



Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia

EVOLUÇÃO DO TEOR DE NITRITOS E DE NITRATOS E DA CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS NO FIAMBRE E NA MORTADELA AO LONGO DO SEU PROCESSO PRODUTIVO E DO SEU PRAZO DE VIDA ÚTIL

Filipa Margarida Castanheiro Ganhão

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando
Co-orientador: Dr. Armindo Carrasco Lourenço

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes - FCT/UNL
Arguente: Doutor Fernando José Cebola Lidon - FCT/UNL
Vogais: Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves – FCT/UNL
Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando - FCT/UNL
Dr. Armindo Carrasco Lourenço – Empresa X

Outubro de 2010

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Grupo de Disciplinas de Ecologia e Hidrosfera

**EVOLUÇÃO DO TEOR DE NITRITOS E DE NITRATOS E DA
CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS NO FIAMBRE E NA
MORTADELA AO LONGO DO SEU PROCESSO
PRODUTIVO E DO SEU PRAZO DE VIDA ÚTIL**

Filipa Margarida Castanheiro Ganhão

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção
do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadores:

Professora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando (Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa)

Dr. Armindo Lourenço (Empresa X)

Monte da Caparica

2010

“Evolução do teor de nitritos e de nitratos e da concentração de pigmentos no fiambre e na mortadela ao longo do seu processo produtivo e do seu prazo de vida útil” © Filipa Margarida Castanheiro Ganhão, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos terão de ser dirigidos, em primeiro lugar, à empresa X, pela forma como colocou à minha disposição todos os meios técnicos e humanos e sem a qual não teria sido possível a realização desta tese.

Foram muitas as pessoas que me apoiaram na execução deste trabalho e a quem estou profundamente grata. Não pretendendo esquecer ninguém torna-se, no entanto, importante que algumas delas sejam aqui salientadas pelo seu contributo para o desenvolvimento do trabalho agora apresentado.

À Professora Benilde Mendes, Professora Coordenadora do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, agradeço por ter aprovado de bom agrado o tema desta tese e por zelar pelos interesses dos seus alunos de Mestrado.

À orientadora interna, Professora Ana Luísa da Cruz Fernando, começo por agradecer a confiança, a amizade e o apoio que, no meio dos seus muitos afazeres, me proporcionou. Agradeço-lhe igualmente todos os conhecimentos transmitidos no decorrer deste processo e que contribuíram para a minha formação.

Ao orientador externo, Dr. Armindo Lourenço, agradeço os conhecimentos transmitidos no decorrer deste trabalho e a disponibilidade e simpatia com que sempre me recebeu.

Aos colaboradores do Departamento da Qualidade da empresa X, Fátima Fernandes, Paula Ferreira, Joana Mendes, Selene Duarte e Rui Oliveira, reservo um muito obrigada pela forma com que me receberam no seu grupo de trabalho e me ajudaram a contornar as dificuldades.

À Ana Isabel Chibeles por interceder por mim junto da empresa X e pelo carinho sempre demonstrado.

Às amigas Marlene Remédios, Tânia Madeira e Mónica Marmelo por estarem sempre presentes quando necessito delas e pelos bons momentos que passamos juntas.

Por último, e não sendo os menos importantes, aos meus pais, irmão e restante família e ao Gil pelo apoio e pela força que sempre me deram para concluir este mestrado.

RESUMO

O nitrito e o nitrato são substâncias utilizadas em formulações de cura para carnes com o intuito de estabilizar a cor característica dos produtos cárneos, de inibir o crescimento e a formação de toxinas por alguns microrganismos patogénicos e de contribuir para o desenvolvimento do sabor.

Por se tratar de um tema actual este trabalho pretendeu criar novas oportunidades para se explorar outras vertentes do uso de conservantes em produtos cárneos.

Neste trabalho experimental analisou-se a evolução do teor de nitritos e de nitratos em fiambre da perna extra e em mortadela do tipo Bolonhesa, produzidos pela empresa X, ao longo do seu processo produtivo e do seu prazo de vida útil. Pretendeu-se com este estudo, verificar se ao longo do prazo de vida útil do produto, os teores presentes nas amostras analisadas se encontram dentro dos limites estabelecidos pela legislação nacional e se os teores existentes ainda asseguram a inibição do crescimento de *Clostridium botulinum*. O conhecimento da evolução dos teores de nitritos e nitratos, ao longo do prazo de vida útil do produto, permite também à indústria perceber se há possibilidade de reduzir os teores que actualmente são adicionados, sem haver perda das características do produto, assegurando ao mesmo tempo que o alimento é seguro para o consumidor.

No caso do fiambre da perna extra as determinações demonstraram que o teor médio de nitritos vai diminuindo, enquanto o teor médio de nitratos vai oscilando ao longo do tempo. Já no caso da mortadela do tipo Bolonhesa verifica-se que o teor médio de nitritos vai diminuindo, enquanto o teor médio de nitratos vai aumentando. Foi possível comprovar que os teores presentes nas amostras analisadas se encontram dentro dos limites estabelecidos pela legislação nacional. Através do estudo efectuado pôde perceber-se que o teor mínimo de nitrito, que assegura o retardamento do crescimento de *Clostridium botulinum*, ainda está presente no 48º dia de prazo de vida útil para o fiambre e no 49º dia para a mortadela.

No decorrer do trabalho experimental estudou-se também a evolução da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais nos mesmos produtos. Verificou-se que a diminuição do teor médio de nitrito leva ao aumento da concentração média de nitroso-pigmentos no fiambre da perna extra; já na mortadela do tipo Bolonhesa a diminuição do teor médio de nitrito leva à diminuição da concentração média de nitroso-pigmentos. Em ambos os produtos, a concentração média de pigmentos totais vai diminuindo ao longo do tempo.

No âmbito deste trabalho pretendeu-se também definir um modelo matemático que descreva o comportamento médio da evolução dos parâmetros em análise. A função que melhor explica a evolução do teor médio de nitritos e da concentração média de pigmentos totais é a logarítmica; já a evolução do teor médio de nitratos e da concentração média de nitroso-pigmentos é melhor definida por uma função linear; no entanto, para qualquer dos parâmetros em estudo, os coeficientes de correlação obtidos são muito reduzidos. É necessário estudar outras funções que possam descrever melhor a evolução dos parâmetros em análise.

Palavras-chave: nitrito, nitrato, nitroso-pigmentos, pigmentos totais, fiambre e mortadela.

ABSTRACT

Nitrite and nitrate are substances used in curing formulations for meats in order to stabilize the characteristic color of meat products, to inhibit the development of certain pathogens and to contribute for the development of the flavor.

In this experimental work, the evolution of the content of nitrites and nitrates in ham and bologna sausage type produced by the company X, were analyzed along the production process and shelf-life. The aim of the study is to verify, along the production process and until the expiring date, if the nitrite and nitrate content are within the limits established by the law and if they still inhibit the development of *Clostridium botulinum*. Advanced knowledge on this evolution, may allow the industry to reduce the actual quantity of nitrites added to the products, assuring at the same time, that the product is safe for the consumer without losing its characteristics.

All the measurements showed that the average content of nitrite in ham tends to decrease over time and the average content of nitrate oscillate over time. In the case of the bologna type sausage, the average content of nitrite decreased, while the average content of nitrates increased. It was possible to demonstrate that the contents present in the samples were within the limits set by national legislation. The minimum content of nitrite, that assures retardation of *Clostridium botulinum* growth, was still present on the 48th day, for the ham, and on the 49th day, for the bologna type sausage, of its shelf life.

During the experimental work, the evolution of the nitrous pigments content and of the total pigments content, in the same products, was also studied. The decrease in nitrite content in ham, led to the increment of the nitrous pigments content. In the bologna type sausage, along with the reduction of nitrite, it was also verified the reduction of the nitrous pigments content. Total pigments content decreased along the life cycle of both products.

The mathematical function that better describes the evolution of the nitrites content and the concentration of total pigments is the logarithmic, while the evolution of the nitrates content and the total pigments concentration is better described by a linear function; yet, for the studied parameters, the obtained correlation coefficients are very low. It is necessary to study other functions that may describe better the evolution of the analysed parameters.

Keywords: nitrite, nitrate, nitrous pigments, total pigments, ham, bologna type sausage.

ÍNDICE DE MATÉRIAS

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE MATÉRIAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
LISTA DE SIGLAS UTILIZADA	xiii
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Carne e produtos cárneos	1
1.2 Nitritos	9
1.2.1 Formação e estabilidade da cor dos produtos cárneos curados.....	10
1.2.2 Outras funções tecnológicas do nitrito.....	18
1.2.3 Função de conservação	19
1.2.4 O nitrito e o nitrato nos produtos cárneos.....	21
1.2.4.1 Quantidade de nitrito que reage na carne.....	21
1.2.4.2 Concentração de nitrito e de nitrato presente nos produtos cárneos curados	22
1.2.4.3 Alterações da concentração de nitrito e de nitrato ao longo do tempo	22
1.2.5 Formação de nitrosaminas e efeitos sobre a saúde	23
1.2.6 Legislação.....	26
2. METODOLOGIA	27
2.1 Amostras analisadas	28
2.2 Reagentes usados.....	29
2.2.1 Determinação do teor de nitritos e de nitratos	29
2.2.2 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos.....	30
2.2.3 Determinação da concentração de pigmentos totais	30
2.3 Equipamentos e material usados.....	30
2.4 Procedimento experimental	30
2.4.1 Calibração do espectrofotômetro	30
2.4.2 Preparação da amostra.....	31
2.4.3 Determinação do teor de nitritos	32
2.4.4 Determinação do teor de nitratos	32
2.4.4.1 Pré-tratamento da coluna de cádmio.....	33
2.4.4.2 Verificação do poder redutor da coluna de cádmio.....	33

2.4.4.3 Redução dos nitratos da amostra.....	34
2.4.5 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais	35
2.4.5.1 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos	35
2.4.5.2 Determinação da concentração de pigmentos totais	35
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	36
3.1 Determinação do teor de nitritos e de nitratos.....	36
3.1.1 Calibração.....	36
3.1.2 Análise das amostras de fiambre e de mortadela.....	38
3.1.2.1 Cálculo do teor de nitritos e de nitratos	38
3.1.2.2 Determinação do teor de nitritos e de nitratos do fiambre da perna extra .	39
3.1.2.3 Determinação do teor de nitritos e de nitratos da mortadela do tipo Bolonesa	49
3.2 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais.....	58
3.2.1 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais do fiambre da perna extra	58
3.2.2 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais da mortadela do tipo Bolonesa.....	68
4. CONCLUSÃO	79
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
6. ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Fiambre na forma de bloco e de fatias	3
Figura 1.2 Fluxograma de fabrico industrial de fiambre da perna extra.	5
Figura 1.3 Fluxograma usado para a obtenção de produtos cárneos fatiados	6
Figura 1.4 Mortadela fatiada	7
Figura 1.5 Fluxograma de fabrico industrial de mortadela	8
Figura 1.6 Estrutura molecular de sais de sódio e de potássio	9
Figura 1.7 Estrutura ternária da mioglobina e estrutura quaternária da hemoglobina	10
Figura 1.8 Grupo heme da molécula de mioglobina onde se podem observar as quatro ligações dos quatro átomos de azoto do núcleo porfirínico ao ferro	11
Figura 1.9 Corte de carne fresca onde se pode observar a cor vermelha púrpura escura conferida pela mioglobina.....	11
Figura 1.10 Corte de carne fresca onde se pode observar a tonalidade vermelha brilhante conferida pela oximioglobina	12
Figura 1.11 Corte de uma peça de carne possuindo a cor acastanhada à sua superfície conferida pela metamioglobina.....	12
Figura 1.12 Reacções de interconversão entre as diferentes formas de mioglobina.....	13
Figura 1.13 Reacções que ilustram a formação de HNO_2	14
Figura 1.14 Reacções que ilustram a formação de nitrosilhemocromo	14
Figura 1.15 Reacção paralela do NO_2 e conseqüente formação de NO_3^-	14
Figura 1.16 Reacção de formação de NO na presença de ascorbato	15
Figura 1.17 Reacção de formação de NO em tecidos cárneos oxigenados	15
Figura 1.18 Corte de uma peça de carne onde se pode observar à sua superfície a cor rosada, característica dos produtos cárneos curados, conferida pelo nitrosilhemocromo.....	16
Figura 1.19 Mecanismo proposto para o processo de cura dos produtos cárneos curados.....	17
Figura 1.20 Reacção de redução do NaNO_3 a NaNO_2 por acção de bactérias.....	19
Figura 1.21 Reacções que descrevem a oxidação do HNO_2 e conseqüente formação do HNO_3	21
Figura 1.22 Reacção de van Slyke que descreve a formação de azoto gasoso a partir de HNO_2 , em que R representa um grupo que contenha C e H (grupo alquilo).....	22

Figura 1.23 Reacção química que pode provocar metahemoglobinemia nos humanos	24
Figura 1.24 Reacções químicas que descrevem a formação de nitrosaminas	25
Figura 2.1 Estrutura da molécula de hematina	27
Figura 2.2 Mecanismo de redução de nitratos a nitritos numa coluna de cádmio	32
Figura 3.1 Gráfico representativo da evolução do teor de nitritos (expresso em mg NaNO_2/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados	42
Figura 3.2 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único ao teor de nitritos dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo	42
Figura 3.3 Gráfico da evolução do teor médio de nitritos (expresso em mg NaNO_2/kg) ao longo do tempo do fiambre da perna extra em estudo	43
Figura 3.4 Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento do teor médio de nitritos (expresso em mg NaNO_2/kg) ao longo do tempo para o fiambre da perna extra analisado	45
Figura 3.5 Gráfico representativo da evolução do teor de nitratos (expresso em mg NaNO_3/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados	46
Figura 3.6 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único ao teor de nitratos dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo	46
Figura 3.7 Gráfico da evolução do teor médio de nitratos (expresso em mg NaNO_3/kg) ao longo do tempo do fiambre da perna extra analisado	47
Figura 3.8 Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento do teor médio de nitratos (expresso em mg NaNO_3/kg) ao longo do tempo para o fiambre da perna extra analisado	48
Figura 3.9 Gráfico representativo da evolução do teor de nitritos (expresso em mg NaNO_2/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados	51
Figura 3.10 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único ao teor de nitritos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo	51
Figura 3.11 Gráfico da evolução do teor médio de nitritos (expresso em mg NaNO_2/kg) ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo	52
Figura 3.12 Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento do teor médio de nitritos (expresso em mg NaNO_2/kg) ao longo do tempo para a mortadela do tipo Bolonhesa analisada	54
Figura 3.13 Gráfico representativo da evolução do teor de nitratos (expresso em mg NaNO_3/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados	55
Figura 3.14 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único ao teor de nitratos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo	55
Figura 3.15 Gráfico da evolução do teor médio de nitratos (expresso em mg NaNO_3/kg) ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo	56
Figura 3.16 Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento do teor médio de nitratos (expresso em mg NaNO_3/kg) ao longo do tempo para a mortadela do tipo Bolonhesa analisada	57
Figura 3.17 Gráfico representativo da evolução da concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados	61

Figura 3.18 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único à concentração de nitroso-pigmentos dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo	61
Figura 3.19 Gráfico da evolução da concentração média de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo do fiambre da perna extra em estudo	62
Figura 3.20 Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo para o fiambre da perna extra analisado.....	63
Figura 3.21 Gráfico representativo da evolução da concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados	64
Figura 3.22 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único à concentração de pigmentos totais dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo	64
Figura 3.23 Gráfico da evolução da concentração média de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo do fiambre da perna extra analisado	65
Figura 3.24 Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo para o fiambre da perna extra analisado	66
Figura 3.25 Gráfico representativo da evolução da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados	67
Figura 3.26 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo	67
Figura 3.27 Gráfico da evolução da percentagem média de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo do fiambre da perna extra em análise	68
Figura 3.28 Gráfico representativo da evolução da concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados.....	71
Figura 3.29 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único à concentração de nitroso-pigmentos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo	71
Figura 3.30 Gráfico da evolução da concentração média de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo	72
Figura 3.31 Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo para a mortadela do tipo Bolonhesa analisada.....	73
Figura 3.32 Gráfico representativo da evolução da concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados.....	74
Figura 3.33 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único à concentração de pigmentos totais dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo	74
Figura 3.34 Gráfico da evolução da concentração média de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa analisada.....	75
Figura 3.35 Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo para a mortadela do tipo Bolonhesa analisada.....	76

Figura 3.36 Gráfico representativo da evolução da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados 77

Figura 3.37 Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA - factor único à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo ... 77

Figura 3.38 Gráfico representativo da evolução da percentagem média de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em análise 78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Dados referentes à análise dos padrões e respectiva equação da recta do tipo $y = mx + b$, sendo y a absorvância medida ao λ de 538 nm e x a concentração dos padrões	36
Tabela 3.2 Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO_2/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO_3/kg) do lote 1 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental	40
Tabela 3.3 Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO_2/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO_3/kg) do lote 2 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental	40
Tabela 3.4 Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO_2/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO_3/kg) do lote 3 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental	41
Tabela 3.5 Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO_2/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO_3/kg) do lote 1 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental	49
Tabela 3.6 Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO_2/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO_3/kg) do lote 2 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental	50
Tabela 3.7 Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO_2/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO_3/kg) do lote 3 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental	50
Tabela 3.8 Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg), à concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 1 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental	59
Tabela 3.9 Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg), à concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 2 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental	59
Tabela 3.10 Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg), à concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 3 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental	60
Tabela 3.11 Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg), à concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 1 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental	69
Tabela 3.12 Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg), à concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 2 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental	69
Tabela 3.13 Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg), à concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 3 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental	70

LISTA DE SIGLAS USADAS

μg – micrograma;

Abs - absorvância;

ADI - dose diária aceitável;

ADP – adenosina difosfato;

ASC – ascorbato de sódio;

ATP - adenosina trifosfato;

c - concentração, expressa em microgramas de nitrito de sódio por mililitro, determinada na recta de calibração correspondente à absorvância da solução em análise, e neste caso, dada automaticamente pelo equipamento espectrofotométrico usado;

C_{NaNO_2} - corresponde ao teor de nitrito da amostra, expresso em miligramas de nitrito de sódio por quilograma, determinado de acordo com a norma NP 1846:2006;

$C_{\text{nitroso-pigmentos}}$ - corresponde ao teor de nitroso-pigmentos, expresso em miligramas de nitroso hematina por quilograma de amostra;

conc. – concentração;

$C_{\text{pigmentos totais}}$ - corresponde ao teor de pigmentos totais, expresso em miligramas de pigmento heme total por quilograma de amostra;

EDTA – ácido etilenodiaminatetracético;

g – grama;

HNO_2 – ácido nitroso;

HNO_3 – ácido nítrico;

kg – quilograma;

KNO_2 – nitrito de potássio.

KNO_3 – nitrato de potássio;

m - massa, expressa em gramas, da toma para análise;

mg – miligrama;

mL – mililitro;

N_2O_3 – trióxido de azoto;

$NaCl$ – cloreto de sódio;

$NaNO_2$ – nitrito de sódio;

$NaNO_3$ – nitrato de sódio;

nm – nanómetro;

NO – óxido nítrico;

NO_2 – dióxido de azoto;

NO_2^- - ião nitrito;

NO_3^- - ião nitrato;

pr - concentração, em microgramas de nitrito de sódio por mililitro, determinada na recta de calibração correspondente à absorvância da solução referente ao poder redutor da coluna de cádmio;

R^2 - coeficiente de correlação;

v - volume, expresso em mililitros, do filtrado obtido para cada toma;

λ – comprimento de onda.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A população mundial tem sofrido um crescimento explosivo, estando inerente a esta situação a necessidade do aumento da disponibilidade de produtos alimentares que colmatem as carências nutricionais dos indivíduos. No entanto, devido aos conhecimentos técnicos dos países serem distintos, às extensões territoriais apresentarem grandes diferenças na capacidade produtiva e à elevada perecibilidade dos produtos agro-pecuários, a tecnologia dos alimentos tornou-se uma peça importante no xadrez do consumo alimentar mundial. A tecnologia de alimentos mantém um vínculo entre a produção e o consumo de produtos alimentares e ocupa-se da sua adequada manipulação, elaboração, conservação, armazenamento e distribuição, estando associada aos métodos de produção agrícola e industrial, bem como aos princípios e práticas da nutrição humana (Gava *et al*, 2008). Um dos possíveis exemplos da sua aplicação é a produção de produtos cárneos.

1.1 Carne e produtos cárneos

Os produtos cárneos são caracterizados por serem alimentos preparados total ou parcialmente com carne, subprodutos e gordura de animais de abate e outras espécies, possivelmente com adição de ingredientes de origem vegetal, de condimentos, de especiarias e de aditivos alimentares¹ (Lidon e Silvestre, 2007). Mas segundo o ponto de vista tecnológico como se define “carne”?

O músculo vivo é um tecido altamente especializado. Uma vez que as funções vitais do sistema muscular do animal não cessam no momento da sua morte, a conversão do músculo em carne está associada a modificações bioquímicas e estruturais que ocorrem após o seu abate. Na sequência desta fase dá-se a interrupção do fluxo sanguíneo e conseqüentemente, bloqueia-se a movimentação de nutrientes e a excreção de metabolitos (Mantese, 2002; Lidon e Silvestre, 2008). Com a morte do animal ficam disponíveis três fontes de energia, nomeadamente a adenosina trifosfato (ATP), a fosfocreatina e o glicogénio. Uma vez que tanto o ATP como a fosfocreatina se encontram em pequena concentração no músculo, o glicogénio converte-se na principal fonte de energia para a glicólise (processo que envolve as etapas de conversão do glicogénio em ácido pirúvico ou em ácido láctico). Com a interrupção do fornecimento de oxigénio, a síntese de ATP converte-se num processo estritamente anaeróbio: dá-se a fosforilação glicolítica a partir da fosfocreatina por acção da adenilato quinase muscular. Nestas condições o ácido pirúvico é reduzido a ácido láctico. A formação de ácido láctico fornece energia para a regeneração da fosfocreatina, permitindo a contracção muscular. No entanto, uma vez que o fluxo sanguíneo foi interrompido, o ácido láctico produzido tende a acumular-se no músculo *post-mortem*, levando à diminuição do pH. O abaixamento do pH inactiva progressivamente o complexo troponina, levando por sua vez a um aumento da actividade da miosina-ATPase e da hidrólise de ATP (Mantese, 2002; Lidon e Silvestre, 2008).

Ao longo do processo que sucede ao abate do animal tende a ocorrer um aumento progressivo na taxa glicolítica até atingir o pH que origina a perda de resistência das membranas celulares: o

¹ Os aditivos alimentares são substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos para conservar, intensificar ou modificar as suas propriedades, desde que não diminuam o seu valor nutritivo.

músculo perde a sua capacidade de contracção e dá-se a livre passagem de iões através das membranas. Como consequência deste fenómeno resulta a uniformização do pH em todos os tecidos. A partir daqui, a velocidade da glicólise vai diminuindo, até que as reservas de glicogénio se esgotem ou até que o pH atinja um valor inferior a 5,4, para que ocorra a inibição das enzimas glicolíticas (Mantese, 2002; Lidon e Silvestre, 2008).

Após o esgotamento das reservas de glicogénio e de fosfocreatina, os níveis de ATP diminuem rapidamente e o relaxamento das fibras musculares desaparece (a capacidade de extensão e de elasticidade desaparece), evoluindo o *rigor mortis*. A conclusão do *rigor mortis* coincide com o amaciamento das massas musculares e resulta da degradação da ultraestrutura da fibra muscular. Desta forma, do ponto de vista tecnológico considera-se que a designação “carne” apenas deve ser atribuída ao músculo após o *rigor mortis* (Lidon e Silvestre, 2008).

A composição química da carne depende da espécie animal, da raça, do sexo, da idade, do tipo de alimentação do animal e da respectiva zona muscular analisada. Em termos genéricos a carne contém aproximadamente 75% de água, 18% de proteínas (proteínas sarcoplasmáticas como a mioglobina, a hemoglobina, os citocromos e as flavoproteínas; proteínas miofibrilares como a actina, a miosina, a tropomiosina e a troponina e proteínas insolúveis), 3% de lípidos (neutros, polares e ácidos gordos esterificados) e 3,5% de substâncias não proteicas solúveis (substâncias azotadas como aminoácidos e creatina; glícidos como o glicogénio e o ácido láctico; minerais como o zinco, o ferro, o cobre e o fósforo e ainda vitaminas do complexo B) (Pegg e Shahidi, 2000; Lidon e Silvestre, 2008).

Os produtos cárneos podem classificar-se em frescos, crus marinados, crus curados, conservas ou salgados. De entre estes, e por fazer parte deste estudo, definem-se as conservas cárnicas como sendo obtidas a partir de tratamentos térmicos que provocam a desnaturação de proteínas. Estes produtos alimentares contêm na sua composição carne ou vísceras comestíveis de uma ou mais espécies de animais, podendo ainda conter condimentos, especiarias e aditivos alimentares. Podem igualmente sofrer maturação e/ou fumagem. Desta forma, integram-se nesta categoria os produtos cozidos cuja estrutura muscular da carne se consegue identificar, como por exemplo o fiambre da perna e da pá, e aqueles em que a estrutura muscular não se consegue reconhecer, como a mortadela (Lidon e Silvestre, 2007).

O fiambre é produzido a partir da perna ou da pá de porco, e de outros condimentos e aditivos autorizados, apresentando-se sob a forma de um bloco com diversas configurações ou sob a forma de fatias (ver figura 1.1). Ao corte deve apresentar uma superfície levemente húmida, de cor rosada mais ou menos intensa, ostentando textura compacta, cheiro e sabor característicos. Nos fiambres da perna superior, da perna extra, da perna e da pá, a estrutura muscular da carne deve ser macroscopicamente identificável (NP 4393:2001).

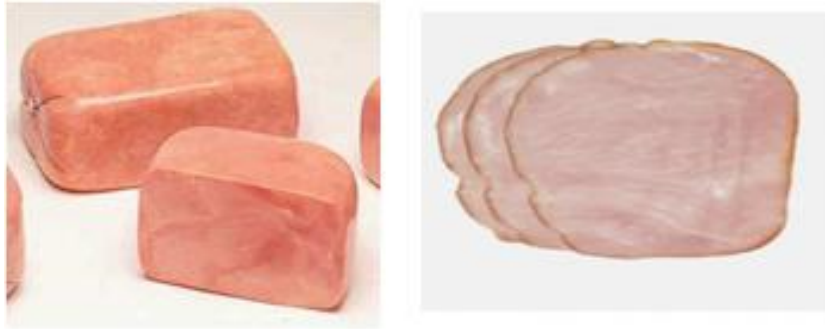


Figura 1.1: Fiambre na forma de bloco e de fatias (Arquivo pessoal Filipa Ganhão).

