. (1993). *Sensory evaluation practices*. Academic Press, 2 ed. New York.
- Tanzi, E., Sacconi, G., Barbuti, S., Grisenti, M. S., Lori, D., Bolzoni, S., Parolari, G. (2004). High-pressure treatment of raw ham. Sanitation and impact on quality. *Industria Converse*, 79 : 37-50.
- Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez-Lámela, C., Vázquez, M., Simal-Gándarra, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 3: 66-80.
- Torres, J. A., Velazquez, G. (2005). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2): 95-112.
- Vandendriessche, F. (2008). Meat products in the past, today and in the future. *Meat Science*, 78: 104-113.
- Vignolo, G., Fontana, C., Fadda, S. (2010). Semidry and dry fermented sausages. In, Toldrá, F. *Handbook of meat processing*. Willey- Blackwell. Iowa, E.U.A. (pp.379-398).
- Wang, B., Pace, R., Dessai, A., Bovell-Benjamin, A., Phillips, B. (2002). Modified extraction method for determining 2-Thiobarbituric acid values in meat with increases specificity and simplicity. *Journal of Food Science*, 67 (8): 2883-2836.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science* 86 (1): 196-213.
- Yordanov, D. G., Angelova, G. V. (2010). High pressure processing for foods preserving. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24 (3): 1940-1945.
- Yuste, J., Pla, R., Capellas, M., Ponce, E., Mor-Mur, M. (2000). High-pressure processing applied to cooked sausages: bacterial populations during chilled storage. *Journal of Food Protection*, 63 (8): 1093-1099.
- Zhou, G. H., Xu, X. L., Liu, Y. (2010). Preservation Technologies for fresh meat: A review. *Meat Science*, 86: 119-128.

ANEXOS

ANEXO I



CENTRO DE APOIO
TECNOLÓGICO
AGRO-ALIMENTAR

NOME: _____

Data: _____

Código da amostra : _____

1. Observe a amostra.

Considerando o aspeto, comprava o produto? (assinale a opção com x)

Sim Não

Se não comprasse, porque é que não comprava?

2. Prove o produto.

Qual o nível de satisfação global? (assinale a opção com x)

- Extremamente desagradável
- Não gosto
- Indiferente
- Gosto
- Extremamente agradável

Depois de provar, comprava o produto? (assinale a opção com x)

Sim Não

Se não comprasse, porque é que não comprava?

ANEXO II



FOLHA DE PROVA DE ORDENAÇÃO

Nome: _____ Sexo: _____ Idade: _____

E-mail: _____ Data: _____

Gostou do produto que provou? (assinale com x a sua opção)

Código	Sim	Não
C 472		
F 691		
A 216		

Por favor, ordene as amostras que lhe são apresentadas por ordem crescente de **PREFERÊNCIA GLOBAL**.

	PREFERÊNCIA GLOBAL		
	Menos		Mais
Código amostra			



Relativamente ao produto que selecionou como o seu preferido:

O que gostou mais?

- _____
- _____
- _____
- _____
- _____

O que gostou menos?

- _____
- _____
- _____
- _____
- _____

ANEXO III

Anexo III.1: *p-Value* para a comparação das proporções de consumidores que compravam o bacon no Dia 0, com base na apreciação visual na prova de aceitação para um nível de confiança de 95 % (Teste z).

Dia 0	Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Controlo	-		
HPP	0.1382	-	
S/Nitr + HPP	0.0062	0.0001	-

ANEXO III.2: Comentários dos consumidores que considerando o aspeto, não compravam o produto no Dia 0.

Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Porque tem um aspeto cru.	Muito liquido no interior da embalagem, cor do produto muito escura. Não tem muito bom aspeto.	Tem mau aspeto.
O gás dentro da embalagem faz com que o produto se movimente, ficando o plástico interior com gordura - desagradável à vista e dificultando a perceção da cor e do aspeto de forma geral.	Se houvesse outra escolheria com certeza. A forma como está embalado tem melhor aspeto mas mesmo assim está amontoado.	Por apresentar uma coloração esbranquiçada e ser extremamente mole ao toque. À primeira vista não apresenta aspeto agradável.
Da forma como está embalado não comprava dá aspeto de "desleixo".	Aspeto não muito agradável. Demasiada gordura aparentemente.	Não tem bom aspeto, parece estragado, amarelo , muita gordura.
A embalagem não tem vácuo.	Tonalidade brilhante à superfície da carne. Quantidade de gordura menos que a amostra anterior.	Mau aspeto geral, especialmente das gorduras.
Excesso de gordura, cor esbranquiçada.	Aspeto visual da embalagem. Sem qualquer informação do produto.	Devido ao aspeto, parece produto estragado.
Mau aspeto da qualidade do fatiamento.		Coloração do produto, aspeto geral desagradável, consistência mole.

Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Tem um aspeto muito gorduroso.		Só comprava se a embalagem fosse opaca e não conseguisse visualizar o produto.
A embalagem não é apelativa. O bacon não tem bom aspeto. Não tem qualquer informação relativa ao produto.		Considero que a cor tem muito mau aspeto.
A periferia está com um aspeto mais seco do que as zonas interiores. Não há distinção da cor entre a carne e a gordura. Tem aglomerados de sal à superfície. Tem um mau aspeto generalizado.		Ausência de cor típica do bacon (vermelho). A ausência de vácuo leva a que o produto entre em contacto com o plástico interior e dificulte a perceção (cor e aspeto global). Presença de gordura no plástico interior desagradável.
		Tem mau aspeto e tem "líquido" dentro da embalagem.
		Extremamente desagradável ao olhar.
		Cor muito branca que associa a gordura, líquido acastanhado dentro da embalagem.
		Mau aspeto.
		Aspeto visual da embalagem do bacon. Produto sem qualquer informação. Aspeto viscoso do bacon.
		Os elementos verdes que estão dentro da embalagem dão a ideia que o bacon não esteja nas melhores condições de conservação. Tem um aspeto geral muito mau.

Anexo III.3: *p-Value* para a comparação das proporções de consumidores que compravam o bacon no Dia 0, depois de provar na prova de aceitação para um nível de confiança de 95 % (Teste z).

Dia 0	Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Controlo	-		
HPP	0.2975	-	
S/Nitr + HPP	0.0036	0.0002	-

ANEXO III.4: Comentários dos consumidores que após provar, não compravam o produto no Dia 0.

Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
O sabor não me satisfaz, parece-me um pouco seco.	Tem pouco sal.	Sabe mal.
É um pouco salgado e gorduroso.		Sabor ligeiramente salgado, apresenta-se "mole" ao mastigar.
Porque mesmo não tendo um sabor desagradável, "o sabor agradável" não supera o mau aspeto do produto na altura da compra. Nota: o aspeto melhora consideravelmente quando confeccionado.		Sabor pouco agradável, textura mole.
		Porque tem mais gordura.
		Sem sabor .
		Não tem sabor , e podia apresentar também uma cor mais apelativa.
		Muito seco.
		Aspeto visual mesmo depois de cozinhado. Sabor pouco agradável. Gorduroso.
		O mau aspeto do produto embalado não supera o sabor .

Anexo III.5: *p-Value* para a comparação das proporções de consumidores que compravam o bacon no Dia 60, com base na apreciação visual na prova de aceitação para um nível de confiança de 95 % (Teste z).

Dia 60	Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Controlo	-		
HPP	0.0938	-	
S/Nitr + HPP	< 0.0001	0.0021	-

ANEXO III.6: Comentários dos consumidores que considerando o aspeto, não compravam o produto no Dia 60.

Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Aspeto gorduroso, bacon "esfarelado".	Tem aspeto de produto que começa a degradar.	Não apresenta a cor normal do bacon.
A embalagem continha ar e não permitia uma visualização correta do produto (aspeto búzio).	Tem sinais castanho escuros e zonas brilhantes, não tem aspeto natural do bacon.	Tem um aspeto muito gorduroso e umas partes escuras , que dão mau aspeto ao produto.
Não tem vácuo.		Coloração esbranquiçada.
Aspeto não muito agradável.		Muita gordura, manchas castanhas .
Mau aspeto, muito seco.		Cor castanha, gorduroso.
Parece que a embalagem perdeu o vácuo e que tem algum problema.		Aspeto de produto estragado, em estado de decomposição.
		Coloração diferente da habitual e o aspeto em geral não é agradável.
		Não gosto do aspeto.
		Mau aspeto sobretudo ao nível da cor .
		Não tem uma cor agradável.
		Cor muito castanha, tem muita gordura.
		Devido à coloração e excesso de gordura, bem como líquido existente.

Anexo III.7: *p-Value* para a comparação das proporções de consumidores que compravam o bacon no Dia 60, depois de provar na prova de aceitação para um nível de confiança de 95 % (Teste z).

Dia 60	Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Controlo	-		
HPP	0.1492	-	
S/Nitr + HPP	0.0075	0.0003	-

ANEXO III.8: Comentários dos consumidores que após provar, não compravam o produto no Dia 60.

Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
O sabor não é intenso, não parece fumado.		Sem sabor , falta de sal
Consistência demasiado plástica		Textura mole
		Pouco sabor , muito gorduroso
		Muita gordura, sem sabor
		Sabor menos agradável, consistência muito mole
		Não tem tanto sabor e não tem uma cor tão apelativa
		Cor muito pálida, textura mais fibrosa
		Gorduroso e com pouco sabor a bacon
		Conhecendo outros produtos de mercado este não compraria. Gosto de sabores mais intensos, tal como o das amostras anteriores

ANEXO IV

Anexo IV.1: *p-Value* para a comparação das proporções de consumidores que gostaram do produto que provaram no Dia 0, na prova de ordenação para um nível de confiança de 95 % (Teste z).

Dia 0	Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Controlo	-		
HPP	> 0.9999	-	
S/Nitr + HPP	0.0331	0.0331	-

Anexo IV.2: *p-Value* para a comparação das proporções de consumidores que gostaram do produto que provaram no Dia 60, na prova de ordenação para um nível de confiança de 95 % (Teste z).

Dia 60	Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Controlo	-		
HPP	0.2979	-	
S/Nitr + HPP	0.0007	0.0001	-

ANEXO IV.3: Valores das ordenações dados pelos consumidores no Dia 0 após degustação. Somatório, média e *p-Value* para a comparação dos tratamentos para um nível de confiança de 95 % (Teste Friedman).

Consumidor	Tratamento		
	Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
1	3	2	1
2	3	2	1
3	2	3	1
4	2	3	1
5	3	2	1
6	3	1	2
7	3	2	1
8	1	2	3
9	1	2	3
10	3	2	1
11	3	2	1
12	3	1	2
13	2	3	1
14	2	1	3
15	2	3	1
Somatório	36	31	23
Média	2,40	2,07	1,53
<i>p-Value</i>	0,057		

ANEXO IV.4: Comentários dos consumidores sobre o que mais e menos gostaram relativamente ao produto que selecionaram como preferido no Dia 0.

	O que gostou mais	O que gostou menos
Controlo	Sabor Textura. Tempero.	Gordura.
	Sabor teor de sal.	Gordura em excesso.
	Mais sabor. Aromas muito equilibrados. Boa percentagem de gordura.	Temperatura baixa. Aspeto muito gordo.
	Textura.	
	Cor. Sabor. Aspeto. Aroma.	
	O paladar. A textura.	
	Estar estaladiço. Crocante. Salgado. O aspeto.	
	Aspeto. Sabor. Estaladiço.	
HPP		O aspeto.
	Crocante. Aspeto.	Quantidade de gordura.
	Sabor a fumado. Sabor salgado. Suculento. Tenro.	
S/Nitr + HPP	Estaladiço. Sabor agradável. Coloração adequada.	Alguma gordura.
	Produto mais equilibrado. < Concentração de sal. Sabor muito agradável. Amostra com proporções de gordura e carne correto.	Nada a apontar.
	O sabor.	O aspeto.

ANEXO IV.5: Valores das ordenações dados pelos consumidores no Dia 60 após degustação. Somatório, média e *p-Value* para a comparação dos tratamentos para um nível de confiança de 95 % (Teste Friedman).

Consumidor	Tratamento		
	Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
1	1	3	2
2	1	3	2
3	2	3	1
4	3	1	2
5	1	3	2
6	2	3	1
7	2	3	1
8	2	3	1
9	2	3	1
10	2	3	1
11	2	3	1
12	2	3	1
13	2	3	1
14	2	3	1
15	3	1	2
Somatório	29	41	20
Média	1,93	2,73	1,33
p-Value	0,001		

ANEXO IV.6: *p-Value* para a comparação das ordenações dos tratamentos pelos consumidores após degustação no Dia 60, para um nível de confiança de 95 % (Teste Friedman).

Tratamento	Controlo	HPP	S/Nitr + HPP
Controlo	-		
HPP	0,005	-	
S/Nitr + HPP	0,02	0,005	-

ANEXO IV.7: Comentários dos consumidores sobre o que mais e menos gostaram relativamente ao produto que selecionaram como preferido no Dia 60.

	O que gostou mais	O que gostou menos
Controlo	Tem um sabor agradável, não é salgado	
	Aspeto, sabor	
HPP	O aspeto apelativo. O sabor salgado ao ponto. O sabor crocante.	
	Sabor a fiambre fresco, gostei de uma forma geral	
	Cor e sabor	
	Aspeto, cor, sabor e textura	Excesso de gordura
	Sabor a bacon, textura e cor	
	Sabor, textura e gordura q. b.	Quantidade de sal elevada
	Sabor , consistência	
	Sabor, textura e cor	Ligeiramente salgado
	Sabor salgado e aspeto	
	Sabor a carne, equilibrado de sal (para bacon) e alguma gordura, bastante saboroso	Muito duro
	Aspeto e paladar	
	Sabor , teor de sal e textura crocante	
	Sabor e consistência crocante	Gorduroso