A produção industrial de fiambre inicia-se com a recepção das matérias-primas cárneas e consequente escolha das pernas e das pás de porco, que deverão apresentar um pH entre 5,6 e 6 e que deverão estar isentas de mau cheiros, feridas e hematomas. Em seguida, numa sala de desmancha a 12°C, promove-se a desmancha das pernas e das pás e removem-se coágulos e outras sujidades. Em simultâneo, os couratos são arredondados e lavados.

Enquanto decorre a desmancha faz-se a preparação da salmoura que poderá conter os seguintes componentes:

- água potável a uma temperatura entre os 0°C e os 3°C;
- fosfatos de sódio e de potássio para auxiliar a retenção de água e a solubilidade das proteínas, uma vez que formam complexos com os iões cálcio e magnésio levando ao relaxamento da rede de proteínas devido à quebra das ligações de hidrogénio;
- cloreto de sódio (NaCl) purificado e higienizado com o intuito de conferir sabor, protecção contra microrganismos indesejáveis, através da redução da actividade da água, e solubilização das proteínas da carne;
- nitrito de sódio com o propósito de sintetizar nitroso-pigmentos, conferindo ao produto final uma cor rosada mais atraente para o consumidor, conceder aroma e sabor e inibir selectivamente o desenvolvimento de microrganismos patogénicos;
- dextrose para favorecer a evolução da cor e do sabor, a fixação de água, a redução de nitratos a nitritos e para dificultar a oxidação da mioglobina em metamioglobina;
- L-ascorbato de sódio, que desempenha funções de agente redutor, para favorecer a formação de nitroso-pigmentos e dificultar a oxidação das gorduras;
- lactato de sódio para reforçar a acção do L-ascorbato de sódio e para promover o endurecimento do produto;
- carragenatos, que desempenham funções de espessantes/gelificantes, de modo a conferir consistência e textura compacta ao produto final e
- aroma de carne e glutamato monossódico para reforçar o sabor a carne característico do produto final (Lidon e Silvestre, 2007).

Na sala de injeção promove-se a introdução e a difusão homogénea da salmoura na carne, recorrendo a agulhas injectoras que possuem orifícios cruzados na extremidade para saída da solução. Após a fase anterior, procede-se à tenderização da carne, que consiste na sua passagem

entre dois cilindros contendo pequenas lâminas que a golpeiam, de modo que os golpes que a atingem levem à extracção da proteína solúvel, à distribuição e homogeneização da salmoura, bem como ao aumento da capacidade de absorção de substâncias líquidas nas etapas seguintes (Lidon e Silvestre, 2007).

Logo depois, a carne é submetida a massagem num bombo massajador horizontal² que roda em torno do seu eixo, a vácuo e a uma temperatura entre os 0°C e os 4°C, para que as fibras fiquem mais permeáveis, as ligações musculares fiquem mais flácidas e se extraia a proteína solúvel. A extracção da proteína solúvel, que decorre do processo de massagem, faz com que a carne fique envolvida externamente por uma goma de consistência gelatinosa, que favorecerá a coesão da carne durante a cozedura e facilitará depois a remoção do produto cárneo do molde (Lidon e Silvestre, 2007).

Sucedese depois o enchimento em invólucros de plástico (tendo em conta que os couratos são previamente moldados à carne), a enformagem em moldes metálicos, a prensagem e a cozedura. Na cozedura, o fiambre é submetido a uma temperatura aproximadamente igual a 70°C, até que o centro térmico do produto atinja os 68°C. Durante este passo do processo dá-se a coagulação das proteínas musculares formando-se um bloco gelificado. Dá-se também a desnaturação das fibras degradadas durante a massagem, favorecendo a sua compactação e a formação de uma rede tridimensional capaz de reter água, conferindo ao produto acabado consistência, firmeza e coesão. Desenvolve-se igualmente o aroma e o sabor característicos e a estabilização da cor do produto (Lidon e Silvestre, 2007).

Após o passo anterior, o fiambre é arrefecido em água fria potável e posteriormente refrigerado durante aproximadamente seis horas, a uma temperatura próxima dos 0°C, para que o colagénio libertado na forma líquida coagule, concedendo estabilidade e consistência acrescida ao produto final. Após o período de tempo estabelecido de refrigeração, o fiambre é desenformado, rotulado, armazenado em câmaras de refrigeração e posteriormente expedido (Lidon e Silvestre, 2007). Na figura 1.2 seguinte é possível observar o fluxograma de fabrico de fiambre da perna.

Tal como se enunciou anteriormente, o fiambre pode ser comercializado sob a forma de um bloco com diversas configurações ou sob a forma de fatias. No caso do fiambre fatiado, após a sua refrigeração, o produto a fatiar sofre um arrefecimento rápido, é-lhe removido o invólucro de plástico e é tranchado numa fatiadora. Em seguida, procede-se à pesagem da quantidade previamente definida por embalagem e ao seu conseqüente embalamento. Por último, procede-se à sua rotulagem, armazenagem em ambiente refrigerado e posterior expedição (empresa X, 2009a). Na figura 1.3 pode-se observar o fluxograma usado para a obtenção de produtos fatiados.

² A massagem efectuada num bombo horizontal faz com que os pedaços de carne sejam elevados pelas saliências do interior do equipamento até ao seu ponto mais alto, caindo em seguida. O impacto da queda produz uma intensa acção mecânica, danificando a estrutura muscular da carne.

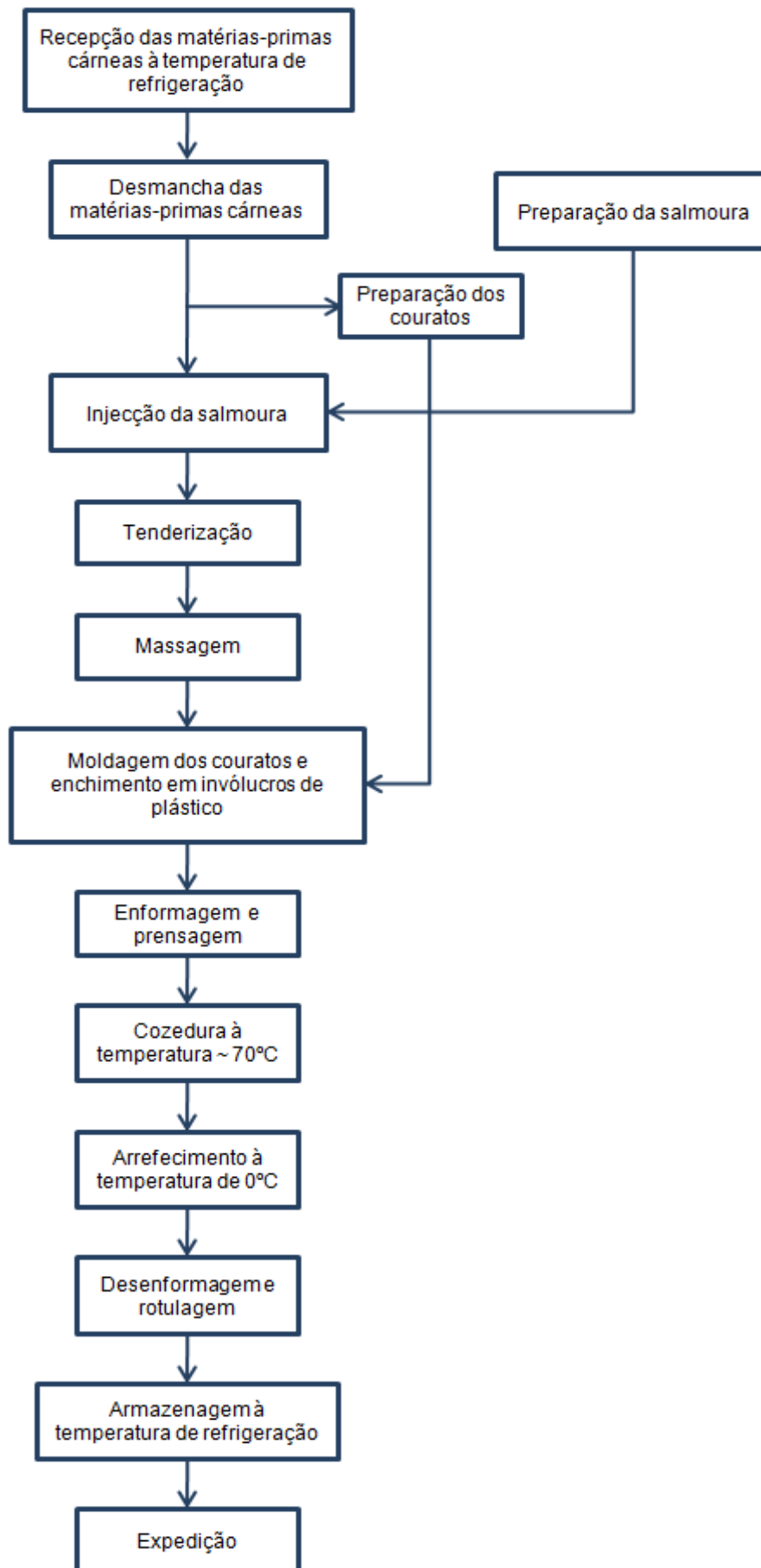


Figura 1.2: Fluxograma de fabrico industrial de fiambre da perna extra.

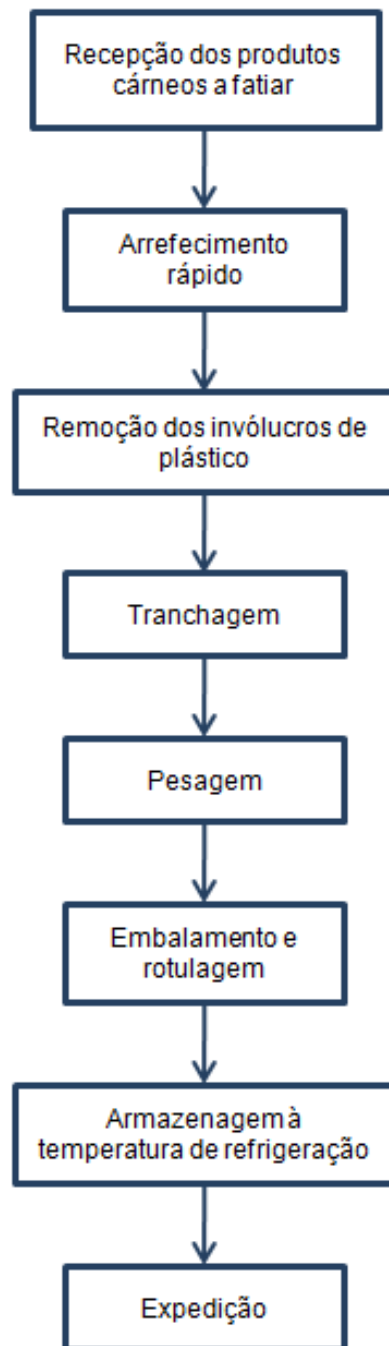


Figura 1.3: Fluxograma usado para a obtenção de produtos cárneos fatiados (empresa X, 2009a).

A mortadela é uma conserva cárnica obtida a partir da emulsão de carnes de animais de abate, acrescido ou não de toucinho de porco e de outros condimentos e aditivos autorizados. Este produto é formatado numa tripa artificial de modo a conferir-lhe a forma cilíndrica desejada. Neste caso a estrutura muscular da carne não é macroscopicamente identificável (NP 720:2009) (ver figura 1.4).



Figura 1.4: Mortadela fatiada (Arquivo pessoal Filipa Ganhão).

A produção industrial de mortadela inicia-se com a receção das matérias-primas cárneas, seguida de desmancha numa sala apropriada para o efeito à temperatura de 12°C. Após este passo do processo a carne e a gordura de suíno é inicialmente picada, homogeneizada e em seguida procede-se à sua mistura com água, fécula e condimentos, como sal refinado e alho moído, num equipamento cortador – misturador denominado de *cutter*. Podem ainda ser misturados antioxidantes, como o eritorbato de sódio e o ácido cítrico, e emulsionantes de gordura, como o polifosfato de sódio. Adiciona-se também pimenta em grão, de modo a conferir sabor e decoração ao produto final, e nitrito de sódio, com o intuito de desempenhar a mesma função já descrita para a produção de fiambre (Lidon e Silvestre, 2007).

Posteriormente realiza-se o enchimento em invólucros de plástico, que lhe confere a forma desejada, e a consequente cozedura. Na cozedura, a mortadela é submetida a uma temperatura aproximadamente igual a 80°C, até que o centro térmico do produto atinja os 72°C. Após a cozedura, promove-se um arrefecimento rápido com água fria potável e a consequente retracção da embalagem. Após o passo anterior, a mortadela é rotulada, armazenada em câmaras de refrigeração e posteriormente expedida (Lidon e Silvestre, 2007). Na figura 1.5 seguinte é possível observar o fluxograma de fabrico de mortadela.

No caso de se pretender mortadela fatiada procede-se tal como se descreveu anteriormente para o fiambre (empresa X, 2009a).

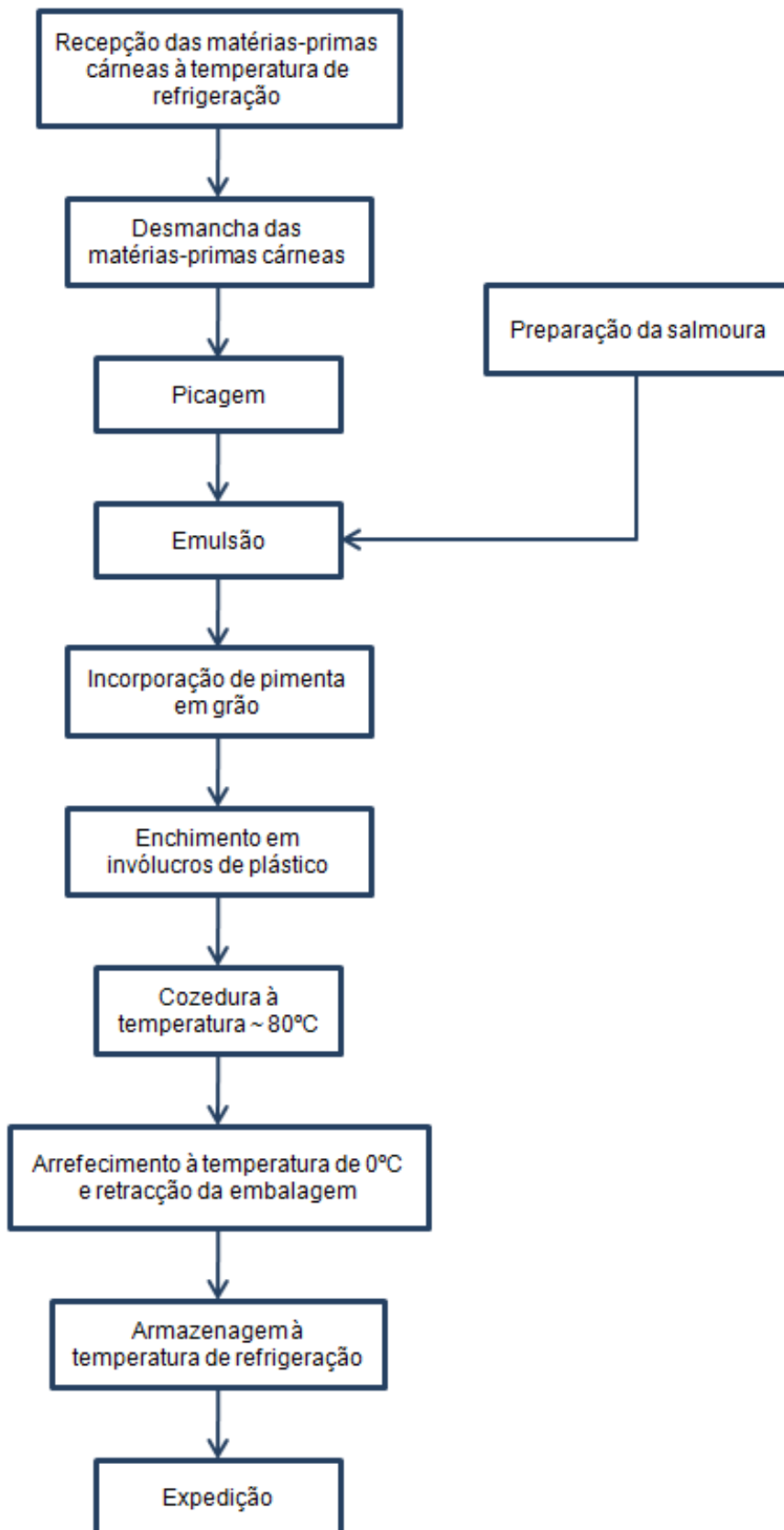


Figura 1.5: Fluxograma de fabrico industrial de mortadela.

1.2 Nitritos

O processo de cura consiste no tratamento de carnes com sal, com conservantes³ como o nitrito, com açúcar, com condimentos e com outros ingredientes, com o objectivo de conservar o produto, de desenvolver e fixar a cor, de melhorar o sabor e os aromas e de aumentar o rendimento de produção (Faria *et al*, 2001). O uso de nitrito, na forma de sais de sódio ou de potássio (ver figura 1.6), é um conservante permitido que pode ser adicionado no processo de produção de produtos cárneos curados devido aos vários papéis que desempenha (Lidon e Silvestre, 2008).



Figura 1.6: Estrutura molecular de sais de sódio e de potássio: a) nitrito de sódio (NaNO_2) e b) nitrito de potássio (KNO_2) (World Health Organization, 2010).

Este conservante exerce uma função antimicrobiana e normalmente é adicionado aos produtos cárneos curados para prevenir o crescimento de bactérias como o *Clostridium botulinum*, bem como a produção de toxinas por estes microrganismos (Lidon e Silvestre, 2008).

Segundo Honikel (2008), o nitrito está também envolvido em várias reacções químicas interactivas que ocorrem nos produtos cárneos curados. Por se tratar de um composto muito reactivo, o nitrito pode desempenhar o papel de agente oxidante, de agente redutor ou ainda de agente nitrosante (transferência de óxido nítrico), podendo converter-se em compostos relevantes na obtenção de produtos cárneos curados. Assim sendo, do ponto de vista tecnológico, o nitrito desempenha ainda outras funções, nomeadamente:

- contribui para o desenvolvimento da cor dos produtos cárneos curados através da formação de nitroso-pigmentos, que conferem uma coloração rosada característica;
- contribui para a estabilidade oxidativa dos lípidos constituintes dos produtos cárneos curados, devido ao seu papel antioxidante e
- contribui 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 (EFSA Journal, 2003).

Descrevem-se, em seguida, alguma das funções desempenhadas pelo conservante nitrito.

³ Os conservantes são substâncias que prolongam a durabilidade dos alimentos, protegendo-os contra a deterioração provocada por microrganismos, podendo ser eficazes contra bactérias, fungos e/ou leveduras, ou por enzimas que tornariam os produtos alimentares impróprios para consumo. Conservantes são igualmente as substâncias que podem prevenir a deterioração dos alimentos por oxidação, desidratação, desestabilização, ou outra mudança indesejável.

1.2.1 Formação e estabilidade da cor dos produtos cárneos curados

Segundo Ordóñez (2005), a carne possui características organolépticas excepcionais que, associadas ao seu valor nutricional, convertem-na num dos alimentos de origem animal mais valorizado pelo consumidor. São diversos os atributos organolépticos que caracterizam a carne, nomeadamente a cor, a suculência, a textura e a dureza e o odor e o sabor. No entanto, a cor é a primeira característica sensorial a ser avaliada pelo consumidor (Pegg e Shahidi, 2000; Ordóñez *et al*, 2005). A cor da carne e dos produtos cárneos é pois um atributo sensorial importante no seu processamento e na sua comercialização: o consumidor associa a qualidade de um produto alimentar à sua cor característica e é após esta observação que toma a decisão de o adquirir (Marchesi *et al*, 2006).

A mioglobina, proteína sarcoplasmática com estrutura ternária, é a principal responsável pela cor da carne (já que tem como função transportar o oxigénio aos músculos), embora a hemoglobina⁴ e o citocromo C⁵ possam também contribuir para a sua coloração (ver figura 1.7) (Lidon e Silvestre, 2008).

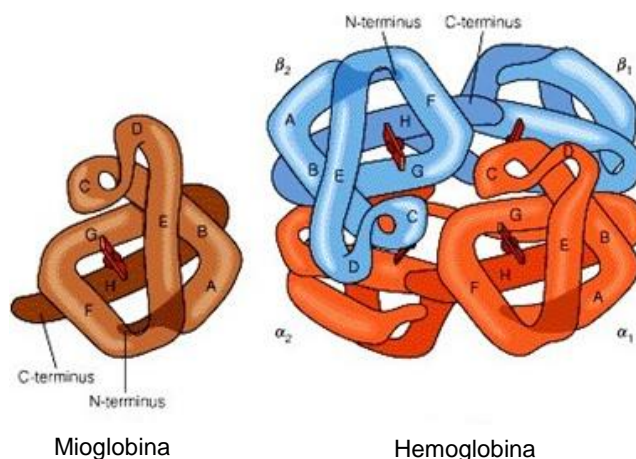


Figura 1.7: Estrutura ternária da mioglobina e estrutura quaternária da hemoglobina (<http://medicina.med.up.pt/bcm/trabalhos/2006/aminhaproteinafavorita/estrutura.htm>).

A mioglobina é uma molécula solúvel em água, formada por uma porção proteica, denominada globina, e uma porção não proteica, denominada de grupo heme (ver figura 1.8). O grupo heme, em forma de anel, possui no seu centro um átomo de ferro com capacidade para formar seis ligações:

- quatro ligações são formadas com quatro átomos de azoto do núcleo porfirínico;
- uma ligação é formada com o átomo de azoto do anel imidazólico da histidina e
- uma posição fica disponível para formar uma ligação reversível com um ligante, como por exemplo o oxigénio ou a água (Mancini e Hunt, 2005; Guilherme *et al*, 2008).
-

⁴ A hemoglobina é uma proteína com estrutura quaternária formada por quatro moléculas de mioglobina responsável pelo transporte de oxigénio e pela cor do sangue.

⁵ O citocromo c é uma pequena proteína heme solúvel que está associada à membrana interna da mitocôndria, sendo um componente essencial da cadeia transportadora de electrões.

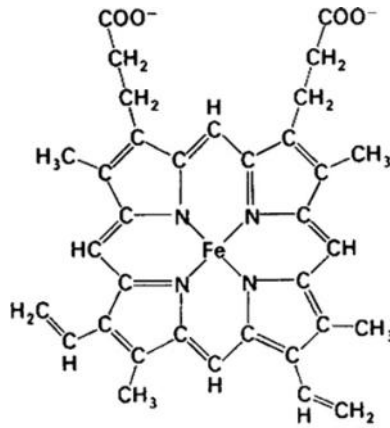


Figura 1.8: Grupo heme da molécula de mioglobina onde se podem observar as quatro ligações dos quatro átomos de azoto do núcleo porfirínico ao ferro (Honikel, 2008).

É a molécula que forma a ligação reversível com o ferro do grupo heme e o estado de oxidação desse mesmo átomo de ferro, que determina a cor da carne. Se o átomo de ferro estiver no estado reduzido (Fe^{2+}) reage facilmente com a água e com o oxigénio; se por outro lado, o átomo de ferro estiver no estado oxidado (Fe^{3+}) não tem capacidade para se ligar a outras moléculas (Mancini e Hunt, 2005; Guilherme *et al*, 2008).

A mioglobina está presente na carne em três formas distintas, a saber:

- a mioglobina no seu estado reduzido de cor vermelha púrpura;
- a oximioglobina de cor vermelha brilhante e
- a metamioglobina de cor castanha (Faria *et al*, 2001).

Imediatamente após o corte da carne fresca verifica-se que a sua cor característica é escura, mais propriamente uma cor vermelha púrpura escura conferida pela mioglobina (ver figura 1.9) (Boles e Pegg, 2010).

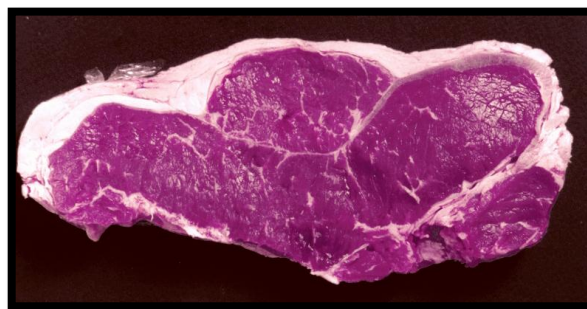


Figura 1.9: Corte de carne fresca onde se pode observar a cor vermelha púrpura escura conferida pela mioglobina (Boles e Pegg, 2010).

Após o contacto do corte fresco com o oxigénio do ar, este é absorvido pela superfície exposta da carne e liga-se ao átomo de ferro. Desta reacção forma-se um pigmento denominado de oximioglobina que confere à carne uma tonalidade vermelha brilhante, sendo essa a coloração

desejada pelos consumidores quando adquirem estes produtos alimentares (ver figura 1.10) (Boles e Pegg, 2010).



Figura 1.10: Corte de carne fresca onde se pode observar a tonalidade vermelha brilhante conferida pela oximioglobina (Boles e Pegg, 2010).

A mioglobina e a oximioglobina podem também estar sujeitas a reacções de oxidação que dão origem à metamioglobina, um pigmento que confere cor acastanhada à carne (ver figura 1.11) (Boles e Pegg, 2010).

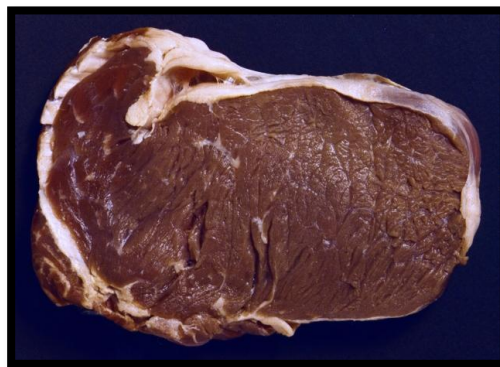


Figura 1.11: Corte de uma peça de carne possuindo a cor acastanhada à sua superfície conferida pela metamioglobina (Boles e Pegg, 2010).

Ao nível químico as reacções entre as diferentes formas de mioglobina são reversíveis e estão em constante interconversão entre si até que a carne seja processada:

- quando o átomo de ferro do grupo heme da mioglobina está no estado reduzido (Fe^{2+}) e na presença de concentrações elevadas de oxigénio, a mioglobina pode ligar-se a uma molécula de oxigénio e originar a oximioglobina, através de uma reacção denominada de oxigenação;
- já na presença de pequenas concentrações de oxigénio, o átomo de ferro do grupo heme da mioglobina é oxidado a Fe^{3+} , originando a metamioglobina através de uma reacção denominada de oxidação da mioglobina (ver figura 1.12) (Faria *et al*, 2001, Honickel, 2008).

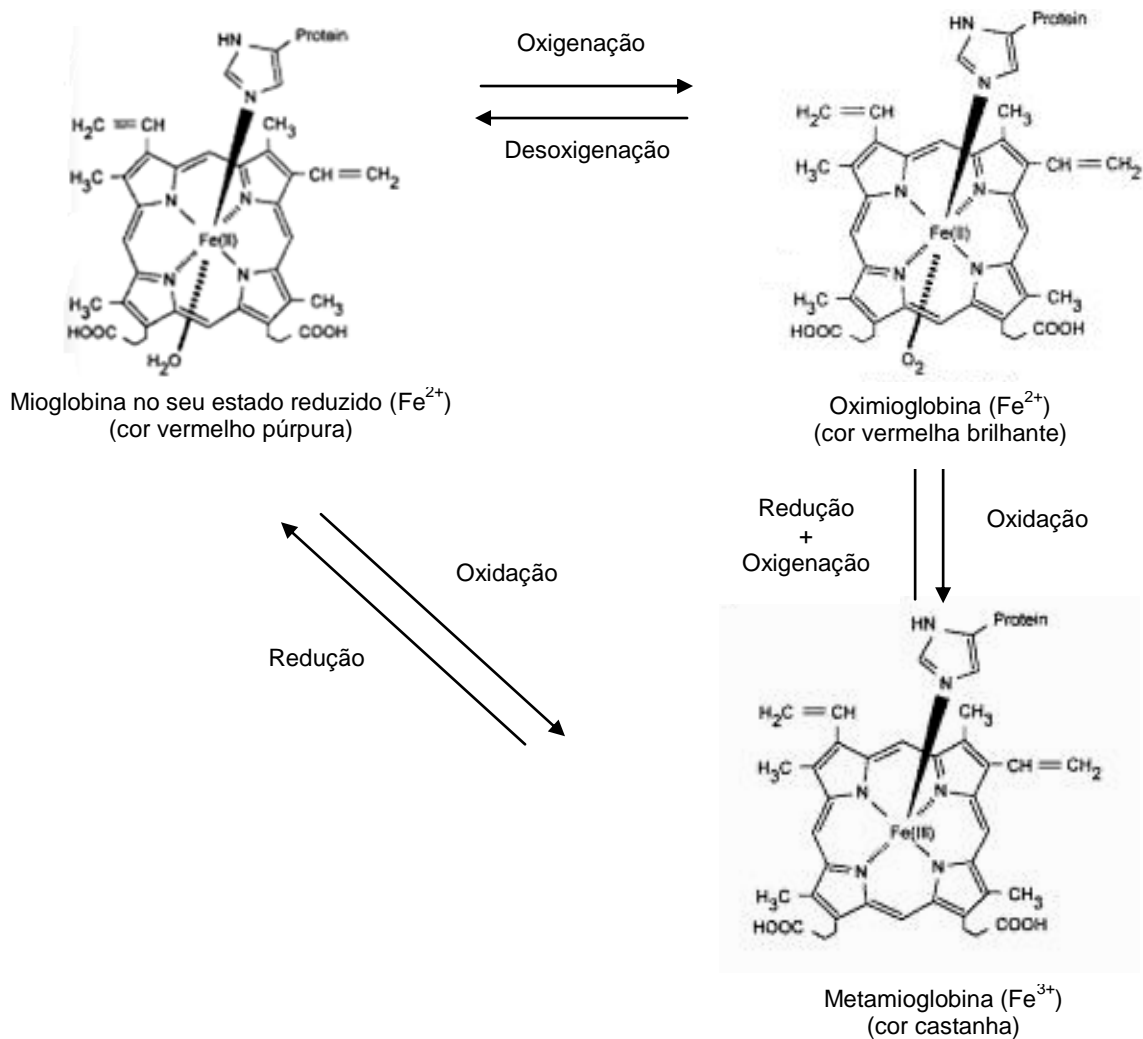


Figura 1.12: Reacções de interconversão entre as diferentes formas de mioglobina (Pegg e Shahidi, 2000).

Tal como enunciado anteriormente, um dos objectivos do processo de cura usado na obtenção de produtos cárneos curados é o desenvolvimento e a fixação da cor característica. Antes do século XX julgava-se ser o nitrato o responsável pela cor típica destes produtos. No entanto, no início do século XX, constatou-se que a obtenção dos pigmentos característicos neste tipo de alimento era devido ao nitrito, passando a ser este o aditivo alimentar mais usado no processo de cura (Honikel, 2007).

Segundo Dryden e Birdsall (1980), nos produtos cárneos curados, é o pigmento da carne, e não o nitrito, que causa a reflexão da luz da cor característica destes produtos alimentares. O nitrito apenas actua na estabilização da mioglobina através de uma reacção reversível, da mesma forma que o pigmento da carne é estabilizado através de uma reacção de oxigenação (Pegg e Shahidi, 2000). Na obtenção da cor característica destes produtos, o ião nitrito (NO_2^-) não actua directamente como agente nitrosante no processo: é o óxido nítrico (NO), resultante da reacção de redução do nitrito, que reage com a mioglobina para formar o pigmento rosado típico dos produtos cárneos curados. Uma vez que o nitrito se dissolve na fase aquosa da carne crua, os iões NO_2^- ficam disponíveis para reagir com os hidrogeniões (iões H^+) do meio ligeiramente ácido (pH entre 5,5 e 6,0), resultante da mistura

dos vários componentes que constituem a salmoura adicionada à carne. Como consequência forma-se o ácido nitroso (HNO_2), que se ilustra nas reacções seguintes (ver figura 1.13) (Pegg e Shahidi, 2000; Sebranek, 2009).

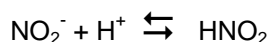
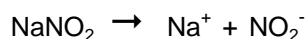


Figura 1.13: Reacções que ilustram a formação de HNO_2 (Sebranek, 2009).

O HNO_2 encontra-se em equilíbrio com o trióxido de diazoto (N_2O_3), que por sua vez se dissocia para formar o NO e o dióxido de azoto (NO_2). O NO pode assim reagir com o pigmento da carne para formar NO-mioglobina de cor vermelha, que após o tratamento térmico adequado se converte no pigmento nitrosilhemocromo de cor rosada, característico dos produtos cárneos curados (Pegg e Shahidi, 2000; Sebranek, 2009). Na figura 1.14 seguinte ilustram-se as reacções que dão origem ao nitrosilhemocromo.

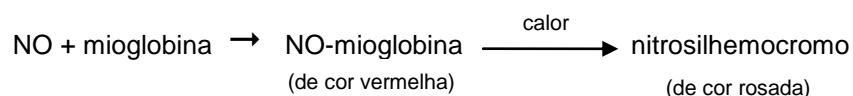


Figura 1.14: Reacções que ilustram a formação de nitrosilhemocromo (Sebranek, 2009).

Paralelamente, o NO_2 formado reage com a água e volta a formar HNO_2 e ácido nítrico (HNO_3):

- o HNO_2 reentra na sequência reaccional do NO (descrita na figura 1.14) e
- o HNO_3 dissocia-se e origina o ião nitrato (NO_3^-) (ver figura 1.15) (Sebranek, 2009).

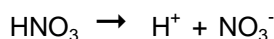
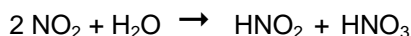


Figura 1.15: Reacção paralela do NO_2 e consequente formação de NO_3^- (Sebranek, 2009).

Através da observação das figuras 1.13 a 1.15 verifica-se que as reacções que dão origem ao desenvolvimento da cor dos produtos cárneos curados, originam também nitrato, facto que explica a presença deste composto químico em produtos desta natureza, mesmo não fazendo parte da lista de ingredientes adicionados (Sebranek, 2009).

O tempo necessário para que ocorra todo o processo de cura dos produtos cárneos pode ser diminuído recorrendo ao uso de agentes redutores. A presença de agentes redutores, como o ascorbato de sódio (ASC):

- auxilia a conversão de N_2O_3 , formado a partir do HNO_2 , em NO (ver figura 1.16) de forma mais rápida, promovendo a coloração rosada típica destes produtos alimentares;
- diminui ligeiramente o pH do meio, favorecendo o desenvolvimento da cor;
- ajuda a manter a mioglobina no estado reduzido e
- previne a descoloração dos produtos cárneos curados na presença de luz e de oxigénio (Anon, 2003).



Figura 1.16: Reacção de formação de NO na presença de ascorbato (Sebranek, 2009).

Acredita-se pois que o ascorbato proporciona um fornecimento contínuo de NO proveniente do nitrito residual presente na carne, conferindo propriedades redutoras ao produto cárneo curado. A adição de ascorbato a estes produtos desempenha ainda outra função muito importante: a presença de ascorbato leva à redução da formação de nitrosaminas nos produtos cárneos curados. Devido à sua importância este tema será descrito posteriormente em 1.2.5 (Faria *et al*, 2001; Sebranek, 2009).

As reacções descritas anteriormente demonstram que a presença de agentes redutores e o controlo do pH do meio são factores importantes a ter em conta durante o processo de cura dos produtos cárneos. No entanto, existem outras reacções que envolvem o nitrito que levam à formação de NO. Por exemplo, no processamento da maioria dos produtos cárneos curados, a trituração da carne leva à incorporação de ar, promovendo a oxigenação dos tecidos. Por este motivo, a oximioglobina (de cor vermelha brilhante) predominará no momento de adição da salmoura usada na cura. Neste passo do processo, quando o nitrito é adicionado, a carne fica imediatamente com uma tonalidade acastanhada, já que este composto actua como um forte agente oxidante da mioglobina. Por outras palavras, a presença de nitrito faz com que a oximioglobina e a mioglobina da carne sejam oxidadas a metamioglobina de cor acastanhada. Tal como se pode observar na figura 1.17 seguinte, nesta reacção o nitrito é ainda reduzido a NO (Pegg e Shahidi, 2000; Faria *et al*, 2001; Sebranek, 2009).

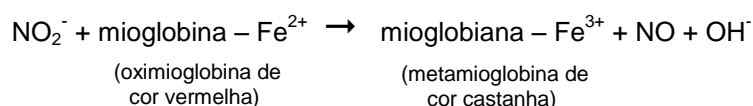


Figura 1.17: Reacção de formação de NO em tecidos cárneos oxigenados (Sebranek, 2009).

A reacção anterior proporciona uma rápida transformação visual da cor da carne, facto que auxilia a confirmação da presença de nitrito na salmoura adicionada: se o nitrito não estivesse presente, a carne não desenvolvia a cor acastanhada, mantendo a cor avermelhada da mioglobina (Sebranek, 2009).

Quando o NO, formado na reacção anterior (ver figura 1.17), se combina com a metamioglobina, forma-se um pigmento intermédio instável denominado de nitrosilmetamioglobina. O pigmento nitrosilmetamioglobina sofre redução, promovida pela acção de enzimas redutoras ou de agentes redutores como o ascorbato, dando origem à nitrosilmioglobina responsável pelo pigmento vermelho brilhante dos produtos cárneos curados antes do tratamento térmico (Pegg e Shahidi, 2000; Faria *et al*, 2001). A cor é posteriormente estabilizada através da desnaturação térmica da porção proteica da mioglobina (globina), dando origem a um pigmento de cor rosada mais estável designado de nitrosilhemocromo (ver figura 1.18). É este o pigmento que confere a cor característica aos produtos cárneos curados (Faria *et al*, 2001).

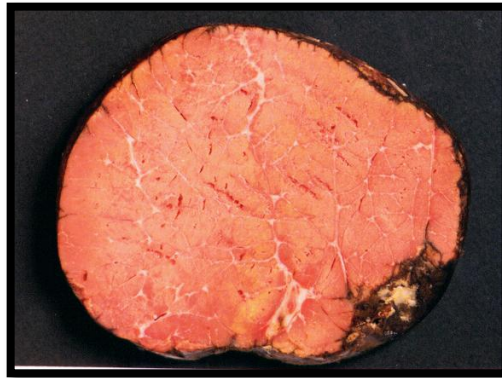


Figura 1.18: Corte de uma peça de carne onde se pode observar à sua superfície a cor rosada, característica dos produtos cárneos curados, conferida pelo nitrosilhemocromo (Boles e Pegg, 2010).

Na figura 1.19 seguinte é possível observar um mecanismo proposto por Killday e colaboradores (1988) para o processo de cura dos produtos cárneos curados.

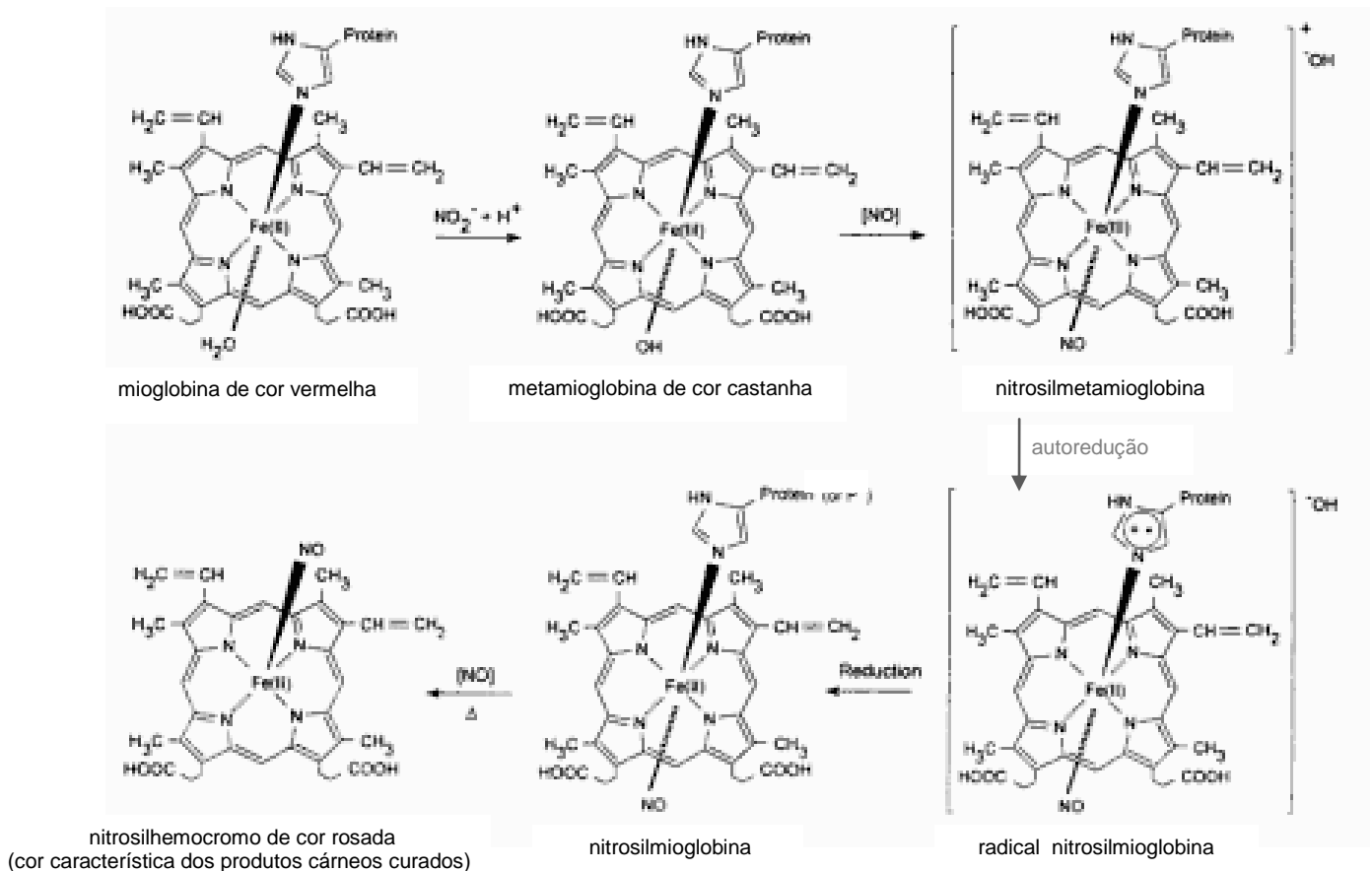


Figura 1.19: Mecanismo proposto para o processo de cura dos produtos cárneos curados (Killday *et al*, 1988).

Mesmo na presença de um baixo teor de nitrito, compreendido entre 1 a 2 mg de NaNO_2/kg de produto cárneo, é possível obter-se uma ligeira coloração rosada no produto final após a aplicação de tratamento térmico. No entanto, uma vez que o teor de nitrito é afectado por processos térmicos, pela presença de aditivos e pela possibilidade de ocorrência de reacções oxidativas, a literatura sugere que deve ser adicionada a quantidade mínima de 50 mg de NaNO_2/kg de carne, para que ocorra a estabilização do pigmento nitrosilhemocromo e a consequente coloração pretendida (Stegeman e Verkleij, 2008).

A estabilidade da cor dos produtos cárneos curados está relacionada com a concentração de nitrosilhemocromo no produto final. No entanto, alterações ocorridas no processamento destes produtos podem dar origem a perda da cor que lhes é característica, nomeadamente:

- a desidratação superficial dos produtos causa uma coloração escurecida, que pode ser evitada recorrendo à utilização de embalagens com uma boa barreira ao vapor de água;
- a adição excessiva de nitrito promove a oxidação da mioglobina e a consequente formação de metamioglobina, que depois de sofrer tratamento térmico pode desnaturar e conferir um tom esverdeado ao produto alimentar;

- a adição de quantidades insuficientes de nitrito ou de agentes redutores durante o processo de cura, levam à formação de baixas concentrações de NO, que poderá resultar na obtenção de produtos cárneos com coloração fraca e instável;
- já uma má distribuição da salmoura durante o processo promove o desenvolvimento deficiente da cor, uma maior deterioração por acção microbiológica e a formação de áreas esverdeadas;
- embora termoestável, o pigmento nitrosilhemocromo é susceptível a reacções de oxidação promovidas pela acção de agentes oxidantes ou pela acção conjunta da luz e do oxigénio, que resultam na formação de porfirinas verdes, amarelas ou sem cor e
- os pigmentos também podem ser susceptíveis à descoloração desenvolvida pela acção de bactérias aeróbias, que desenvolvem uma coloração esverdeada na superfície destes produtos cárneos (a produção de peróxido de hidrogénio leva à oxidação do pigmento da carne), acompanhada pela formação de um limo viscoso (Faria *et al*, 2001).

É possível reduzir o período de tempo necessário para desenvolver a coloração desejável dos produtos cárneos curados se se incluir na sua formulação aceleradores de cura, como por exemplo o ácido ascórbico ou o ASC. A adição de aceleradores de cura aumenta a velocidade de conversão química do HNO₂ em NO, mantendo a mioglobina num estado reduzido e prevenindo a perda de cor dos produtos cárneos curados na presença de luz e de oxigénio (Anon, 2003).

1.2.2 Outras funções tecnológicas do nitrito

O nitrito desempenha também funções antioxidantes nos produtos cárneos curados. A sequência de reacções envolvendo o nitrito no desenvolvimento da cor característica dos produtos cárneos curados, provavelmente está relacionada com o efeito antioxidante deste composto nos produtos alimentares em questão. Pensa-se que o mecanismo que caracteriza o efeito antioxidante do nitrito inclui reacções com proteínas contendo o grupo heme e com iões metálicos, através da actividade do NO, e formação de compostos nitroso⁶ e nitrosil⁷ com propriedades antioxidantes. Julga-se que o mecanismo proposto esteja dependente das mesmas reacções iniciais de formação de NO a partir do nitrito ocorridas durante o processo de cura dos produtos cárneos (Sebranek e Bacus, 2007; Sebranek, 2009).

O nitrito é igualmente responsável pelo desenvolvimento do sabor e do aroma característicos dos produtos cárneos curados (a comunidade científica sugere um mínimo de 40 mg de NaNO₂/kg de peso de carne para que ocorra o desenvolvimento de tais características sensoriais), embora esta seja a sua função menos compreendida. Embora seja fácil distinguir o aroma e o sabor dos produtos cárneos curados dos da carne crua, ainda não foi possível obter a identidade química que define estas características organolépticas obtidas após o processo de cura. Apesar de muitos compostos voláteis terem sido identificados durante o decorrer do processo de cura de carnes, nomeadamente compostos contendo azoto ou azoto/oxigénio derivados do nitrito, ainda não foi proposto nenhum

⁶ Estrutura do composto nitroso: R-N=O.

⁷ Estrutura do catião nitrosil: N=O⁺.

mecanismo que demonstre o desenvolvimento destas características organolépticas nos produtos cárneos curados (Sebranek e Bacus, 2007; Stegeman e Verkleij 2008; Sebranek, 2009).

1.2.3 Função de conservação

O crescimento microbiano depende de parâmetros inerentes aos tecidos animais, nomeadamente parâmetros intrínsecos como o pH, a actividade da água, o potencial de oxidação-redução e os nutrientes disponíveis, bem como de parâmetros extrínsecos como a temperatura e a concentração de gases (nomeadamente presença ou ausência de oxigénio). Assim sendo, a carne e os produtos cárneos são alimentos muito perecíveis, a menos que sejam devidamente conservados e/ou armazenados em condições que retardem a actividade microbiológica (EFSA Journal, 2003; Jay, 2005; Lidon e Silvestre, 2007).

Uma forma de conservar os produtos cárneos é o recurso à adição de aditivos alimentares, como por exemplo conservantes como o nitrito, pois desta forma consegue-se suprir a necessidade de os transportar a grandes distâncias, de os armazenar durante períodos de tempo mais longos e de os expor ao consumidor de uma forma mais atraente e em qualquer altura que se deseje (Lidon e Silvestre, 2008).

Os relatos efectuados ao longo da história sugeriram ser o nitrato, inicialmente aplicado a partir de sal contaminado com nitrato de sódio (NaNO_3) ou nitrato de potássio (KNO_3), o principal responsável pela cura de produtos cárneos. No entanto, no século XIX, descobriu-se que o nitrato se reduzia a nitrito mediante um processo bacteriano (envolvendo bactérias como *Micrococcus epidermidis*, *Micrococcus nitrificans* e *Achromobacter dendriticum*) (ver figura 1.20), e que na realidade era o nitrito o grande responsável pela cura dos produtos cárneos (Sebranek e Bacus, 2007).

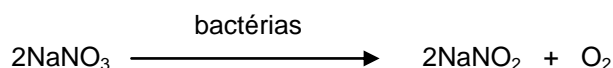


Figura 1.20: Reacção de redução do NaNO_3 a NaNO_2 por acção de bactérias (Roça, 2000).

Uma vez que a redução de nitrato a nitrito é um processo lento, para que a quantidade de nitrato reduzida seja significativa, é necessário um número razoavelmente elevado de bactérias, facto que poderia tornar-se prejudicial para a saúde do consumidor (Roça, 2000). No entanto, no final dos anos 50 os investigadores verificaram que o nitrato não tem qualquer efeito antibacteriano e que na realidade é o nitrito que desempenha um papel importante na conservação dos produtos cárneos curados (EFSA Journal, 2003). Como consequência deste facto, o nitrato tem sido eliminado da maioria dos processos de cura de carnes. Actualmente, o nitrato raramente é usado no processo de cura de produtos cárneos, com excepção para os produtos tradicionais curados a seco como o presunto da pá, cuja cura é muito longa e na qual o nitrato constitui um reservatório de nitrito. Desta forma, o nitrato coadjuva na conservação destes alimentos e contribui para o desenvolvimento das suas características sensoriais (DL33/2008; Sebranek e Bacus, 2007).

O nitrito é um forte agente inibidor de bactérias anaeróbias como o *Clostridium botulinum*⁸, contribuindo ainda para o controlo do crescimento de outros microrganismos como a *Listeria monocytogenes*. O *Clostridium botulinum* é uma bactéria anaeróbia produtora de gás que se pode encontrar na água ou nos alimentos, com capacidade para formar esporos e produzir toxinas, algumas delas capazes de provocar botulismo (toxi-infecção alimentar grave) no Homem. As condições que favorecem o crescimento do *Clostridium botulinum*, bem como a produção das respectivas toxinas, incluem um baixo teor de NaCl, um elevado teor de humidade, um valor de pH superior a 4,6 (pH óptimo igual a 7,0), produtos alimentares armazenados em condições restritas de oxigénio e uma temperatura acima da mínima necessária ao seu crescimento (EFSA Journal, 2003; Jay, 2005).

Os sintomas de botulismo aparecem normalmente entre 12 a 72 horas após a ingestão de alimentos contaminados com toxinas, consistindo em transtornos digestivos agudos seguidos de náuseas, perdas de visão, dificuldades respiratórias e debilidade. Uma vez que as toxinas botulínicas são neurotóxicas (atacam irreversivelmente o sistema nervoso), os músculos involuntários podem sofrer paralisia, estendendo-se ao aparelho respiratório e ao coração, originando paragem respiratória e consequentemente a morte. A taxa de mortalidade humana devido ao botulismo varia entre 30 a 65% do total de casos registados, sendo mais baixa na Europa do que nos Estados Unidos da América (Jay, 2005).

O efeito do nitrito sobre os microrganismos ainda não é totalmente conhecido e por isso muitos mecanismos têm sido propostos (Sebranek e Bacus, 2007). Existe uma forte probabilidade de as reacções que envolvem o NO desempenharem uma função antimicrobiana importante nos produtos cárneos curados. Pensa-se que o nitrito tem um efeito inibidor sobre o *Clostridium botulinum*, uma vez que interfere em enzimas ferro-enxofre (enzimas “não heme”), como a ferredoxina, impedindo a síntese de ATP intracelular a partir do piruvato⁹. Perante este facto, Woods e colaboradores (1981) demonstraram que o sistema fosforoclástico do *Clostridium sporogenes* e do *Clostridium botulinum* é inibido pela acção do NO devido à acumulação de ácido pirúvico no meio (Jay, 2005). A reacção fosforoclástica envolve a quebra do piruvato com fosfato inorgânico e coenzima-A, produzindo acetilfosfato. Na presença de adenosina difosfato (ADP), a reacção do acetilfosfato com o acetato origina ATP. Durante a quebra do piruvato, os electrões são inicialmente transferidos para a ferredoxina e em seguida para o ião H⁺, originando hidrogénio, numa reacção catalisada pela enzima hidrogenase (enzima “não heme”) (Jay, 2005).

Reddy e colaboradores (1983) mostraram também que o NO reage com complexos ferro-enxofre formando complexos ferro-nitrosil. A presença destes complexos leva à destruição de enzimas ferro-enxofre, como a ferredoxina, presentes na espécie *Clostridium*. Tompkin (1983) propôs também a hipótese de que o NO reage com o ferro das células vegetativas do *Clostridium botulinum*, talvez com o ferro da ferredoxina. Ficou igualmente esclarecido que as bactérias lácticas são resistentes à acção do nitrito, uma vez que estes microrganismos não possuem ferredoxina (Jay, 2005).

⁸ O nitrito desempenha actividade antimicrobiana, em particular sobre a inibição da germinação de esporos e sobre a formação de toxinas pelo *Clostridium botulinum*.

⁹ A ferredoxina funciona como um transportador de electrões durante a quebra do piruvato, em condições aeróbias, com formação de ATP, hidrogénio e dióxido de carbono.

Embora ainda não se conheçam totalmente os mecanismos que inibem o crescimento do *Clostridium botulinum* em produtos cárneos curados, contudo sabe-se que o efeito inibidor do nitrito sobre esta bactéria depende da combinação de vários factores, nomeadamente: pH, concentração de NaCl, quantidade de ferro presente na carne, presença de agentes quelantes e tratamento térmico aplicado (Sebranek e Bacus, 2007). No caso do primeiro factor enunciado, embora seja do conhecimento que valores de pH baixos inibem o crescimento do *Clostridium botulinum* e a produção de toxinas, verificou-se que o nitrito apresentava um efeito antibotulínico reduzido para valores de pH iguais a 7,0, mas para valores entre 5,7 e 6,0 esse efeito já ocorria. Foi também demonstrado que a adição de agentes quelantes aos produtos cárneos curados reforçava o efeito antibotulínico do nitrito devido ao sequestro de iões metálicos e consequente formação de complexos. A formação de complexos contendo ferro faz com que maior quantidade de nitrito fique disponível para a formação de NO e consequentemente se amplifique a sua acção sobre os microrganismos. Neste âmbito, o conteúdo em ferro da carne tornou-se um factor que contribui para o efeito inibitório do nitrito: nos órgãos de animais de abate que contêm *per si* níveis elevados de ferro, como o fígado e o coração, o efeito antibotulínico do nitrito é reduzido (Jay, 2005).

Robach e seus colaboradores (1978) verificaram que um teor mínimo de 20 mg de NaNO₂/kg de carne, em combinação com 0,2% de ácido ascórbico e com um pH do meio compreendido entre 6,2 ± 0,1, retardava o crescimento de *Clostridium botulinum* em produtos cárneos curados.

1.2.4 O nitrito e o nitrato nos produtos cárneos

1.2.4.1 Quantidade de nitrito que reage na carne

O NaNO₂ ou o KNO₂ são sais com elevada solubilidade e que se dissociam nos seus respectivos iões. No entanto, a dissociação destes sais ocorre preferencialmente para determinados valores de pH. Segundo Honikel (2010), a adição de 150 mg de NaNO₂/kg de peso à carne, a um valor de pH igual a 5,7, leva à formação de aproximadamente 0,045 mg de HNO₂ /kg de peso e por minuto. Estes dados levam a concluir que, em cerca de 10 minutos, apenas 1/336 da quantidade de nitrito adicionada se converte em HNO₂. Pela observação da reacção descrita na figura 1.22 seguinte, a diminuta quantidade de HNO₂ presente está em equilíbrio com o N₂O₃, que por sua vez se dissocia em NO e em NO₂. O NO pode agora reagir com o oxigénio formando novamente NO₂; este último também pode reagir com a água levando à formação de HNO₂ e de HNO₃ (Honikel, 2010).

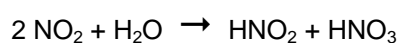
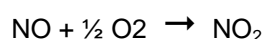
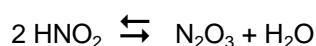


Figura 1.21: Reacções que descrevem a oxidação do HNO₂ e consequente formação do HNO₃ (Honikel, 2010).

Estes factos significam que apenas uma pequena concentração de NO está disponível para reagir com outros compostos. Assim sendo, devido à possibilidade de ocorrerem várias reacções paralelas às reacções de cura, há uma quantidade de NO que não contribui directamente para o desenvolvimento da cor característica dos produtos cárneos curados:

- uma parte é perdida por evaporação na forma de azoto;
- outra parte reage com a gordura e as proteínas musculares e
- a restante porção reage com aditivos antioxidantes (Faria *et al*, 2001; Honikel, 2010).

Segundo a reacção de *van Slyke*, o HNO₂ proveniente do nitrito reage com α-aminoácidos livres, originando a formação de azoto gasoso tal como se ilustra na figura 1.22 seguinte, explicando desta forma a sua perda por evaporação.

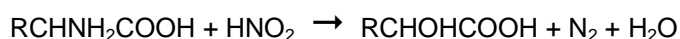


Figura 1.22: Reacção de *van Slyke* que descreve a formação de azoto gasoso a partir de HNO₂, em que R representa um grupo que contenha C e H (grupo alquilo) (Pegg e Shahidi, 2000).

Uma vez que a dissociação dos sais de sódio é dependente do pH, estudos efectuados por Honikel (2010) demonstraram que caso o pH do meio seja superior a 5,7, então ainda menos quantidade de HNO₂ se forma, e conseqüentemente menor será a concentração de NO disponível.

1.2.4.2 Concentração de nitrito e de nitrato presente nos produtos cárneos curados

Ensaio realizado por Dederer (2006) a produtos cárneos curados da Alemanha, como salsichas e presuntos, aos quais apenas foi adicionado nitrito, revelaram possuir valores médios de nitrato entre 20 a 30 mg/kg de produto. Na maioria dos casos analisados, também se verificou que a concentração de nitrito no produto final é inferior à de nitrato. No entanto, não foi provada uma relação entre o teor de nitratos e o teor de nitritos. Estes e outros estudos efectuados a produtos cárneos curados, demonstraram que a oxidação de nitrito a nitrato explica o facto de estes produtos alimentares possuírem concentrações consideráveis de nitrato, embora apenas o nitrito faça parte da lista de ingredientes adicionados. Concluiu-se também que a ocorrência de nitrato nestes produtos, na ausência da adição de nitrito na formulação, resulta da água e das várias especiarias adicionadas durante o processamento industrial (Honikel, 2008).

1.2.4.3 Alterações da concentração de nitrito e de nitrato ao longo do tempo

Muitos têm sido os estudos efectuados para verificar o declínio da concentração de nitrito nos produtos cárneos curados.

Gry e seus colaboradores (1983) 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 nitrito pode reduzir-se para valores inferiores a 10% após algumas semanas de armazenamento (EFSA Journal, 2003).

Análises efectuadas por Kudryashov (2003) a salsichas armazenadas durante 60 dias à temperatura de 2°C, às quais foram adicionadas diferentes quantidades de nitrito, demonstraram que a maior redução da concentração de nitrito ocorre durante o período de tempo que compreende a adição da salmoura até ao final do tratamento térmico. Esta redução corresponde a cerca de 65%, sendo este valor independente da concentração inicialmente adicionada. Kudryashov constatou igualmente que após 20 dias de armazenamento, a concentração de nitrito corresponde a cerca de um terço da concentração presente logo após o tratamento térmico. Este estudo revelou que a diminuição da concentração de nitrito nos produtos em análise continuou até ao final dos 60 dias de armazenamento (Honikel, 2008).

Anos antes, Dordević e seus colaboradores (1980) demonstraram que o aumento do pH do meio retarda a diminuição da concentração de nitrito e de nitrato ao longo do período de tempo correspondente ao armazenamento (Honikel, 2008).

Já Gibson e seus colaboradores (1984) comprovaram que a diminuição da concentração de nitrito, no período que antecede o tratamento térmico do produto cárneo, era acelerada pela adição de ascorbato. No entanto, com a adição de ascorbato e de polifosfatos aos produtos cárneos e com a aplicação de tratamento térmico, a diminuição da concentração de nitritos ao longo do tempo era retardada. Este facto era devido provavelmente à inactivação de microrganismos e/ou de enzimas provocado pelo aquecimento (Honikel, 2008).

Segundo Honikel (2008) e Cassens (1990), o nitrito também reage com vários componentes presentes nos produtos cárneos, não só a mioglobina, mas também lípidos e proteínas “não heme”. Este facto levanta um problema pertinente: a possibilidade de o nitrito reagir com aminas formando nitrosaminas, um composto conhecido por possuir acção carcinogénica (Honikel, 2008).

1.2.5 Formação de nitrosaminas e efeitos sobre a saúde

Durante a década de 70 do século passado, a detecção ocasional de nitrosaminas em produtos cárneos curados tornou-se um motivo de preocupação da comunidade científica. Após este período de tempo muitos foram os estudos desenvolvidos neste âmbito, e por isso a adição de sais de nitrito ou de nitrato tem sido muito discutível, devido à possibilidade de originarem nitroso-compostos com acção carcinogénica (EFSA Journal, 2003; Oliveira *et al*, 2005).

Baseado na literatura disponível, as fontes dietéticas de nitrito e de nitrato no Homem têm diferentes origens. A principal fonte de nitratos da alimentação humana provém do consumo de algumas plantas, como os espinafres, a beterraba, o funcho, as couves, a salsa, as cenouras, os cereais, as batatas, o alho-porro e os rabanetes, devido ao uso de fertilizantes azotados usados na agricultura para promoção do seu crescimento. Já a fonte de nitritos na dieta humana provém principalmente da ingestão de produtos cárneos curados, de produtos derivados da pesca fumados e de aves (aos quais são adicionados nitritos durante o seu processamento). A água consumida, se estiver contaminada com nitritos e/ou nitratos, provenientes, por exemplo, do uso de fertilizantes azotados na agricultura, pode também ser uma fonte das moléculas acima mencionadas. Na sequência das observações verificadas foram efectuados estudos pormenorizados pela comunidade científica, que

concluíram que apenas 5% da ingestão média de nitritos e de nitratos provem do consumo de produtos cárneos curados (Pennington, 1998; Epley *et al*, 1992; World Health Organization, 2010).

O nitrito é mais tóxico que o nitrato, e uma vez que este composto se distribui rapidamente por todo o organismo, pode originar vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa. Ao chegar à corrente sanguínea, o nitrito pode reagir com a hemoglobina e provocar metahemoglobinemia, impedindo que ocorra o transporte normal de oxigénio. Durante esta reacção o átomo de ferro é oxidado do estado Fe^{2+} a Fe^{3+} (ver figura 1.23 seguinte). Esta situação é potencialmente grave em crianças mais pequenas: dada a insuficiente acidez do suco gástrico da criança, os nitratos ingeridos convertem-se em nitritos os quais, como forma instável de azoto, têm tendência a oxidar-se novamente a nitrato, utilizando o oxigénio transportado pelo sangue, retirando-o à hemoglobina e transformando-a em metahemoglobina (Gouveia e Peralta, 2004; Oliveira *et al*, 2005; World Health Organization, 2010).

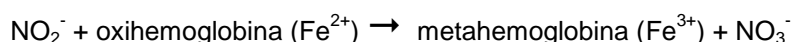


Figura 1.23: Reacção química que pode provocar metahemoglobinemia nos humanos (World Health Organization, 2010).

Um outro risco potencial para a saúde humana é a formação de nitrosaminas com acção carcinogénica. As nitrosaminas (compostos orgânicos de estrutura $R_2N-N=O$) são compostos obtidos a partir da reacção química entre nitritos e aminas¹⁰ secundárias em condições fortemente ácidas. No estômago, local onde o pH é ácido e onde se podem encontrar todos esses compostos, os riscos de formação são elevados, tendo sido provada uma relação causa-efeito quanto à evolução de cancro do estômago em alguns animais aquando da sua exposição àqueles compostos (Mendes e Oliveira, 2004). Neste caso, o HNO_2 decompõe-se no anião NO^+ , que por sua vez reage com aminas secundárias, dando origem à formação de nitrosaminas. Na figura 1.24 seguinte estão representadas as reacções químicas que originam a formação de nitrosaminas (Honikel, 2008; World Health Organization, 2010).

¹⁰ As aminas são compostos orgânicos de estrutura R_3N , em que R pode representar o H, um grupo que contenha um anel benzénico (grupo aril) ou um grupo que contenha C e H (grupo alquilo).

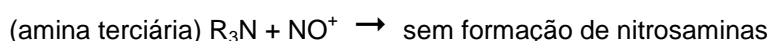
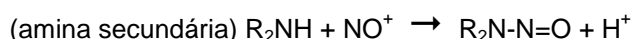
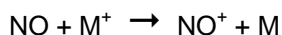
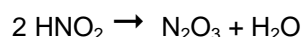
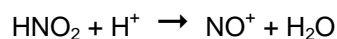
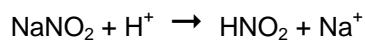


Figura 1.24: Reações químicas que descrevem a formação de nitrosaminas (M/M⁺ representam íons metálicos de transição como o Fe²⁺/Fe³⁺) (Honikel, 2008).

Acredita-se que pequenas quantidades de nitrosaminas se podem formar em determinados produtos cárneos curados, mas apenas em algumas circunstâncias:

- é necessário a presença de aminas; na carne fresca, apenas uma pequena quantidade de aminas está presente, nomeadamente a creatina, a creatinina e os aminoácidos livres (como a prolina e a hidroxiprolina);
- apenas as aminas secundárias podem formar nitrosaminas estáveis, uma vez que as aminas primárias são imediatamente degradadas em álcool e em azoto e as aminas terciárias não conseguem reagir; na carne, a maioria das aminas presentes são primárias derivadas de α -aminoácidos;
- o pH do meio deve ter um valor suficientemente baixo (como por exemplo o meio gástrico) para originar o anião NO⁺ ou existirem íons metálicos que reajam com o NO para formar o anião NO⁺ (Honikel, 2008).

A aplicação de temperaturas relativamente altas (superiores a 130°C), como as usadas na fritura, pode também desencadear a formação de nitrosaminas (Honikel, 2008).

Já a adição de substâncias antioxidantes, como o ácido ascórbico ou o ascorbato, aos produtos cárneos curados reduz a quantidade de nitrito residual e inibe a formação de nitroso-compostos, uma vez que este composto reduz o nitrito a NO_x, oxidando-se por sua vez a ácido dehidroascórbico (forma oxidada do ácido ascórbico). Por este motivo, a indústria tem adicionado menores quantidades de nitrito e tem adicionado maiores porções de ascorbato (Mirvish, 1994; Pennington, 1998; World Health Organization, 2010).

1.2.6 Legislação

Segundo estudos efectuados pela *Organização Mundial de Saúde* na avaliação dos efeitos causados pelo nitrito e pelo nitrato na saúde, estabeleceu que a dose diária aceitável (ADI):

- está compreendida entre 0 e 3,7 mg/kg de peso corporal por dia de NO_3^- e
- está compreendida entre 0 e 0,06 mg/kg de peso corporal por dia de NO_2^- (World Health Organization, 2010).

De salientar que os valores de ADI anteriormente apresentados não são aplicáveis a bebés com menos de 3 meses, devido à elevada susceptibilidade de virem a sofrer de metahemoglobinemia (World Health Organization, 2010).

Desta forma, com a intenção de manter o teor de nitrosaminas o mais baixo possível (tendo em conta as consequências para a saúde), o Parlamento Europeu adoptou a Directiva 2006/52/CE com o objectivo de reduzir o teor de nitritos e de nitratos adicionados aos alimentos, embora continuando a manter a segurança microbiológica dos produtos alimentares (Directiva 2006/52/CE de 5 de Julho de 2006). Esta legislação comunitária foi transposta para o direito português através do Decreto-lei 33/2008, que estabelece as condições a que deve obedecer a utilização dos aditivos alimentares, com excepção dos corantes e edulcorantes (DL 33/2008 de 25 de Fevereiro de 2008). A legislação em vigor sugere que, nos produtos à base de carne (com excepção do 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 NaNO_2/kg de peso (comercializado numa mistura com sal ou um substituto do sal) (DL 33/2008 de 25 de Fevereiro de 2008). Segundo estudos efectuados 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 nitrito presente 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).

Já a adição de nitratos em produtos à base de carne está proibida no nosso país por não exercer qualquer acção directa na inibição do crescimento de *Clostridium botulinum* na maior parte destes alimentos (EFSA Journal, 2003; Comissão das Comunidades Europeias, 2007; DL 33/2008 de 25 de Fevereiro de 2008).

2. METODOLOGIA

Para a determinação do teor de nitritos e de nitratos presentes em amostras de fiambre da perna extra e de mortadela do tipo Bolonhesa recorreu-se ao método espectrofotométrico. Segundo a norma NP 1846:2006, a determinação espectrofotométrica de nitritos em produtos cárneos, baseia-se em reacções de diazotação do nitrito com cloreto de sulfanilamida e ligação com cloreto de N-(1-Naftil)etileno-diamina para obtenção de uma coloração avermelhada, seguida de medição fotométrica a um comprimento de onda (λ) de 538 nm. Tendo por base a norma NP 1847-1:2009 em vigor, a determinação espectrofotométrica de nitratos em produtos cárneos, baseia-se igualmente na obtenção de uma coloração avermelhada devido à adição de cloreto de sulfanilamida e de cloreto de naftilenodiamina, após a redução prévia deste composto a nitrito, recorrendo a uma coluna de cádmio. Em seguida, procede-se à medição fotométrica da coloração a um λ de 538 nm. (Oliveira *et al*, 2004; Norma NP 1846:2006; Norma NP 1847-1:2009).

Para a determinação da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais em amostras de fiambre e de mortadela recorreu-se também ao método espectrofotométrico. Para se conhecer a concentração de nitroso-pigmentos em produtos cárneos curados recorre-se à medição fotométrica a um λ de 540 nm do pigmento nitrosilhemocromo, após extracção numa solução contendo 80% de acetona em água (considerando que a amostra de carne em análise é constituída por 70% em água). Após acidificação, o nitrosilhemocromo em solução é completamente oxidado a hematina cuja estrutura se apresenta na figura 2.1 seguinte (Wrolstad *et al*, 2005).

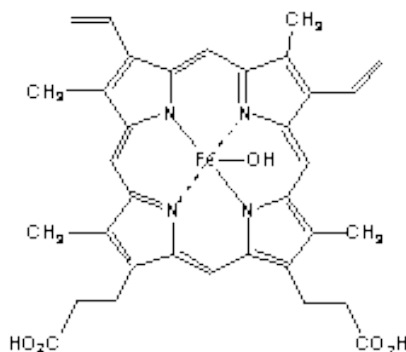


Figura 2.1: Estrutura da molécula de hematina (<http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/hematin.html>).

Segundo Hornsey (1956), a aplicação de uma solução de extracção a 80% de acetona em água apenas consegue extrair o pigmento nitrosilhemocromo de cor rosada, não conseguindo extrair nenhum outro grupo heme. Posto isto, e considerando que a totalidade de nitrosilhemocromo é oxidada a hematina, estabeleceu-se que a concentração deste pigmento é expressa em equivalentes de hematina (1 mg/kg de nitrosilhemocromo = 1 mg/kg de hematina) (Wrolstad *et al*, 2005).

A concentração de pigmentos totais presentes em produtos cárneos é determinada após extracção com uma solução acidificada de acetona, desde que os grupos heme que constituem o produto cárneo em estudo sejam solubilizados e oxidados a hematina, procedendo-se em seguida à sua medição fotométrica a um λ de 640 nm (Hornsey, 1956).

Descrevem-se em seguida os passos necessários às determinações pretendidas.

2.1 Amostras analisadas

O estudo do presente trabalho foi realizado em três lotes de fiambre da perna extra produzidos pela empresa X, tendo-se efectuado as determinações experimentais na carne após o processo de massagem (correspondendo ao tempo $t = 0$) e no produto final após a cozedura e consequente tranchagem e embalamento em doses de 200 g em atmosfera modificada (correspondendo ao tempo $t = 1$). As determinações foram igualmente realizadas nos mesmos três lotes de produto ao longo do seu prazo de vida útil (que compreende cerca de 45 dias), sendo que as amostras em análise foram previamente fatiadas e embaladas em doses de 200 g em atmosfera modificada (constituída por uma mistura contendo 30 ± 3 % de dióxido de carbono e restante percentagem de azoto) e armazenadas em câmara refrigerada entre os 0°C e os 5°C. De salientar que a formulação usada na preparação destes lotes de fiambre é constituída por: 80% de perna de suíno, 20% de salmoura contendo água, sal, dextrose, lactato de sódio, 0,5% de emulsionantes (como trifosfato pentassódico e difosfato tetrapotássico), gelificantes (como carragenina), 0,05% de antioxidantes (como ascorbato de sódio), 0,1% de aromas, 0,1% de intensificadores de sabor (como glutamato monossódico, gualinato dissódico e inosinato dissódico) e conservantes, nomeadamente 150 mg de NaNO_2/kg de peso (empresa X, 2009b).

O estudo foi ainda realizado em 3 lotes de mortadela do tipo Bolonhesa cuja formulação contém as seguintes matérias-primas: 72% de carne e gordura de suíno, 19% de água, menos de 2% de especiarias (como pimenta preta em grão e massa de alho), menos de 7% de uma mistura de fécula, de proteína de soja, de dextrose e de sal nitritado na proporção de 2% (constituído por 99,4% de sal e 0,6% de NaNO_2 , que corresponde aproximadamente a 120 mg de NaNO_2/kg). A formulação contém ainda 1% de preparado para mortadela, dos quais 0,122% correspondem a fosfatos, 0,050% correspondem a ácido ascórbico e ASC e a restante percentagem corresponde a reguladores de acidez (glucodeltalactona) e corantes (carmim cochonilha) (empresa X, 2009b). Neste caso, e tal como para o fiambre, as determinações experimentais foram realizadas após a mistura de ingredientes e antes de se proceder ao seu enchimento nos invólucros (correspondendo ao tempo $t = 0$) e no produto final após a cozedura e consequente tranchagem e embalamento em doses de 200 g em atmosfera modificada (correspondendo ao tempo $t = 1$). As determinações foram igualmente realizadas nos mesmos 3 lotes de produto final ao longo do seu prazo de vida útil (que compreende cerca de 45 dias), sendo que as amostras em análise foram previamente fatiadas e embaladas em doses de 200 g em atmosfera modificada (constituída por uma mistura contendo 30 ± 3 % de dióxido de carbono e restante percentagem de azoto) e armazenadas em câmara refrigerada entre os 0°C e os 5°C. No Anexo I é possível consultar com mais detalhe as especificações da mistura de gases que constituem a atmosfera modificada (Arquivo pessoal da empresa X).

Todas as determinações foram efectuadas em duplicado no Laboratório da empresa X sediada no Montijo.

2.2 Reagentes usados

Todos os reagentes usados nas determinações efectuadas apresentavam qualidade analítica e a água utilizada era destilada.

2.2.1 Determinação do teor de nitritos e de nitratos

A coluna de cádmio usada na determinação de nitrato foi cheia com cádmio metálico de granulometria entre os 30 mm e os 80 mm (Merck) e no seu pré-tratamento usou-se ácido clorídrico 0,1N (Scharlab, S.L.).

Na elaboração da solução-mãe de nitrito de sódio para preparação dos padrões usados na calibração do espectrofotómetro usaram-se os seguintes reagentes: nitrito de sódio (p.a., Merck) e água destilada.

Na elaboração da solução-mãe de nitrato de potássio usada na verificação do poder redutor da coluna de cádmio recorreram-se aos seguintes reagentes: nitrato de potássio (p.a., Merck) e água destilada.

Na preparação da solução-tampão amoniacal de pH entre 9,6 e 9,7 usaram-se os seguintes reagentes: ácido clorídrico concentrado (a 37%, Carlo Erba Reagents), sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético (p.a., José M. Gomes dos Santos,Lda), amónia (a 25%, Riedel-de Haën) e água destilada.

Na preparação da solução I para desenvolvimento da coloração usaram-se os seguintes reagentes: sulfanilamida (p.a., Merck), ácido clorídrico concentrado (a 37%, Carlo Erba Reagents) e água destilada.

Na preparação da solução II para desenvolvimento da coloração usaram-se os seguintes reagentes: cloreto N-(1-Naftil)etileno-diamina dihidratado (p.a., Merck) e água destilada.

Na preparação da solução III para desenvolvimento da coloração usaram-se os seguintes reagentes: ácido clorídrico concentrado (a 37%, Carlo Erba Reagents) e água destilada.

Na elaboração da solução saturada de bórax usada na defecação da amostra a analisar usaram-se os seguintes reagentes: tetraborato de sódio decahidratado (p.a., Merck) e água destilada.

Na preparação do reagente I usado na defecação da amostra recorreram-se aos seguintes reagentes: hexacianoferrato de potássio II trihidratado (p.a., Merck) e água destilada.

Já na preparação do reagente II usado na defecação da amostra recorreram-se aos reagentes: acetato de zinco dihidratado (p.a., Riedel-de Haën), ácido acético glacial (a 99,8%, Riedel-de Haën) e água destilada.

Na filtração da amostra foi usada celite 545 de granulometria entre os 0,3 e os 0,8 mm (p.a., Merck).

No Anexo II é possível consultar com mais detalhe a preparação das soluções usadas.

2.2.2 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos

Na determinação da concentração de nitroso-pigmentos das amostras utilizaram-se os seguintes reagentes: acetona (p.a, Pronalab) e água destilada.

2.2.3 Determinação da concentração de pigmentos totais

Na determinação da concentração de pigmentos totais das amostras utilizaram-se os seguintes reagentes: acetona (p.a, Pronalab), ácido clorídrico concentrado (a 37%, Carlo Erba Reagents) e água destilada.

2.3 Equipamentos e material usados

Para se proceder à realização da análise espectrofotométrica das amostras dos lotes em estudo recorreu-se a material corrente de laboratório, bem como a coluna de vidro com regulação de débito, a picadora 1,2,3 da marca *Moulinex*, a balança analítica com resolução de 0,0001 da marca *Sartorius A120S Analytic*, a banho de água regulado à temperatura de 80°C da marca *Concessus S.A.R.L.* e a espectrofotómetro da marca *DR LANGE cada50 Spektral Photometer* com célula de quartzo de 1 cm de percurso óptico.

Para a filtração das amostras usaram-se filtros de papel MN 640 m (Macherey-Nagel) com 150 mm de diâmetro, 0,2 mm de espessura e 4 a 12 µm de capacidade média de retenção.

2.4 Procedimento Experimental

Para uma visualização mais rápida, apresentam-se resumidamente sob a forma de fluxograma, todos os procedimentos experimentais que foram executados ao longo do trabalho laboratorial.

2.4.1 Calibração do espectrofotómetro

Para que o espectrofotómetro usado nas determinações experimentais possa fornecer directamente os valores analisados de nitrito e de nitrato em concentração (em µg de NaNO₂ ou de NaNO₃ por mL), tem de se proceder previamente à sua calibração. Assim sendo, recorrendo à Norma NP 1846:2006, procedeu-se tal como se descreve em seguida.

- a. Começar por pipetar 5 mL da solução-mãe de nitrito de sódio (10 mg de nitrito de sódio por mL) para um balão volumétrico de 1000 mL, perfazer o volume com água e homogeneizar.
- b. Para se obterem os padrões pipetar respectivamente 5 mL, 10 mL e 20 mL da solução preparada anteriormente para três balões volumétricos de 100 mL, perfazer o volume de cada um com água destilada e homogeneizar (as concentrações padrão obtidas correspondem respectivamente a 2,5 µg, 5,0 µg e 10,0 µg de nitrito de sódio por mL).

- c. Pipetar depois 10 mL de cada uma das soluções padrão anteriores para balões volumétricos de 100 mL.
- d. Pipetar igualmente 10 mL de água destilada para um balão volumétrico de 100 mL para obter o branco e seguir o mesmo procedimento usado nos padrões.
- e. Adicionar a cada balão volumétrico 50 mL de água destilada.
- f. Após o passo anterior, adicionar 10 mL de solução I para desenvolvimento da coloração, 6 mL de solução III para desenvolvimento da coloração, homogeneizar e deixar em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
- g. Adicionar 2 mL de solução II para desenvolvimento da coloração, homogeneizar e deixar em repouso durante 3 a 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após o período de tempo estabelecido perfazer o volume de cada balão com água destilada e homogeneizar.
- h. Ler no espectrofotómetro os valores de absorvância de cada solução padrão a um λ de 538 nm e aferir o zero do equipamento com o ensaio em branco. Por último, introduzir na memória do espectrofotómetro os valores de absorvância obtidos anteriormente para programar a respectiva recta de calibração das absorvâncias em função das concentrações dos padrões.

De salientar que a calibração do equipamento tem uma validade semanal.

2.4.2 Preparação da amostra

Na preparação da amostra a analisar há que ter em conta que esta deve ser representativa do todo, sendo que a sua quantidade não pode ser inferior a 200 g. Para a preparação da amostra considerou-se o procedimento enunciado na Norma NP 1846:2006, e que se descreve em seguida.

- a. Picar e homogeneizar a amostra para análise numa picadora eléctrica.
- b. Seguidamente, pesar, com uma precisão de pelo menos 0,001 g, cerca de 10 g de amostra para um vidro de relógio, num total de duas tomas diferentes.
- c. Transferir cada toma para um erlenmeyer de 250 mL e juntar sucessivamente 5 mL de solução saturada de bórax e 100 mL de água destilada a uma temperatura superior a 70°C (deitar somente parte da água no erlenmeyer, fragmentar a toma com a ajuda de uma vareta e verter o resto da água para o recipiente lavando a vareta).
- d. Aquecer cada toma durante 15 minutos em banho de água regulado para os 80°C e agitar a cada 5 minutos.
- e. Deixar arrefecer à temperatura ambiente, adicionar sucessivamente 2 mL do reagente I para defecação e 2 mL do reagente II para defecação e homogeneizar após cada adição.

- f. Transferir o conteúdo de cada erlenmeyer para um balão volumétrico de 200 mL, perfazer o volume com água destilada e homogeneizar. Deixar em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos.
- g. Por último, filtrar cada toma usando filtro pregueado, contendo uma colher de celite, para se obter um filtrado límpido.

O filtrado obtido com este procedimento é usado tanto na determinação do teor de nitritos como no teor de nitratos.

2.4.3 Determinação do teor de nitritos

Para a determinação do teor de nitritos das amostras considerou-se o procedimento enunciado na Norma NP 1846:2006, e que se descreve em seguida.

- a. Pipetar 10 mL de cada uma das tomas de filtrado para um balão volumétrico de 100 mL.
- b. Adicionar a cada balão volumétrico 50 mL de água destilada.
- c. Adicionar agora 10 mL de solução I para desenvolvimento da coloração, 6 mL de solução III para desenvolvimento da coloração, homogeneizar e deixar em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
- d. Após o passo anterior, adicionar 2 mL de solução II para desenvolvimento da coloração, homogeneizar e deixar em repouso durante 3 a 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
- e. Após o período de tempo estabelecido perfazer o volume de cada balão com água destilada e homogeneizar.
- f. Para finalizar, ler no espectrofotómetro os valores de concentração de cada toma a um λ de 538 nm.

2.4.4 Determinação do teor de nitratos

Tal como se enunciou anteriormente, na determinação de nitratos de uma amostra é necessário que ocorra previamente a redução de nitratos a nitritos pelo cádmio metálico. Segundo Margeson e colaboradores (1980), o mecanismo de redução de nitratos a nitritos usando uma coluna de cádmio é o seguinte (ver figura 2.5):

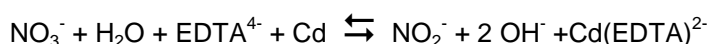


Figura 2.2: Mecanismo de redução de nitratos a nitritos numa coluna de cádmio (Oliveira *et al*, 2004).

Durante o processo de redução, a coluna é mantida numa solução alcalina de modo a estabilizar o nitrito formado; já o ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) adicionado desempenha a função de agente quelante, indo-se ligar ao ião cádmio, formando um complexo estável. Na ausência de EDTA

formar-se-ia o hidróxido de cádmio que iria precipitar no interior da coluna, impedindo o fluxo da amostra em análise (Oliveira *et al*, 2004).

2.4.4.1 Pré-tratamento da coluna de cádmio

Para a realização da pré-preparação da coluna de cádmio considerou-se o procedimento enunciado na Norma NP 1847-1:2009, e que se descreve em seguida.

- a. Lavar a coluna de cádmio com 500 mL de água destilada, deixando o líquido correr continuamente. A partir deste passo o débito da coluna deve ser regulado de modo que o líquido corra com uma velocidade máxima de 3 mL por minuto.
- b. Adicionar 25 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 N e deixar correr gota-a-gota até que o menisco chegue perto do cádmio, mas de forma que o líquido da coluna se mantenha sempre acima do nível de cádmio.
- c. Adicionar depois 50 mL de água destilada e deixar correr gota-a-gota até que o menisco chegue perto do cádmio, mas de forma que o líquido da coluna se mantenha sempre acima do nível de cádmio.
- d. Adicionar uma solução constituída por 3 mL de solução tampão amoniacal e 22 mL de água destilada e deixar correr gota-a-gota até que o menisco chegue perto do cádmio, mas de forma que o líquido da coluna se mantenha sempre acima do nível de cádmio.

2.4.4.2 Verificação do poder redutor da coluna de cádmio

Para a verificação do poder redutor da coluna de cádmio considerou-se o procedimento enunciado na Norma NP 1847-1:2009, e que se descreve em seguida.

- a. Começar por pipetar 5 mL da solução-mãe de nitrato de potássio (14,65 mg de nitrato de potássio por mL) para um balão de 1000 mL, perfazer o volume com água e homogeneizar.
- b. Pipetar 20 mL da solução preparada anteriormente para um tubo de ensaio e adicionar 5 mL de solução tampão amoniacal.
- c. Verter a mistura para o reservatório da coluna de cádmio, deixar correr gota-a-gota tal como descrito anteriormente e recolher o eluído num balão volumétrico de 100 mL.
- d. Lavar as paredes da coluna com 15 mL de água destilada quando esta estiver quase vazia e deixar correr gota-a-gota.
- e. Repetir o passo anterior e depois encher completamente o reservatório da coluna com água destilada, procedendo da mesma forma.
- f. Após recolher um volume aproximado de 100 mL, retirar o balão volumétrico, perfazer o seu volume com água destilada e homogeneizar.

- g. Pipetar 10 mL do eluído anterior para um balão volumétrico de 100 mL.
- h. Adicionar agora ao balão volumétrico 50 mL de água destilada.
- i. Juntar depois 10 mL de solução I para desenvolvimento da coloração, 6 mL de solução III para desenvolvimento da coloração, homogeneizar e deixar em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
- j. Após o passo anterior, adicionar 2 mL de solução II para desenvolvimento da coloração, homogeneizar e deixar em repouso durante 3 a 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
- k. Após o período de tempo estabelecido perfazer o volume do balão com água destilada e homogeneizar.
- l. Para finalizar, ler no espectrofotómetro os valores de concentração de cada toma a um λ de 538 nm.

2.4.4.3 Redução dos nitratos da amostra

Para se proceder à redução de nitratos presentes nas amostras e à sua conseqüente determinação considerou-se o procedimento enunciado na Norma NP 1847-1:2009, que se descreve em seguida.

- a. Pipetar 20 mL de cada uma das tomas de filtrado obtido anteriormente para um tubo de ensaio e adicionar 5 mL de solução tampão amoniacal.
- b. Verter a mistura para o reservatório da coluna de cádmio, deixar correr gota-a-gota tal como descrito anteriormente e recolher o eluído num balão volumétrico de 100 mL.
- c. Lavar as paredes da coluna com 15 mL de água destilada quando esta estiver quase vazia e deixar correr gota-a-gota.
- d. Repetir o passo anterior e depois encher completamente o reservatório da coluna com água destilada, procedendo da mesma forma.
- e. Após recolher um volume aproximado de 100 mL, retirar o balão volumétrico, perfazer o seu volume com água destilada e homogeneizar.
- f. Pipetar 20 mL do eluído anterior para um balão volumétrico de 100 mL e em seguida adicionar a 40 mL de água destilada.
- g. Adicionar posteriormente 10 mL de solução I para desenvolvimento da coloração, 6 mL de solução III para desenvolvimento da coloração, homogeneizar e deixar em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
- h. Adicionar 2 mL de solução II para desenvolvimento da coloração, homogeneizar e deixar em repouso durante 3 a 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
- i. Após o período de tempo estabelecido perfazer o volume do balão com água destilada e homogeneizar.

- j. Por fim, ler no espectrofotómetro os valores de concentração de cada toma a um λ de 538 nm.

2.4.5 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais

2.4.5.1 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos

Para se determinar a concentração de nitroso-pigmentos considerou-se o procedimento descrito por Koniecko (1979), que se descreve em seguida.

- a. Começar por picar e homogeneizar a amostra para análise numa picadora eléctrica.
- b. Pesas, com uma precisão de pelo menos 0,0001 g, cerca de 10 g de amostra para um erlenmeyer de 100 mL, num total de duas tomas diferentes.
- c. Adicionar 40 mL de acetona e 3 mL de água destilada e macerar a amostra com uma vareta.
- d. Agitar cada toma continuamente durante 5 minutos num ambiente com luminosidade reduzida.
- e. Filtrar cada toma para erlenmeyer de 100 mL.
- f. Preparar o branco contendo 40 mL de acetona e 3 mL de água destilada.
- g. Para finalizar, ler no espectrofotómetro os valores de absorvância do filtrado a um λ de 540 nm, aferindo o zero do equipamento com o ensaio em branco.

2.4.5.2 Determinação da concentração de pigmentos totais

Para se determinar a concentração de pigmentos totais considerou-se o procedimento descrito por Koniecko (1979), que se descreve em seguida.

- a. Picar e homogeneizar a amostra para análise numa picadora eléctrica.
- b. Pesas, com uma precisão de pelo menos 0,0001 g, cerca de 10 g de amostra para um erlenmeyer de 100 mL, num total de duas tomas diferentes.
- c. Adicionar 40 mL de acetona, 2 mL de água destilada e 1 mL de ácido clorídrico concentrado e macerar a amostra com uma vareta.
- d. Tapar o erlenmeyer com um vidro de relógio e deixar em repouso durante 1 hora à temperatura ambiente e no escuro.
- e. Filtrar cada toma para erlenmeyer de 100 mL.
- f. Preparar o branco contendo 40 mL de acetona, 2 mL de água destilada e 1 mL de ácido acético concentrado.
- g. Para finalizar o procedimento, ler no espectrofotómetro os valores de absorvância do filtrado a um λ de 640 nm, aferindo o zero do equipamento com o ensaio em branco.

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1 Determinação do teor de nitritos e de nitratos

3.1.1 Calibração

Para que o espectrofotómetro usado nas determinações experimentais possa fornecer directamente os valores analisados de nitrito e de nitrato em concentração (em μg de NaNO_2 ou de NaNO_3 por mL), tem de se proceder previamente à sua “auto-calibração”. Esta calibração é efectuada pelo próprio equipamento, através da introdução na sua memória dos valores de absorvância obtidos na análise dos padrões em função das concentrações desses mesmos padrões. A partir dos valores introduzidos, o equipamento constrói uma função de calibração por regressão linear, através da qual determina o teor de nitrito e de nitrato das amostras analisadas. Na tabela 3.1 estão enumeradas as absorvâncias medidas semanalmente, valores esses envolvidos na obtenção da função de calibração por regressão linear e na respectiva equação da recta.

Tabela 3.1: Dados referentes à análise dos padrões e respectiva equação da recta do tipo $y = mx + b$, sendo y a absorvância medida ao λ de 538 nm e x a concentração dos padrões.

Semana	Concentração dos padrões ($\mu\text{g/mL}$)	Abs ($\lambda = 538 \text{ nm}$)	Equação da recta	R^2
1	0	0,0	$y = 0,674x + 0,012$	0,998
	2,5	0,185		
	5,0	0,367		
	10,0	0,676		
2	0	0,0	$y = 0,738x - 0,001$	0,999
	2,5	0,185		
	5,0	0,365		
	10,0	0,739		
3	0	0,0	$y = 0,739x + 0,003$	0,999
	2,5	0,189		
	5,0	0,378		
	10,0	0,739		
4	0	0,0	$y = 0,741x + 0,002$	0,999
	2,5	0,189		
	5,0	0,376		
	10,0	0,742		
5	0	0,0	$y = 0,758x + 0,003$	0,999
	2,5	0,194		
	5,0	0,384		
	10,0	0,759		

Semana	Concentração dos padrões ($\mu\text{g/mL}$)	Abs ($\lambda = 538 \text{ nm}$)	Equação da recta	R^2
6	0	0,0	$y = 0,734x + 0,003$	0,999
	2,5	0,188		
	5,0	0,374		
	10,0	0,735		
7	0	0,0	$y = 0,748x + 0,003$	0,999
	2,5	0,191		
	5,0	0,380		
	10,0	0,749		
8	0	0,0	$y = 0,766x + 0,004$	0,999
	2,5	0,199		
	5,0	0,391		
	10,0	0,768		
9	0	0,0	$y = 0,760x + 0,004$	0,999
	2,5	0,196		
	5,0	0,390		
	10,0	0,761		
10	0	0,0	$y = 0,706x - 0,004$	0,999
	2,5	0,165		
	5,0	0,350		
	10,0	0,702		
11 – início da semana	0	0,0	$y = 0,714x - 0,001$	0,999
	2,5	0,176		
	5,0	0,356		
	10,0	0,713		
11- meio da semana	0	0,0	$y = 0,714x + 0,003$	0,999
	2,5	0,183		
	5,0	0,365		
	10,0	0,715		
12	0	0,0	$y = 0,700x - 0,001$	0,999
	2,5	0,178		
	5,0	0,342		
	10,0	0,702		
13	0	0,0	$y = 0,717x + 0,003$	0,999
	2,5	0,185		
	5,0	0,364		
	10,0	0,718		
14	0	0,0	$y = 0,727x + 0,004$	0,999
	2,5	0,187		
	5,0	0,372		
	10,0	0,728		

Semana	Concentração dos padrões ($\mu\text{g/mL}$)	Abs (λ de 538 nm)	Equação da recta	R^2
15 e 16	0	0,0	$y = 0,705x + 0,004$	0,999
	2,5	0,181		
	5,0	0,364		
	10,0	0,705		
17	0	0,0	$y = 0,730x + 0,007$	0,999
	2,5	0,197		
	5,0	0,374		
	10,0	0,734		
18	0	0,0	$y = 0,728x + 0,001$	0,999
	2,5	0,182		
	5,0	0,369		
	10,0	0,727		

Sabendo que o coeficiente de correlação (R^2) obtido da aplicação da regressão linear mede o grau de associação linear entre a absorvância e a concentração, então para que se possa afirmar que a linearização é aceitável será necessário obter um valor de R^2 superior a 0,995. Por observação da tabela 3.1 anterior verifica-se que os valores de R^2 são sempre superiores a 0,995.

3.1.2 Análise das amostras de fiambre e de mortadela

Após concluir a calibração semanal do espectrofotómetro, procedeu-se à análise das diferentes amostras dos lotes de fiambre da perna extra e de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo. As concentrações semanais obtidas para cada amostra analisada foram auferidas por interpolação, recorrendo às equações das rectas que definem as funções de calibração linear anteriormente determinadas.

Todo o tratamento de resultados, incluindo o tratamento estatístico, foi efectuado com o auxílio de uma folha de cálculo do programa *Microsoft Office Excel 2007*[®]. Para se determinar a função que melhor define o comportamento em estudo recorreu-se ao programa *Statistic 7 six sigma*[®].

3.1.2.1 Cálculo do teor de nitritos e de nitratos

Segundo a norma NP 1846:2006 em vigor, para calcular o teor de nitritos, expresso em $\text{mg NaNO}_2/\text{kg}$ de amostra, recorre-se à expressão (3.1) seguinte:

$$\text{teor nitritos (mgNaNO}_2\text{/kg)} = \frac{c \times 20\,000}{m \times v} \quad (3.1)$$

em que c é a concentração, expressa em $\mu\text{g NaNO}_2/\text{mL}$, determinada na recta de calibração e correspondente à absorvância da solução em análise, e neste caso, dada automaticamente pelo equipamento espectrofotométrico usado; em que m corresponde à massa, expressa em g, da toma

para análise, e em que v corresponde ao volume (expresso em mL) do filtrado obtido para cada toma (Norma NP 1846:2006).

Já segundo a norma NP 1847-1:2009, pode-se determinar o teor de nitratos, expresso em mg NaNO_3/kg de amostra, recorrendo à expressão (3.2) seguinte:

$$\text{teor nitratos (mgNaNO}_3\text{/kg)} = 1,232 \times \left[\frac{\left(\frac{C}{pr}\right) \times 100\,000}{m \times v} - c_{\text{NaNO}_2} \right] \quad (3.2)$$

em que c é a concentração, expressa em $\mu\text{g NaNO}_3/\text{mL}$, determinada na recta de calibração correspondente à absorvância da solução em análise, e neste caso, dada automaticamente pelo equipamento espectrofotométrico usado; em que m corresponde à massa, expressa em g, da toma para análise; em que v corresponde ao volume, expresso em mL, do filtrado obtido para cada toma; em que pr é a concentração, em $\mu\text{g NaNO}_2/\text{mL}$, determinada na recta de calibração, correspondente à absorvância da solução referente ao poder redutor da coluna de cádmio e em que c_{NaNO_2} corresponde ao teor de nitrito da amostra, expresso em mg NaNO_2/kg , determinado de acordo com a norma NP 1846:2006.

Por sugestão desta norma, tanto o teor de nitritos como o teor de nitratos determinado deve ser arredondado às unidades (Norma NP 1847-1:2009).

3.1.2.2 Determinação do teor de nitritos e de nitratos do fiambre da perna extra

Tendo por base as concentrações obtidas para cada uma das amostras dos lotes de fiambre analisados e recorrendo às expressões (3.1) e (3.2), determinaram-se os seus teores de nitrito e de nitrato logo após a massagem da carne no bombo, após a cozedura do fiambre e respectiva tranchagem e embalamento e ao longo do período experimental. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 3.2, 3.3, 3.4:

Tabela 3.2: Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO₂/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO₃/kg) do lote 1 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Teor de Nitrito (mg NaNO ₂ /kg)	Teor de Nitrato (mg NaNO ₃ /kg)	Observações
1	0	124	47	carne após o bombo
1	1	80	54	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
2	6	29	34	fiambre embalado ao longo do período experimental
3	13	20	23	
4	20	31	38	
5	27	22	37	
6	34	21	36	
7	41	17	39	
8	48	24	27	
9	55	5	33	
11	69	2	31	

Tabela 3.3: Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO₂/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO₃/kg) do lote 2 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Teor de Nitrito (mg NaNO ₂ /kg)	Teor de Nitrato (mg NaNO ₃ /kg)	Observações
9	0	130	55	carne após o bombo
9	1	44	39	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
10	7	45	31	fiambre embalado ao longo do período experimental
11	13	34	35	
12	20	36	41	
13	27	35	47	
14	34	29	47	
15	41	22	40	
16	48	18	35	
17	55	4	33	
18	62	4	33	

Tabela 3.4: Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO₂/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO₃/kg) do lote 3 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Teor de Nitrito (mg NaNO ₂ /kg)	Teor de Nitrato (mg NaNO ₃ /kg)	Observações
9	0	122	78	carne após o bombo
9	1	36	34	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalamento
10	7	34	26	fiambre embalado ao longo do período experimental
11	13	28	28	
12	20	24	36	
13	27	32	38	
14	34	26	40	
15	41	27	35	
16	48	18	32	
17	55	4	29	
18	62	4	29	

De salientar que embora o prazo de vida útil do fiambre da perna extra em análise seja igual a 45 dias, decidiu-se alargar o período experimental até aos 69 dias no caso do lote 1 e até aos 62 dias para os lotes 2 e 3 durante as determinações do teor de nitritos e de nitratos.

Com os resultados das tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 construiu-se o gráfico do teor de nitritos dos três lotes de fiambre da perna extra em função do tempo (ver figura 3.1).

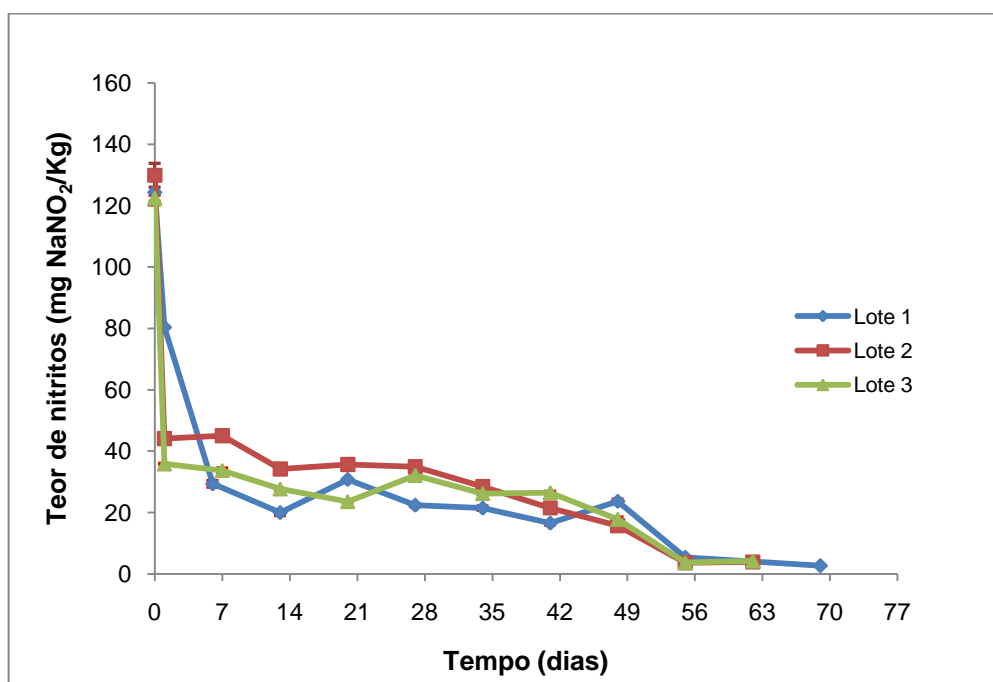


Figura 3.1: Gráfico representativo da evolução do teor de nitritos (expresso em mg NaNO₂/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados.

Com o objectivo de analisar a variação do teor de nitritos dos três lotes de fiambre ao longo do tempo recorreu-se à análise de variância¹¹ (conhecida como ANOVA). A partir dos valores indicados nas tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 aplicou-se o teste ANOVA de uma entrada, para um grau de significância de 0,05. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 3.2 seguinte.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Amostra 1	11	376,8698	34,26089	1304,191		
Amostra 2	11	396,9449	36,0859	1172,888		
Amostra 3	11	353,7094	32,1554	1012,041		
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	85,11309	2	42,55655	0,036591	0,964114	3,31583
Dentro de grupos	34891,2	30	1163,04			
Total	34976,31	32				

Figura 3.2: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único ao teor de nitritos dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo.

¹¹ Testa-se a igualdade de médias fazendo a análise da variância de cada variável, comparando-as de forma agrupada.

A partir da análise dos resultados do teste ANOVA (ver figura 3.2) verifica-se que para o teor de nitritos dos três lotes de fiambre da perna extra o valor de P é superior a 0,05 e que $|F|$ é inferior a $F_{\text{crítico}}$. Daqui se conclui que a variação do teor de nitritos, entre os três lotes em estudo, não foi significativa.

Tendo por base o gráfico da figura 3.1, construiu-se o gráfico do teor médio de nitritos em função do tempo que se apresenta em seguida (ver figura 3.3). No Anexo III é possível consultar com mais detalhe os valores usados na construção deste gráfico.

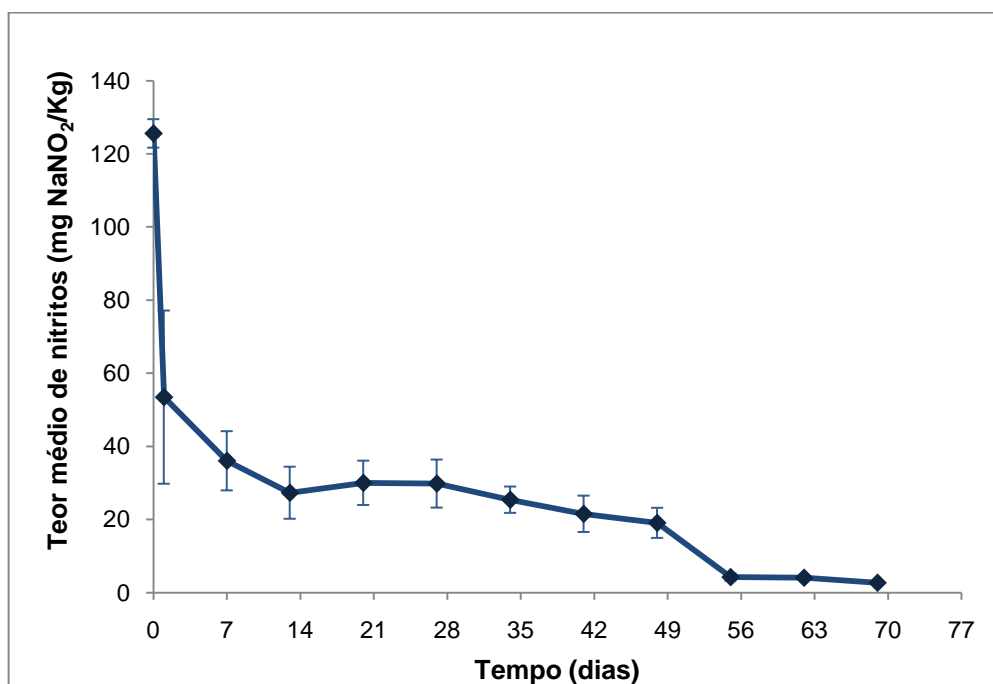


Figura 3.3: Gráfico da evolução do teor médio de nitritos (expresso em mg NaNO₂/kg) ao longo do tempo do fiambre da perna extra em estudo.

Por observação do gráfico da figura 3.3 verifica-se que o teor médio de nitritos presente no tipo de fiambre em estudo vai diminuindo ao longo do tempo. Pode-se verificar que ocorre uma diminuição proeminente do teor médio de nitritos (o valor diminui para cerca de metade) entre o período de tempo que medeia a análise à carne após o processo de massagem e a análise ao produto final após a cozedura e respectiva tranchagem e embalamento. Este facto comprova que, desde o início do processo de produção, uma quantidade de nitrito oxida-se a nitrato e outra quantidade converte-se no NO envolvido no desenvolvimento dos pigmentos característicos. Esta diminuição acentuada também poderá estar relacionada com o facto de o ascorbato presente na formulação deste produto favorecer condições de redução, facilitando assim a redução de nitrito a NO, que por sua vez irá reagir na formação de nitroso-pigmentos.

Sabe-se que a formulação inicial dos lotes de fiambre da perna extra analisados possui aproximadamente 150 mg de NaNO₂/kg de peso. No entanto, as determinações efectuadas imediatamente após o processo de massagem da carne demonstraram que o teor médio de nitritos presente é aproximadamente 126 mg de NaNO₂/kg de peso. Esta observação poderá ser justificada

pelas razões mencionadas anteriormente, e eventualmente a alguma perda por evaporação sob a forma de NO, ocorrida durante os passos do processo produtivo anteriores à massagem no bombo.

As determinações efectuadas após a aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem, bem como ao longo do período experimental deste tipo de fiambre, demonstraram que o teor médio de nitritos continua a diminuir, embora a um ritmo mais lento do que o inicial. No entanto, entre os dias 13 a 27 ocorre um ligeiro aumento deste teor médio, passando de 27 mg de NaNO₂/kg de peso para 30 mg de NaNO₂/kg de peso, possivelmente devido à redução de uma pequena quantidade de nitrato a nitrito, por influência da presença de flora redutora nas amostras analisadas durante este período de tempo.

Verificou-se que após o tempo de vida útil do produto (45 dias), a redução do teor de nitritos é acentuada, passando de cerca de 20 mg de NaNO₂/kg de peso para cerca de 4 mg de NaNO₂/kg de peso, mantendo-se constante nos dias seguintes. A redução do teor médio de nitritos poderá agora estar relacionada com a diminuição do pH do meio devido ao desenvolvimento de microrganismos (como bactérias lácticas) que o tornam mais ácido, já que quanto menor for o pH, maior será a diminuição do teor de nitrito.

Segundo a literatura, um produto cárneo curado está “protegido” contra o crescimento de *Clostridium botulinum* na presença de um teor mínimo de 20 mg de NaNO₂/kg de peso (Robach *et al.*, 1978). Por observação do gráfico da figura 3.3 verifica-se que somente após o 48º dia de período de tempo experimental é que o teor médio de nitritos é inferior a 20 mg de NaNO₂/kg de peso. Por outras palavras, durante os 45 dias de período de tempo experimental (o prazo de vida útil), os nitritos estavam em quantidade suficiente para assegurar a protecção contra o desenvolvimento e crescimento de *Clostridium botulinum*.

Comparando os resultados obtidos com a legislação vigente no nosso país (DL 33/2008), verifica-se que a quantidade de nitrito presente neste produto alimentar após o processo de massagem e imediatamente antes da aplicação do tratamento térmico é inferior a 150 mg de NaNO₂/kg de peso, comprovando que os teores presentes nas amostras analisadas estão de acordo com os limites impostos.

A partir do gráfico anterior (ver figura 3.3) definiu-se a função que melhor descreve a evolução do teor médio de nitritos do fiambre da perna extra ao longo do tempo, para um intervalo de confiança de 95%, apresentada na figura 3.4.

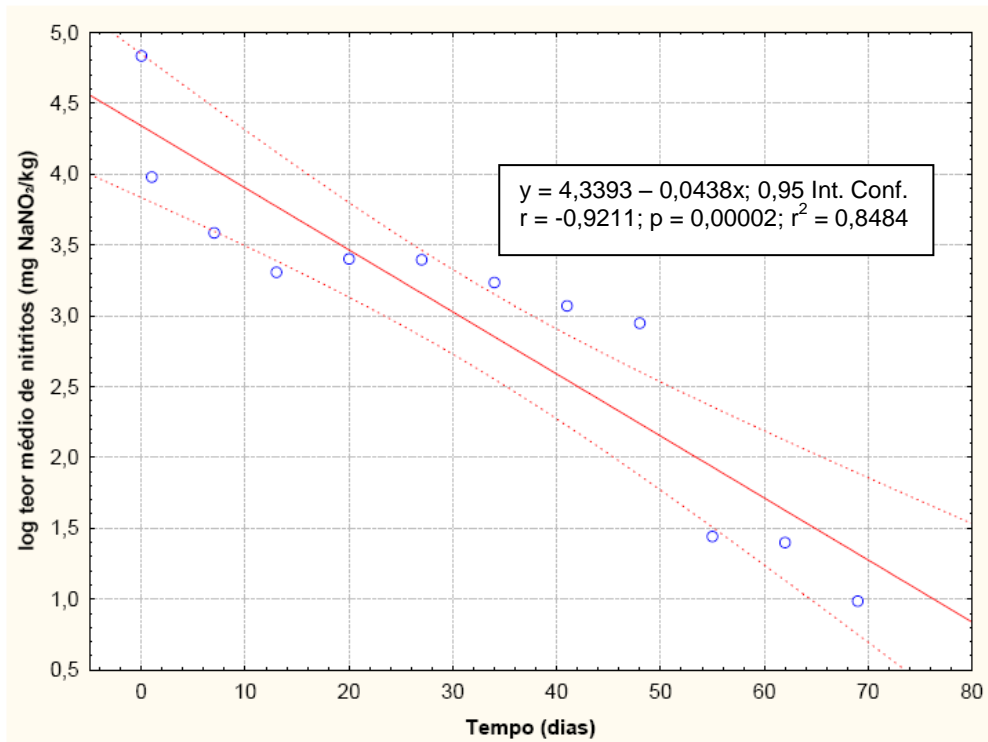


Figura 3.4: Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento do teor médio de nitritos (expresso em mg NaNO₂/kg) ao longo do tempo para o fiambre da perna extra analisado.

Embora o valor de R² obtido no gráfico do logaritmo do teor médio de nitritos em função do tempo seja inferior a 0,995 (valor decorrente do pequeno número de determinações efectuadas), a função que melhor poderá definir o comportamento do teor médio de nitrito no fiambre da perna extra é a logarítmica. São necessários mais dados para averiguar se esta função é realmente a que melhor explica a evolução dos resultados.

Considerando agora os resultados das tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 construiu-se o gráfico do teor de nitratos dos três lotes de fiambre da perna extra em função do tempo (ver gráfico da figura 3.5).

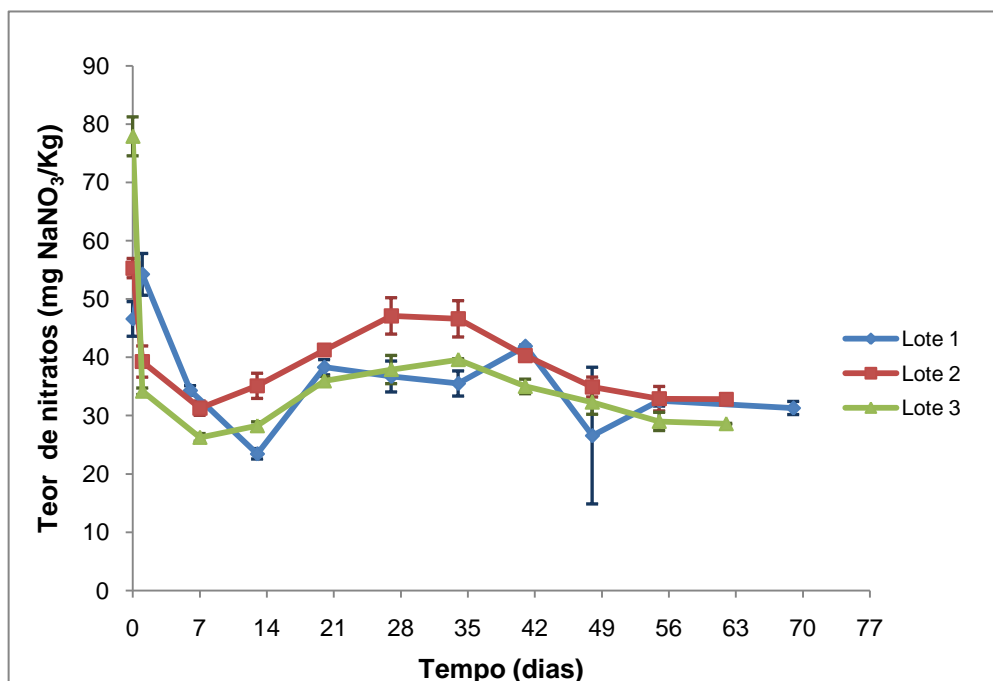


Figura 3.5: Gráfico representativo da evolução do teor de nitratos (expresso em mg NaNO₃/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados.

Tal como para o caso anterior, ao se aplicar o teste ANOVA de uma entrada aos valores do teor de nitratos dos três lotes de fiambre da perna extra apresentados nas tabelas 3.2, 3.3 e 3.4, verifica-se que o valor de P é superior a 0,05 e que $|F|$ é inferior a $F_{\text{crítico}}$ (ver figura 3.6). Assim sendo, não existem variações significativas entre os lotes estudados, em termos do teor de nitratos.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Amostra 1	11	401,3919	36,49017	76,57237		
Amostra 2	11	436,8087	39,70989	55,75824		
Amostra 3	11	404,9124	36,81022	204,2219		
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	69,21585	2	34,60793	0,308492	0,736856	3,31583
Dentro de grupos	3365,526	30	112,1842			
Total	3815,53	32				

Figura 3.6: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único ao teor de nitratos dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo.

A partir da evolução do teor de nitratos dos três lotes de fiambre da perna extra analisados (ver figura 3.5), traçou-se o gráfico da evolução do teor médio de nitratos em função do tempo que se apresenta na figura 3.7. No Anexo III é possível consultar com mais detalhe os valores usados na construção deste gráfico.

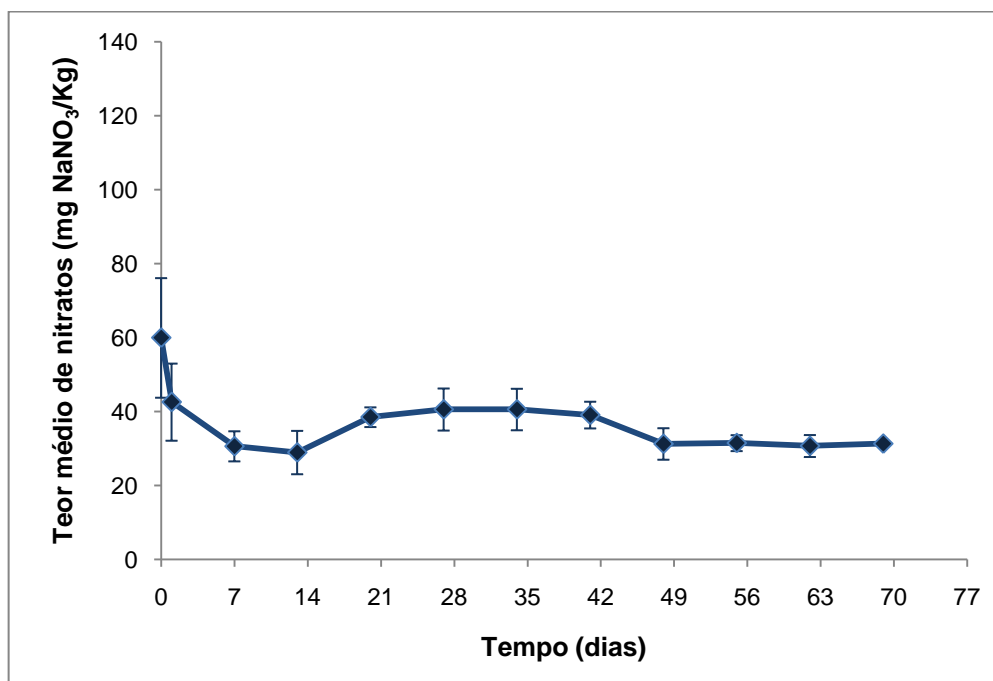


Figura 3.7: Gráfico da evolução do teor médio de nitratos (expresso em mg NaNO₃/kg) ao longo do tempo do fiambre da perna extra analisado.

Embora a formulação inicial dos lotes de fiambre analisados não incluam a adição de nitratos, as determinações efectuadas após o processo de massagem da carne demonstraram que este composto está presente, sendo o teor médio de nitratos determinado aproximadamente igual a 60 mg de NaNO₃/kg de peso (ver figura 3.7). A presença de nitrato deverá ser resultante da oxidação de nitrito a nitrato ocorrido desde o início do processo de fabrico industrial do produto cárneo curado em análise.

Por observação do gráfico anterior (ver figura 3.7) verifica-se que o teor de nitratos presente no fiambre em estudo apresenta um comportamento oscilante ao longo do tempo. A primeira diminuição mais significativa ocorre entre o período de tempo que medeia a análise à carne após o processo de massagem e a análise ao produto final após a cozedura e respectiva tranchagem e embalamento, podendo-se prever a ocorrência de reacções de redução do nitrato a nitrito devido à presença e/ou ao desenvolvimento de flora microbiana, já que a manipulação de matérias-primas e/ou de produtos durante o processo produtivo leva ao desenvolvimento microbiológico.

Durante o período de tempo experimental compreendido entre o dia 1 e o dia 13, o teor de nitratos continua a diminuir, embora sem significado, passando de um valor médio de 43 mg de NaNO₃/kg de peso para um valor médio de 29 mg de NaNO₃/kg de peso. Nos sete dias seguintes observa-se um aumento do teor de nitratos, passando de um valor médio de 29 mg de NaNO₃/kg de peso para um valor médio de 38 mg de NaNO₃/kg de peso, mantendo-se depois constante até ao 41º dia. Este

aumento ligeiro, e sem significado, pode dever-se à oxidação de nitritos. Entre o 41º dia e o 48º dia de período de tempo experimental do produto ocorre uma nova descida, sem significado, passando de um valor médio de 39 mg de NaNO_3/kg de peso para um valor médio de 31 mg de NaNO_3/kg de peso, mantendo-se constante nos dias seguintes. Este novo abaixamento poderá estar relacionado com o desenvolvimento de flora nitrato redutora presente nas amostras de fiambre em análise.

Comparando os gráficos das figuras 3.3 e 3.7 verifica-se que a partir do 7º dia de período de tempo experimental do fiambre da perna extra em estudo, o teor médio de nitritos é inferior ao de nitratos, confirmando os resultados dos ensaios publicados por Dederer (2006).

Também neste estudo se definiu a função que melhor descreve a evolução do teor médio de nitratos do fiambre ao longo do tempo, para um intervalo de confiança de 95%, tal como se pode observar no gráfico da figura 3.8.

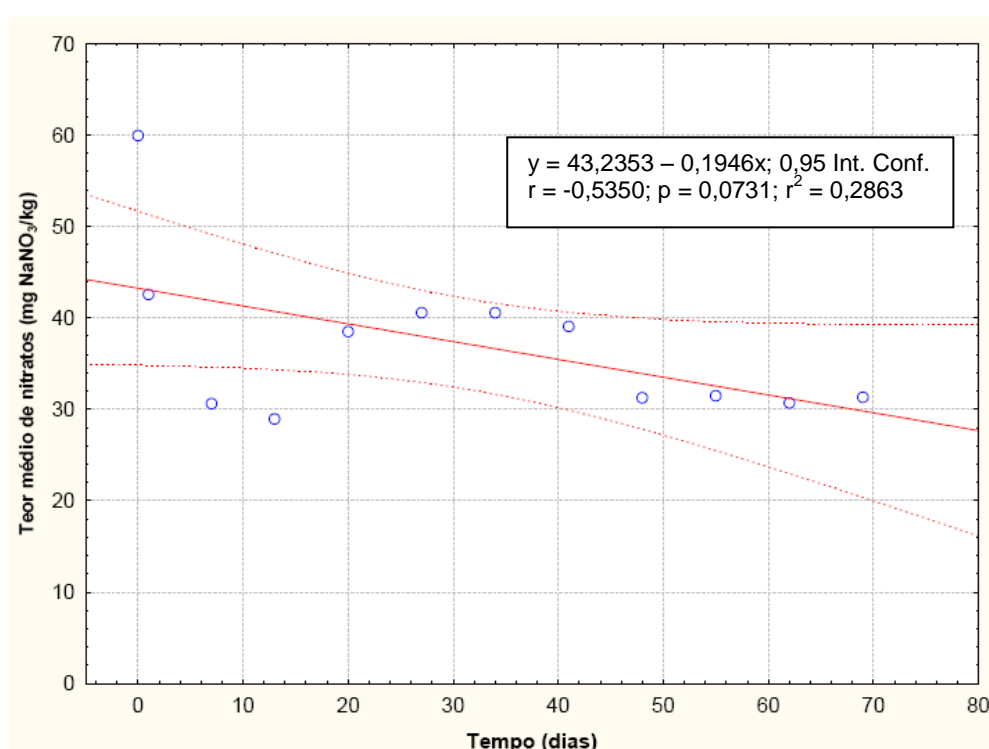


Figura 3.8: Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento do teor médio de nitratos (expresso em mg NaNO_3/kg) ao longo do tempo para o fiambre da perna extra analisado.

Embora o valor de R^2 obtido no gráfico do teor médio de nitratos em função do tempo seja muito inferior a 0,995 (valor decorrente do pequeno número de determinações efectuadas), a função que melhor poderá definir este comportamento é a linear. São necessários mais dados para averiguar se esta função é realmente a que melhor explica a evolução dos resultados.

3.1.2.3 Determinação do teor de nitritos e de nitratos da mortadela do tipo Bolonhesa

Considerando agora as concentrações obtidas para cada uma das amostras dos lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados e recorrendo novamente às expressões (3.1) e (3.2), determinaram-se os seus teores de nitrito e de nitrato logo após a mistura dos vários ingredientes, após a cozedura da mortadela e respectiva tranchagem e embalagem e ao longo do período de tempo experimental. No caso do lote 2 de mortadela não foi possível determinar o teor de nitrito e de nitrato imediatamente após a sua cozedura e respectivo embalagem (correspondente ao tempo $t = 1$) devido a condicionantes de logística da empresa. Também devido a condicionantes de calendário não foi possível efectuar todas as determinações no mesmo dia para os três lotes de mortadela em estudo.

Os resultados obtidos encontram-se enumerados nas tabelas 3.5, 3.6 e 3.7.

Tabela 3.5: Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO_2/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO_3/kg) do lote 1 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Teor de Nitrito (mg NaNO_2/kg)	Teor de Nitrato (mg NaNO_3/kg)	Observações
1	0	120	29	mistura dos vários ingredientes
1	1	66	47	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
2	5	56	40	mortadela embalada ao longo do período experimental
3	12	53	36	
4	19	52	51	
5	26	48	53	
6	33	47	44	
7	40	44	62	
8	47	41	59	
9	54	34	51	
10	61	34	53	

Tabela 3.6: Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO₂/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO₃/kg) do lote 2 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Teor de Nitrito (mg NaNO ₂ /kg)	Teor de Nitrato (mg NaNO ₃ /kg)	Observações
9	0	107	34	mistura dos vários ingredientes
10	4	38	44	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
11	8	34	42	mortadela embalada ao longo do período experimental
12	15	29	19	
13	22	30	46	
14	29	27	49	
15	38	28	63	
16	43	25	57	
17	50	21	51	
18	57	17	54	

Tabela 3.7: Dados referentes ao teor de nitrito (expresso em mg NaNO₂/kg) e de nitrato (expresso em mg NaNO₃/kg) do lote 3 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Teor de Nitrito (mg NaNO ₂ /kg)	Teor de Nitrato (mg NaNO ₃ /kg)	Observações
10	0	94	31	mistura dos vários ingredientes
11	1	34	35	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
12	8	26	22	mortadela embalada ao longo do período experimental
13	15	28	36	
14	22	26	39	
15	31	27	52	
16	36	22	47	
17	43	20	53	
18	50	20	55	

De realçar que embora o prazo de vida útil da mortadela do tipo Bolonhesa em análise seja igual a 45 dias, decidiu-se alargar o período experimental até aos 61 dias no caso do lote 1, até aos 57 dias no caso do lote 2 e até aos 50 dias no caso do lote 3.

Com os resultados das tabelas 3.5, 3.6 e 3.7 construiu-se o gráfico do teor de nitritos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em função do tempo que se apresenta na figura 3.9.

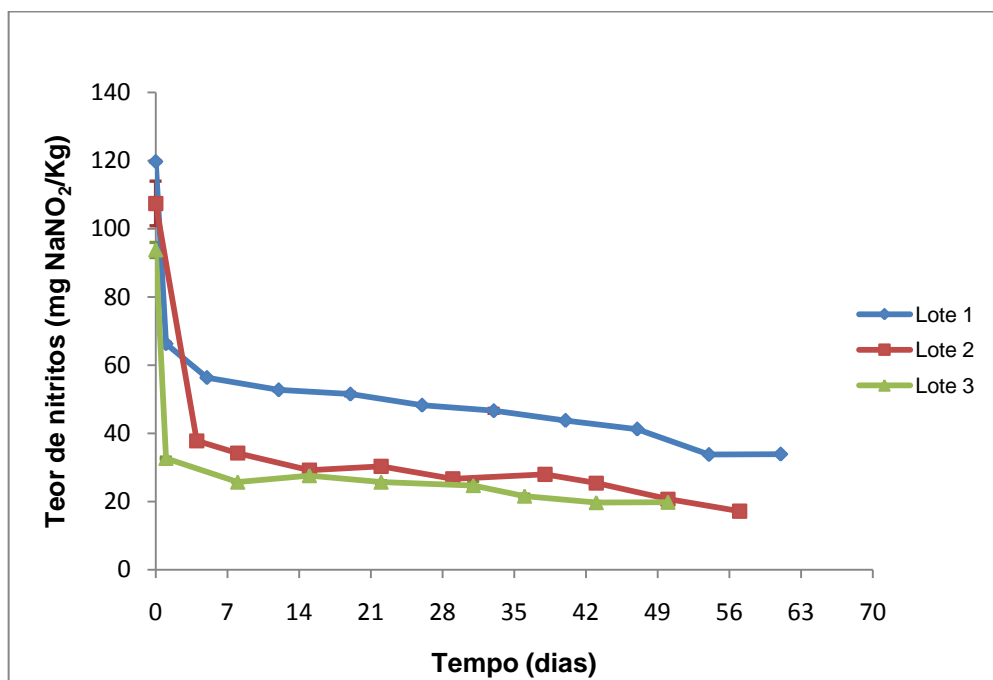


Figura 3.9 Gráfico representativo da evolução do teor de nitritos (expresso em mg NaNO₂/kg) ao longo do tempo para cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados.

Aplicando o teste ANOVA de uma entrada aos valores do teor de nitritos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa que se encontram nas tabelas 3.2, 3.3 e 3.4, verifica-se que o valor de P é superior a 0,05 e que $|F|$ é inferior a $F_{\text{crítico}}$ (ver figura 3.10). Assim sendo, não existem diferenças significativas entre os lotes em estudo, em termos do teor de nitritos. Por observação do gráfico da figura 3.9 verifica-se que o lote 1 apresenta teores de nitrato mais elevados que os restantes lotes, embora não exista significância estatística nessa diferença.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Amostra 1	11	594,12502	54,011366	565,0353		
Amostra 2	9	312,70282	34,744758	770,0318		
Amostra 3	9	297,61632	33,06848	534,0624		
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	2772,36076	2	1386,1804	2,240904	0,12651	3,369016
Dentro de grupos	16083,1066	26	618,58102			
Total	18855,4673	28				

Figura 3.10: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único ao teor de nitritos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo.

Após a análise anterior traçou-se o gráfico do teor médio de nitritos em função do tempo que se apresenta na figura 3.11. No Anexo III é possível consultar com mais detalhe os valores usados na construção deste gráfico.

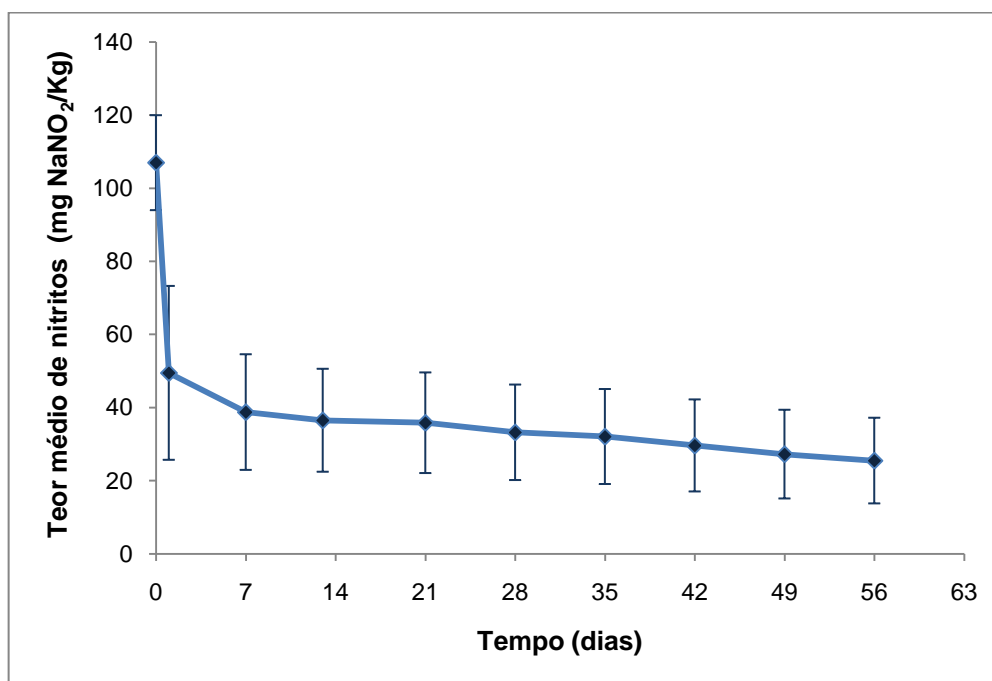


Figura 3.11: Gráfico da evolução do teor médio de nitritos (expresso em mg NaNO₂/kg) ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo.

Ao observar o gráfico da figura 3.11 verifica-se que o teor médio de nitritos presente na mortadela em estudo vai diminuindo ao longo do tempo, como se verificou no caso do fiambre analisado. Tal como anteriormente, pode-se verificar que ocorre uma diminuição proeminente do teor médio de nitritos entre o período de tempo que medeia a análise à mistura dos vários ingredientes e a análise ao produto final após a cozedura e respectiva tranchagem e embalagem. Esta verificação veio confirmar mais uma vez que desde o início do processo de produção, uma determinada quantidade de nitrito oxida-se a nitrato e outra quantidade converte-se no NO envolvido na obtenção do pigmento nitrosilhemocromo. Esta diminuição também poderá estar relacionada com a adição de glucodeltalactona na formulação deste produto: a glucodeltalactona em meio aquoso origina o ácido glucónico, que por sua vez faz diminuir o pH do produto cárneo. Na continuidade da diminuição do pH, ocorre um aumento de acidez do meio, favorecendo a conversão do nitrito a nitrato.

Analogamente ao ocorrido no fiambre analisado, as determinações efectuadas após a mistura dos vários ingredientes que constituem a formulação da mortadela, provaram que o teor médio de nitritos presente é aproximadamente igual a 107 mg de NaNO₂/kg de peso e não os 120 mg de NaNO₂/kg de peso adicionados. Esta observação poderá igualmente ser justificada pelas razões mencionadas anteriormente para o fiambre.

Comparando o teor médio de nitritos do fiambre e da mortadela em estudo, determinados após o processo de massagem da carne no primeiro produto e após a mistura dos vários ingredientes no segundo produto, verifica-se que no caso do fiambre ocorreu uma maior diferença entre o teor

adicionado na formulação e o teor determinado. Esta situação poderá decorrer do facto de o processamento industrial do fiambre ser mais prolongado e daí originar uma maior conversão de nitrito (ver figuras 3.3 e 3.11).

Tal como seria de esperar, as determinações efectuadas durante o período de tempo experimental deste tipo de mortadela mostraram que o teor de nitritos continua a diminuir ao longo do tempo:

- nos primeiros 7 dias essa diminuição é mais acentuada, passando de um valor médio de 49 mg de NaNO_2/kg de peso para um valor médio 39 mg de NaNO_2/kg de peso, valor este que corresponde a cerca de 1/3 do valor determinado após a mistura dos vários ingredientes;
- a partir do 7º dia e até ao final do período de tempo experimental do produto, o teor de nitritos diminui mais gradualmente, passando agora de um valor médio de 39 de mg NaNO_2/kg de peso para um valor médio 25 mg de NaNO_2/kg de peso.

Do ponto de vista da segurança alimentar, verifica-se que mesmo após o 56º dia do período de tempo experimental, o teor médio de nitritos apresentado no gráfico da figura 3.11 é superior a 20 mg de NaNO_2/kg de peso. No entanto, devido à dispersão de resultados (confirmada pelas barras de erro), e de modo a manter a segurança do consumidor, considera-se que até ao 49º dia estará assegurada a protecção deste produto cárneo contra o crescimento de *Clostridium botulinum*.

Comparando os resultados obtidos com a legislação vigente no nosso país, verifica-se que a quantidade de nitrito presente neste produto alimentar após o processo de massagem e imediatamente antes da aplicação do tratamento térmico é inferior a 150 mg de NaNO_2/kg de peso, comprovando que os teores presentes nas amostras analisadas estão de acordo com os limites impostos.

Tendo como suporte o gráfico anterior (ver figura 3.11) definiu-se a função que melhor descreve a evolução do teor médio de nitritos da mortadela do tipo Bolonhesa analisada ao longo do tempo, para um intervalo de confiança de 95%, como se pode observar na figura 3.12.

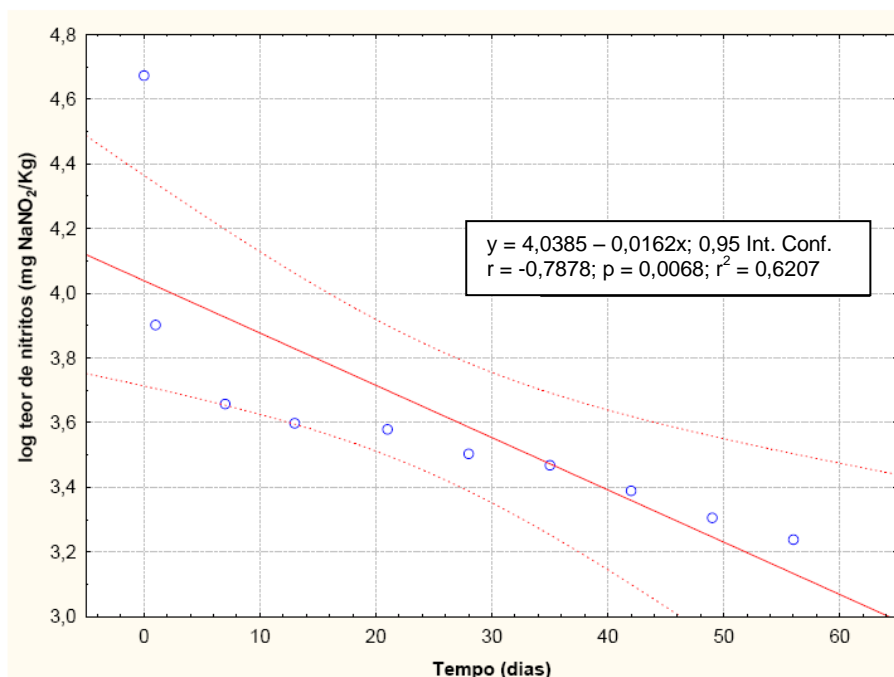


Figura 3.12: Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento do teor médio de nitratos (expresso em mg NaNO₂/kg) ao longo do tempo para a mortadela do tipo Bolonhesa analisada.

Também neste caso o valor de R² obtido no gráfico do logaritmo do teor médio de nitratos em função do tempo é muito inferior a 0,995 (valor decorrente do pequeno número de determinações efectuadas), mas concluiu-se ser a função logarítmica aquela que melhor poderá definir este comportamento. São necessários mais dados para averiguar se esta função é realmente a que melhor explica a evolução dos resultados.

Recorrendo novamente aos valores das tabelas 3.5, 3.6 e 3.7 traçou-se o gráfico do teor de nitratos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em função do tempo (ver figura 3.13).

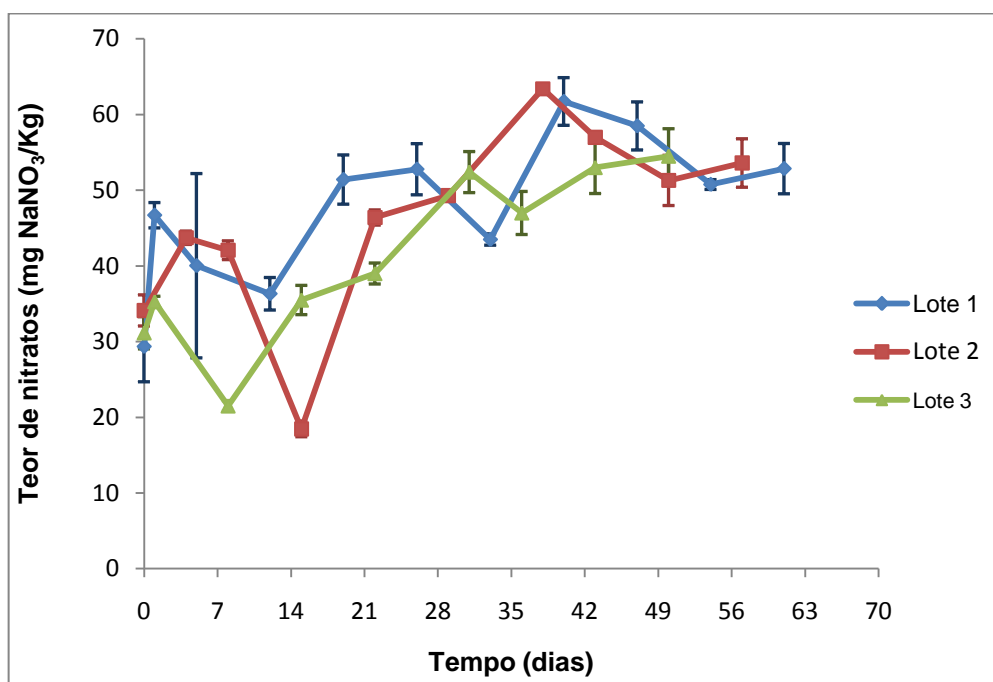


Figura 3.13: Gráfico representativo da evolução do teor de nitratos (expresso em mg NaNO₃/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados.

A aplicação do teste ANOVA de uma entrada aos valores do teor de nitrato dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa apresentados nas tabelas 3.5, 3.6 e 3.7, demonstrou que o valor de P é superior a 0,05 e que $|F|$ é inferior a $F_{\text{crítico}}$ (ver figura 3.14). Assim sendo, não existem diferenças significativas entre os lotes em estudo, em termos do teor de nitratos.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Amostra 1	11	523,93159	47,630144	93,27165		
Amostra 2	9	415,66792	46,185325	179,341		
Amostra 3	9	369,3688	41,040977	129,4215		
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	229,260927	2	114,63046	0,87586	0,428435	3,369016
Dentro de grupos	3402,81625	26	130,87755			
Total	3632,07718	28				

Figura 3.14: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único ao teor de nitratos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo.

A partir dos dados ilustrados na figura 3.13 traçou-se o gráfico da evolução do teor médio de nitratos ao longo do tempo (ver figura 3.15). No Anexo III é possível consultar com mais detalhe os valores usados na construção deste gráfico.

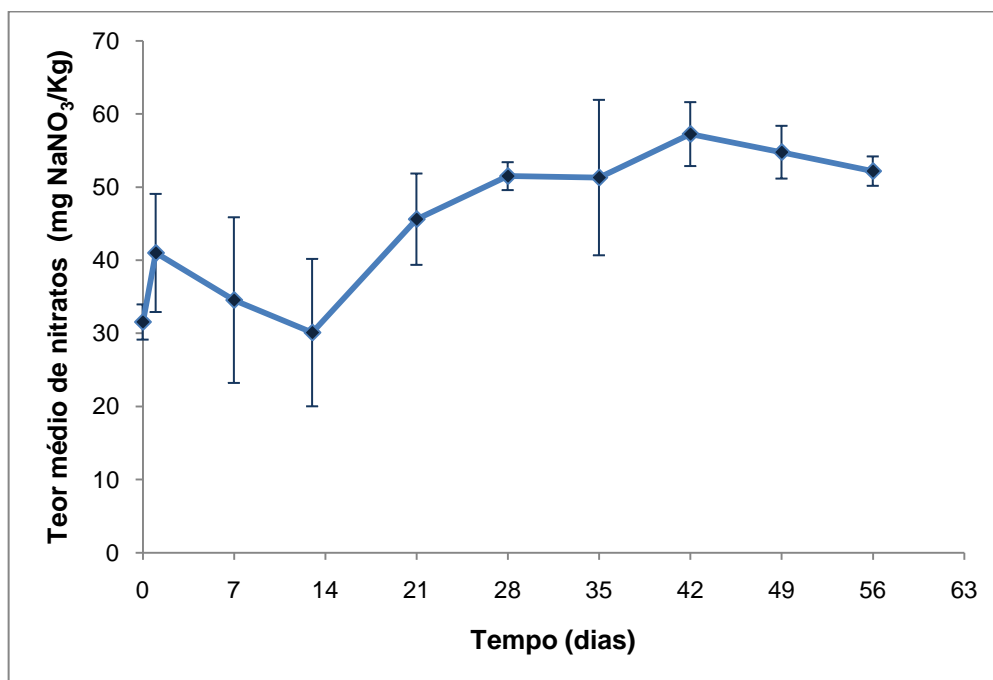


Figura 3.15: Gráfico da evolução do teor médio de nitratos (expresso em mg NaNO₃/kg) ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo.

Tal como acontece no caso do fiambre da perna extra em estudo, a formulação inicial dos lotes de mortadela analisados não incluem a adição de nitratos. As determinações efectuadas após a mistura dos vários ingredientes que constituem a formulação da mortadela demonstraram que este composto está presente, sendo o teor médio de nitratos determinado aproximadamente igual a 32 mg de NaNO₃/kg de peso (ver figura 3.15). À semelhança do que sucede no fiambre, a presença de nitrato deverá ser resultante da reacção de oxidação do nitrito a nitrato, reacção essa que começa a ocorrer desde o início do processo de produção industrial da mortadela do tipo Bolonhesa.

O gráfico ilustrado na figura 3.15 mostra que o teor médio de nitratos presente na mortadela em estudo apresenta um comportamento oscilante ao longo do tempo, embora na globalidade com uma tendência crescente. Durante o período de tempo compreendido entre a análise à mistura dos vários ingredientes e a análise ao produto final após a cozedura e respectiva tranchagem e embalamento, verifica-se que ocorreu um aumento do teor médio de nitratos. Neste caso, e ao contrário do que teoricamente deveria ter ocorrido, o aumento do teor médio de nitratos deverá ser uma consequência da ocorrência de fenómenos de oxidação. O fenómeno de oxidação ocorrido poderá ser explicado pelo modo de processamento deste produto: a mistura dos ingredientes é efectuada num *cutter* munido de lâminas, que ao penetrar na massa tem a capacidade de lhe inserir algum ar (oxigénio).

Já durante o período de tempo experimental compreendido entre o dia 1 e o dia 13, o teor de nitratos começa a diminuir, passando de um valor médio de 41 mg de NaNO₃/kg de peso para um valor médio 30 mg de NaNO₃/kg de peso, justificado pela conversão de nitrato a nitrito. Mas esta diminuição não é significativa por não apresentar variação estatisticamente significativa.

A partir do 13º dia e até ao final do período de tempo experimental da mortadela verifica-se um aumento gradual, sendo esse aumento mais evidente entre o 13º e o 21º dia. Por se tratar de um produto alimentar com alguma perecibilidade, julga-se que a inflexão ocorrida se deva ao desenvolvimento de microrganismos que alteram as condições do meio e assim facilitem a conversão de nitrito a nitrato.

Para se definir neste caso a função que melhor descreve a evolução do teor médio de nitratos da mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do tempo, para um intervalo de confiança de 95%, traçou-se um novo gráfico como se pode observar na figura 3.16.

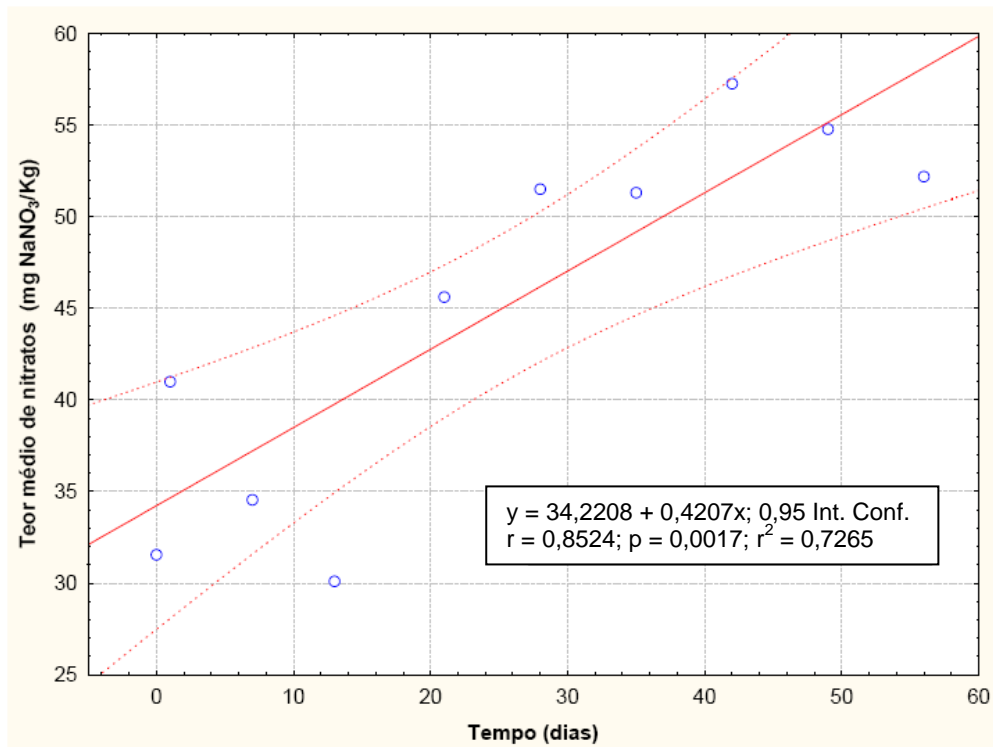


Figura 3.16: Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento o teor médio de nitratos (expresso em mg NaNO₃/kg) ao longo do tempo para a mortadela do tipo Bolonhesa analisada.

Embora mais uma vez o valor de R² obtido no gráfico do teor de nitratos em função do tempo seja muito inferior a 0,995 (valor decorrente do pequeno número de determinações efectuadas), a função que melhor poderá definir este comportamento é a linear. São necessários mais dados para averiguar se esta função é realmente a que melhor explica a evolução dos resultados.

3.2 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais

Para calcular a concentração de nitroso-pigmentos, expresso em mg nitroso hematina/kg de amostra, recorre-se à expressão (3.3) seguinte:

$$\text{concentração de nitroso pigmentos (mg nitroso hematina/kg)} = Abs \times 290 \quad (3.3)$$

em que *Abs* corresponde à absorvância da toma em análise ao λ de 540 nm (Koniecho, 1979).

Já para determinar a concentração de pigmentos totais, expresso em mg pigmento heme total/kg de amostra, recorre-se à expressão (3.4) seguinte:

$$\text{concentração de pigmentos totais (mg pigmento heme total/kg)} = Abs \times 680 \quad (3.4)$$

em que *Abs* corresponde à absorvância da toma em análise ao λ de 640 nm (Koniecho, 1979).

Para se determinar a percentagem entre pigmentos pode-se recorrer à expressão (3.5):

$$\% \text{ entre pigmentos} = \frac{C_{\text{nitroso pigmentos}} \times 100}{C_{\text{pigmentos totais}}} \quad (3.5)$$

em que $C_{\text{nitroso-pigmentos}}$ corresponde à concentração de nitroso-pigmentos obtido a partir da expressão (3.3) e $C_{\text{pigmentos totais}}$ corresponde à concentração de pigmentos totais obtido a partir da expressão (3.4) (Wrolstad *et al*, 2005).

Por sugestão do autor, as concentrações de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais e a respectiva percentagem entre pigmentos determinados devem ser arredondados às unidades (Koniecho, 1979).

3.2.1 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais do fiambre da perna extra

Tendo por base as absorvâncias obtidas para cada uma das amostras dos lotes de fiambre da perna extra analisadas e recorrendo às expressões (3.3), (3.4) e (3.5) determinaram-se as concentrações de nitroso-pigmentos, de pigmentos totais e a respectiva percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais logo após a massagem da carne no bombo, após a cozedura do fiambre e respectiva tranchagem e embalamento e ao longo do período de tempo experimental. Os resultados obtidos encontram-se enumerados agora nas tabelas 3.8, 3.9 e 3.10.

Tabela 3.8: Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg), à concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 1 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Concentração de Nitroso-pigmentos (mg nitroso hematina/kg)	Concentração de Pigmentos totais (mg pigmento heme total/kg)	% nitroso-pigmentos nos pigmentos totais	Observações
1	0	3	23	11	carne após o bombo
1	1	39	147	27	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
2	6	72	104	69	fiambre embalado ao longo do período experimental
3	13	48	101	48	
4	20	60	117	51	
5	27	61	98	62	
6	34	58	87	67	
7	41	68	106	64	
8	48	-	-	-	
9	55	78	97	81	
11	69	70	104	67	

Tabela 3.9: Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expresso em mg nitroso hematina/kg), de pigmentos totais (expresso em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 2 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Concentração de Nitroso-pigmentos (mg nitroso hematina/kg)	Concentração de Pigmentos totais (mg pigmento heme total/kg)	% nitroso-pigmentos nos pigmentos totais	Observações
9	0	5	22	23	carne após o bombo
9	1	42	139	31	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
10	7	47	147	32	fiambre embalado ao longo do período experimental
11	13	73	131	56	
12	20	38	138	28	
13	27	67	119	56	
14	34	53	93	57	
15	41	58	103	56	
16	48	56	156	49	
17	55	54	110	50	
18	62	60	91	66	

Tabela 3.10: Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expresso em mg nitroso hematina/kg), de pigmentos totais (expresso em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 3 de fiambre da perna extra ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Concentração de Nitroso-pigmentos (mg nitroso hematina/kg)	Concentração de Pigmentos totais (mg pigmento heme total/kg)	% nitroso-pigmentos nos pigmentos totais	Observações
9	0	4	26	19	carne após o bombo
9	1	41	133	31	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
10	7	46	165	28	fiambre embalado ao longo do período experimental
11	13	65	133	49	
12	20	28	100	28	
13	27	64	139	46	
14	34	52	60	86	
15	41	73	91	81	
16	48	54	109	49	
17	55	60	138	44	
18	62	58	83	70	

Embora o período de vida útil do fiambre da perna extra em análise seja igual a 45 dias, decidiu-se também neste estudo alargar esse período até aos 69 dias no caso do lote 1 e até aos 62 dias para os lotes 2 e 3.

Com os dados das tabelas 3.8, 3.9 e 3.10 construiu-se o gráfico da concentração de nitroso-pigmentos dos três lotes de fiambre da perna extra em função do tempo (ver figura 3.17).

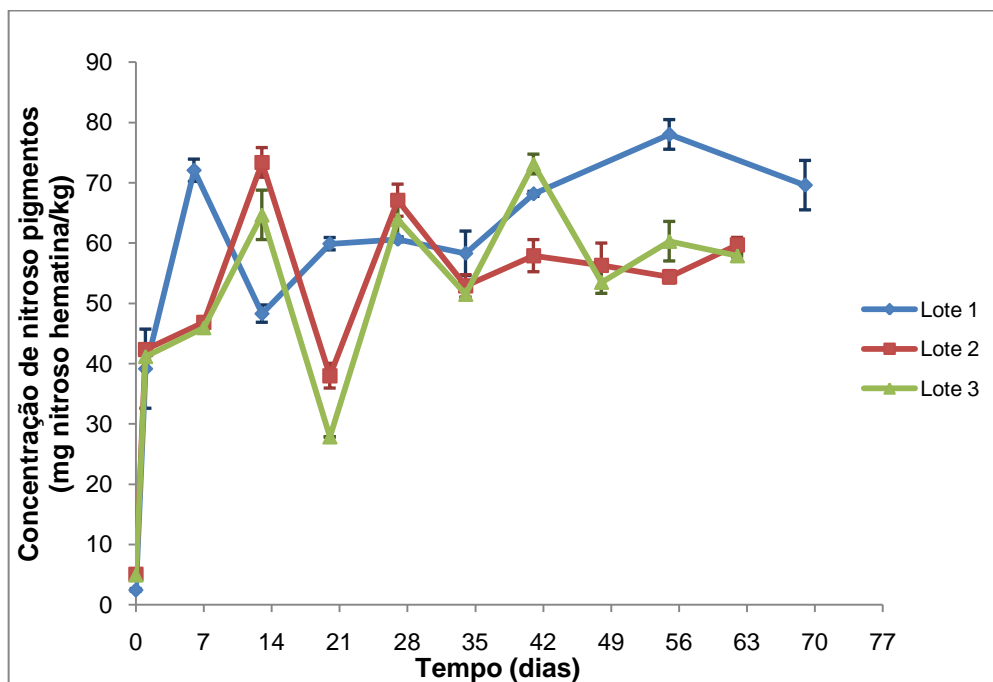


Figura 3.17: Gráfico representativo da evolução da concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados.

Ao se aplicar agora o teste ANOVA de uma entrada aos valores da concentração de nitroso-pigmentos dos três lotes de fiambre da perna extra indicados nas tabelas 3.8, 3.9 e 3.10, verifica-se que o valor de P é superior a 0,05 e que $|F|$ é inferior a $F_{\text{crítico}}$ (ver figura 3.18). Assim sendo, não existem diferenças significativas entre lotes em termos da concentração de nitroso-pigmentos.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Amostra 1	10	556,51	55,651	480,5465		
Amostra 2	11	553,91	50,35545	329,2326		
Amostra 3	11	544,785	49,52591	373,9001		
ANOVA						
Fonte de variaçãc	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	227,963	2	113,9815	0,29107	0,749621	3,327654
Dentro de grupoc	11356,24	29	391,5946			
Total	11584,21	31				

Figura 3.18: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único à concentração de nitroso-pigmentos dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo.

Através dos dados ilustrados no gráfico da figura 3.17 relativo à evolução da concentração de nitroso-pigmentos de cada um dos lotes de fiambre da perna extra analisados, traçou-se o gráfico da concentração média de nitroso-pigmentos em função do tempo, que se apresenta em seguida (ver figura 3.19). No Anexo III é possível consultar com mais detalhe os valores usados na construção deste gráfico.

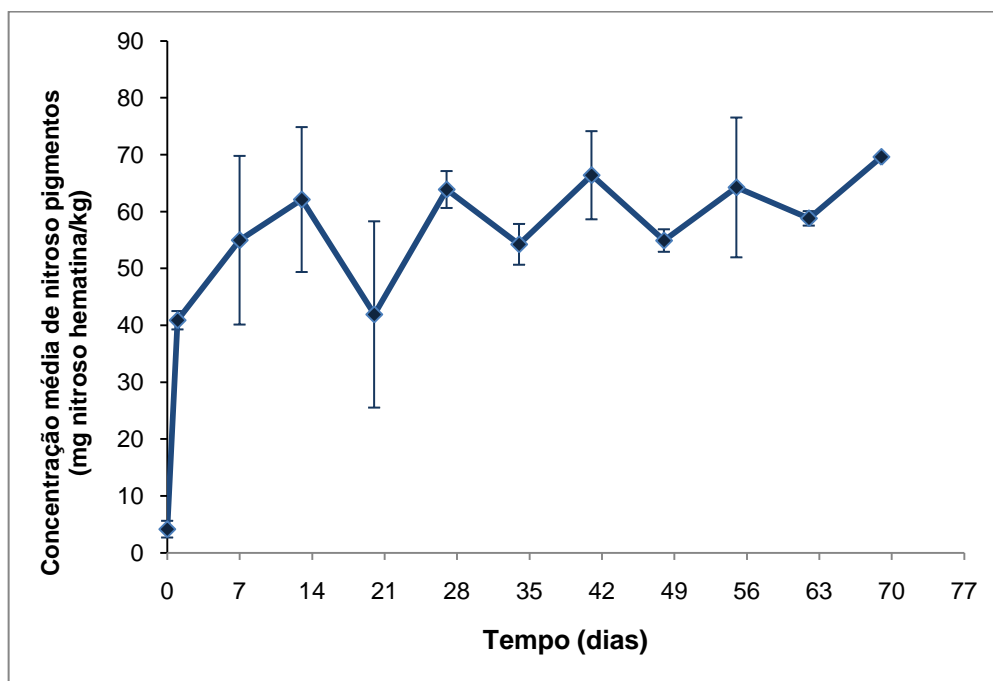


Figura 3.19: Gráfico da evolução da concentração média de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo do fiambre da perna extra em estudo.

Por observação do gráfico anterior (ver figura 3.19) verifica-se que concentração média de nitroso-pigmentos presente no fiambre estudado vai oscilando ao longo do tempo, embora com uma tendência crescente. Pode-se verificar que ocorre um aumento significativo da concentração média de nitroso-pigmentos entre o período de tempo que medeia a análise à carne após o processo de massagem e a análise ao produto final após a cozedura e respectiva tranchagem e embalamento. Neste caso, a concentração média de nitroso-pigmentos passa de 4 mg de nitroso hematina/kg de peso para 41 mg de nitroso hematina/kg de peso. Esta evidência ocorre devido à conversão de nitrito em NO, composto químico envolvido no desenvolvimento de nitroso-pigmentos em produtos cárneos curados.

Após a aplicação de tratamento térmico verifica-se que a concentração média de nitroso-pigmentos aumenta novamente, passando de 41 mg de nitroso hematina/kg de peso para 62 mg de nitroso hematina/kg de peso. Esta verificação veio confirmar que a aplicação de tratamento térmico aos produtos cárneos curados faz aumentar a concentração de nitroso-pigmentos, uma vez que nestas condições o pigmento NO-mioglobina se converte no pigmento nitrosilhemocromo de cor rosada mais estável. Ao comparar os gráficos das figuras 3.3 e 3.19 pode-se verificar que o decréscimo inicial do teor médio de nitritos origina um aumento da concentração média de nitroso-pigmentos ou seja, o

aumento do teor de nitroso-pigmentos deve-se à conversão contínua de uma determinada quantidade de nitrito em NO.

Após o 13º dia do período de tempo experimental, a concentração média de nitroso-pigmentos oscila, provavelmente devido:

- à diferença de pigmentação das diferentes amostras analisadas, uma vez que a carne usada como matéria-prima na produção destes produtos possui diferentes quantidades de mioglobina;
- à instabilidade do nitrosilhemocromo e à reacção do pigmento com a luz e/ou o oxigénio, alterando a concentração média de nitroso-pigmentos.

Também neste estudo se definiu a função que melhor descreve a evolução da concentração média de nitroso-pigmentos do fiambre da perna extra ao longo do tempo, para um intervalo de confiança de 95%, tal como se pode observar no gráfico da figura 3.20.

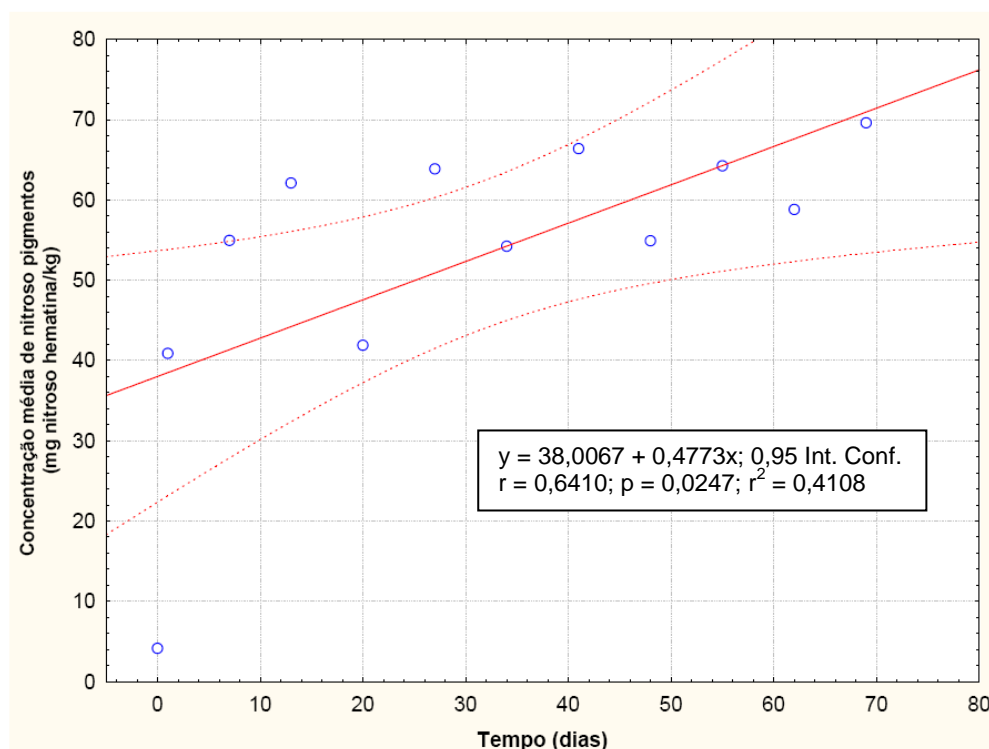


Figura 3.20: Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo para o fiambre da perna extra analisado.

Através da observação da figura 3.20 verifica-se que o valor de R^2 obtido no gráfico da concentração média de nitroso-pigmentos em função do tempo é muito inferior a 0,995 (valor decorrente do pequeno número de determinações efectuadas). No entanto, após os estudos efectuados apurou-se que a função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de nitroso-pigmentos no fiambre da perna extra é a linear. São necessários mais dados para averiguar se esta função é realmente a que melhor explica a evolução dos resultados.

Considerando mais uma vez os dados das tabelas 3.8, 3.9 e 3.10 construiu-se o gráfico da concentração de pigmentos totais dos três lotes de fiambre da perna extra em função do tempo, que se apresenta na figura 3.21.

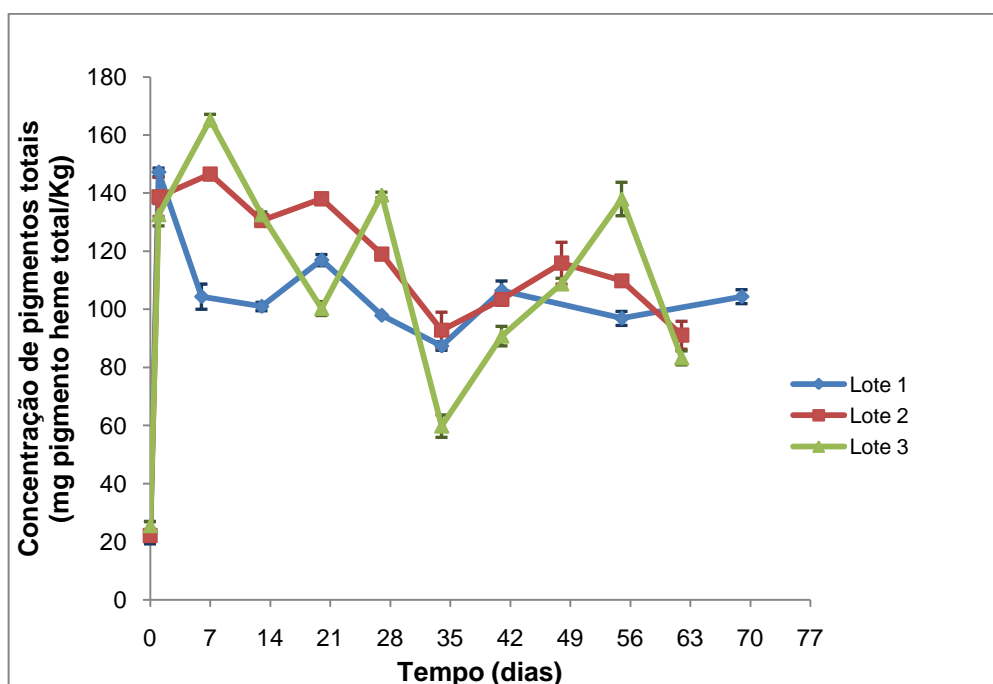


Figura 3.21: Gráfico representativo da evolução da concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados.

A aplicação do teste ANOVA de uma entrada aos valores da concentração de pigmentos totais dos três lotes de fiambre da perna extra indicados nas tabelas 3.8, 3.9 e 3.10, demonstrou que o valor de P é superior a 0,05 e que $|F|$ é inferior a $F_{\text{crítico}}$ (ver figura 3.22), concluindo-se que não existem diferenças significativas entre os lotes em estudo, em termos da concentração de pigmentos totais.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variança		
Amostra 1	10	985,66	98,566	962,343		
Amostra 2	11	1207,96	109,8145	1190,746		
Amostra 3	11	1176,34	106,94	1645,569		
ANOVA						
Fonte de variaçãc	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	707,2414	2	353,6207	0,276981	0,760052	3,327654
Dentro de grupoc	37024,23	29	1276,698			
Total	37731,47	31				

Figura 3.22: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único à concentração de pigmentos totais dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo.

A partir do gráfico da figura 3.21 anterior que descreve a evolução da concentração de pigmentos totais de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra, construiu-se o gráfico da concentração média de pigmentos totais em função do tempo, que se ilustra na figura 3.23. No Anexo III é possível consultar com mais detalhe os valores usados na construção deste gráfico.

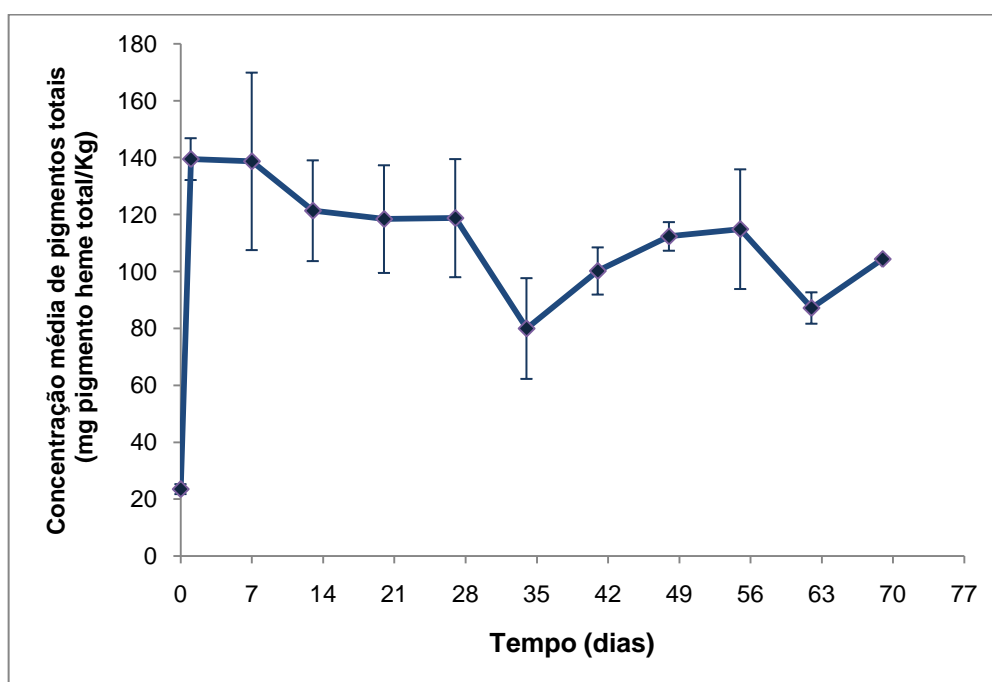


Figura 3.23: Gráfico da evolução da concentração média de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo do fiambre da perna extra analisado.

Por observação do gráfico da figura 3.23 verifica-se que concentração média de pigmentos totais presente no fiambre em estudo vai diminuindo ao longo do tempo. Pode-se verificar que também aqui ocorre um aumento significativo da concentração média de pigmentos totais durante o período de tempo compreendido entre a análise à carne após o processo de massagem e a análise ao produto final após a cozedura e respectiva tranchagem e embalamento. Neste caso, a concentração média de pigmentos totais passa de 24 mg de pigmento heme total/kg de peso para 140 mg de pigmento heme total/kg de peso.

Ao longo do período de vida útil do produto em questão verifica-se que a concentração média de pigmentos totais:

- diminui desde o 1º dia até ao 34º dia, passando de 140 mg de pigmento heme total/kg de peso para 62-98 mg de pigmento heme total/kg de peso;
- aumenta desde o 34º dia até ao 55º dia, passando de 62-98 mg de pigmento heme total/kg de peso para 94-136 mg de pigmento heme total/kg de peso e
- diminui novamente nos sete dias seguintes para cerca de 90 mg de pigmento heme total/kg de peso.

As inflexões ocorridas poder-se-ão dever a fenómenos de oxidação que levam à diminuição da concentração de pigmentos totais.

Também neste estudo se definiu a função que melhor descreve a evolução da concentração média de pigmentos totais do fiambre da perna extra ao longo do tempo, para um intervalo de confiança de 95%, tal como se pode observar no gráfico da figura 3.24.

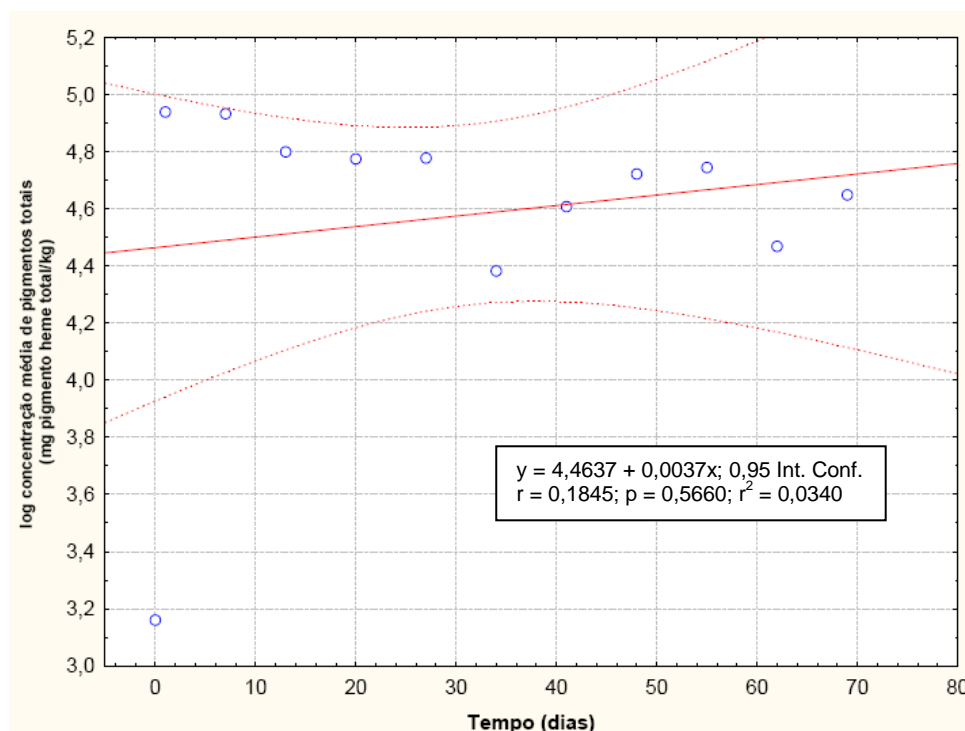


Figura 3.24: Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de pigmentos totais (expressa em mg de pigmento heme total/kg) ao longo do tempo para o fiambre da perna extra analisado.

Embora também aqui o valor de R^2 obtido no gráfico da concentração média de pigmentos totais em função do tempo seja muito inferior a 0,995 (decorrente do pequeno número de determinações efectuadas), após os estudos efectuados apurou-se que a função que melhor poderá descrever o comportamento da concentração média de pigmentos totais no fiambre da perna extra é a logarítmica. São necessários mais dados para averiguar se esta função é realmente a que melhor explica a evolução dos resultados.

Com o intuito de verificar a evolução da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais, recorreu-se aos valores expostos nas tabelas 3.8, 3.9 e 3.10 e traçou-se o gráfico da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais dos três lotes de fiambre da perna extra em função do tempo, que se apresenta na figura 3.25.

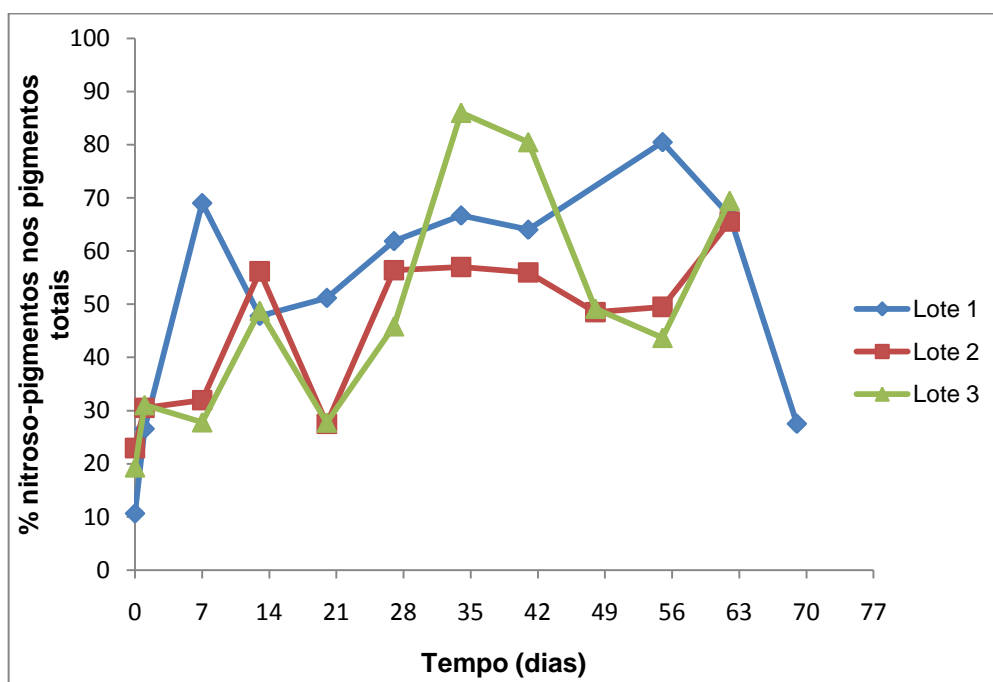


Figura 3.25: Gráfico representativo da evolução da porcentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo de cada um dos três lotes de fiambre da perna extra analisados.

A aplicação do teste ANOVA de uma entrada aos valores da porcentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais dos três lotes de fiambre da perna extra indicados nas tabelas 3.8, 3.9 e 3.10, demonstrou que o valor de P é superior a 0,05 e que $|F|$ é inferior a $F_{\text{crítico}}$ (ver figura 3.26), concluindo-se que não existem variações significativas entre os lotes em estudo em termos da porcentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variancia		
Amostra 1	11	572,6749	52,06135	474,8862		
Amostra 2	11	502,1727	45,65206	214,2231		
Amostra 3	11	529,4573	48,13249	491,3117		
ANOVA						
Fonte de variaçãc	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	229,7807	2	114,8903	0,29199	0,748874	3,31583
Dentro de grupc	11804,21	30	393,4737			
Total	12033,99	32				

Figura 3.26: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único à porcentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais dos três lotes de fiambre da perna extra em estudo.

Considerando o gráfico da figura 3.25 que descreve a evolução da porcentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais de cada um dos lotes de fiambre, construiu-se o gráfico da porcentagem média

de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais em função do tempo que se apresenta em seguida (ver figura 3.27).

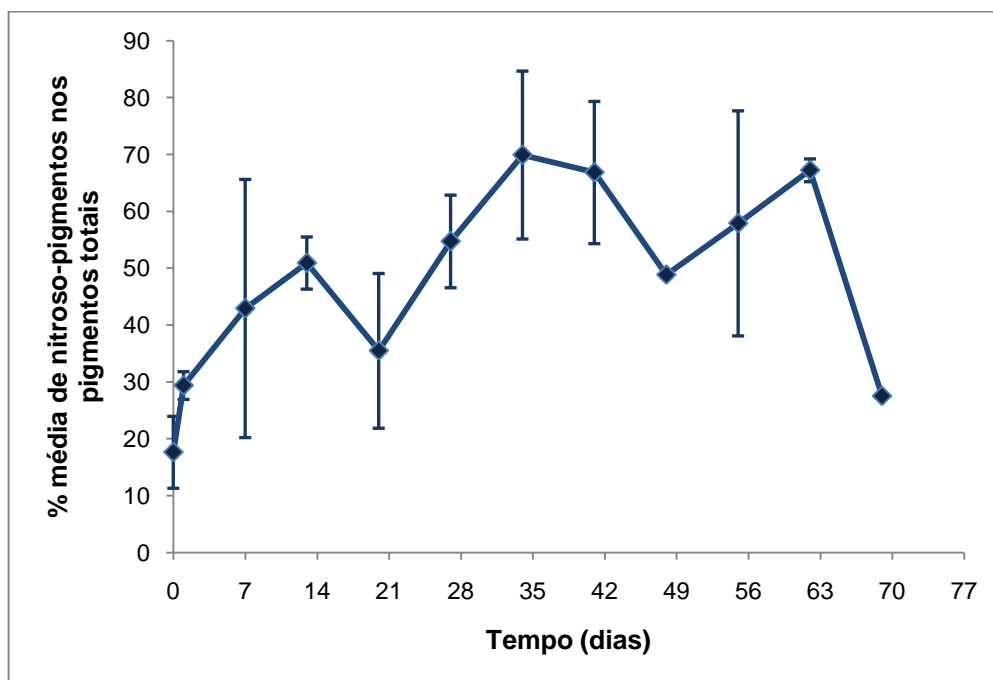


Figura 3.27: Gráfico da evolução da percentagem média de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo do fiambre da perna extra em análise.

Ao se observar o gráfico da figura 3.27 verifica-se que a percentagem média de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais apresenta uma tendência crescente ao longo do tempo em resultado dos dados anteriormente descritos.

3.2.2 Determinação da concentração de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais da mortadela do tipo Bolonhesa

Considerando agora as absorvâncias obtidas para cada uma das amostras dos lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisadas e recorrendo mais uma vez às expressões (3.3), (3.4) e (3.5), determinaram-se as concentrações de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais e a respectiva relação entre pigmentos das amostras logo após a mistura dos vários ingredientes, imediatamente após a cozedura e respectiva tranchagem e embalagem e ao longo do seu período de vida útil. No caso do lote 2 de mortadela não foi possível determinar os teores aqui analisados após a sua cozedura da mortadela e respectiva tranchagem e embalagem (correspondente ao tempo $t = 1$) devido a condicionantes de logística da empresa. Também devido a condicionantes de calendário não foi possível efectuar todas as determinações no mesmo dia para os três lotes de mortadela em estudo.

Os resultados obtidos encontram-se desta vez expostos nas tabelas 3.11, 3.12 e 3.13.

Tabela 3.11: Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expresso em mg nitroso hematina/kg), à concentração de pigmentos totais (expresso em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 1 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Concentração de Nitroso-pigmentos (mg nitroso hematina/kg)	Concentração de Pigmentos totais (mg pigmento heme total/kg)	% nitroso-pigmentos nos pigmentos totais	Observações
1	0	109	453	24	mistura dos vários ingredientes
1	1	74	355	21	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
2	5	92	141	65	mortadela embalada ao longo do período experimental
3	12	94	131	72	
4	19	90	120	74	
5	26	100	81	123	
6	33	94	110	85	
7	40	117	198	59	
8	47	104	180	58	
9	54	94	122	77	
10	61	85	112	77	
11	68	82	110	75	

Tabela 3.12: Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expresso em mg nitroso hematina/kg), de pigmentos totais (expresso em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 2 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental.

Semana	Tempo (dias)	Concentração de Nitroso-pigmentos (mg nitroso hematina/kg)	Concentração de Pigmentos totais (mg pigmento heme total/kg)	% nitroso-pigmentos nos pigmentos totais	Observações
9	0	74	111	67	mistura dos vários ingredientes
10	4	87	145	60	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
11	8	86	143	60	mortadela embalada ao longo do período experimental
12	15	93	136	68	
13	22	91	124	73	
14	29	68	120	57	
15	38	80	104	77	
16	43	84	85	99	
17	50	62	78	80	
18	57	64	73	88	

Tabela 3.13: Dados referentes à concentração de nitroso-pigmentos (expresso em mg nitroso hematina/kg), de pigmentos totais (expresso em mg pigmento heme total/kg) e à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais do lote 3 de mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do período experimental.

Semana	Dia	Concentração de Nitroso-pigmentos (mg nitroso hematina/kg)	Concentração de Pigmentos totais (mg pigmento heme total/kg)	% nitroso-pigmentos nos pigmentos totais	Observações
10	0	47	355	13	mistura dos vários ingredientes
11	1	92	215	43	aplicação de tratamento térmico e consequente tranchagem e embalagem
12	8	108	165	65	mortadela embalada ao longo do período experimental
13	15	102	122	83	
14	22	79	136	58	
15	31	84	103	81	
16	36	82	96	85	
17	43	70	96	73	
18	50	78	97	80	

Também nestas determinações, embora o período de vida útil da mortadela do tipo Bolonhesa seja igual a 45 dias, decidiu-se alargar esse período até aos 61 dias no caso do lote 1, até aos 57 dias no caso do lote 2 e até aos 50 dias no caso do lote 3.

Os dados das tabelas 3.11, 3.12 e 3.13 serviram para se traçar o gráfico da concentração de nitroso-pigmentos de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em função do tempo (ver figura 3.28).

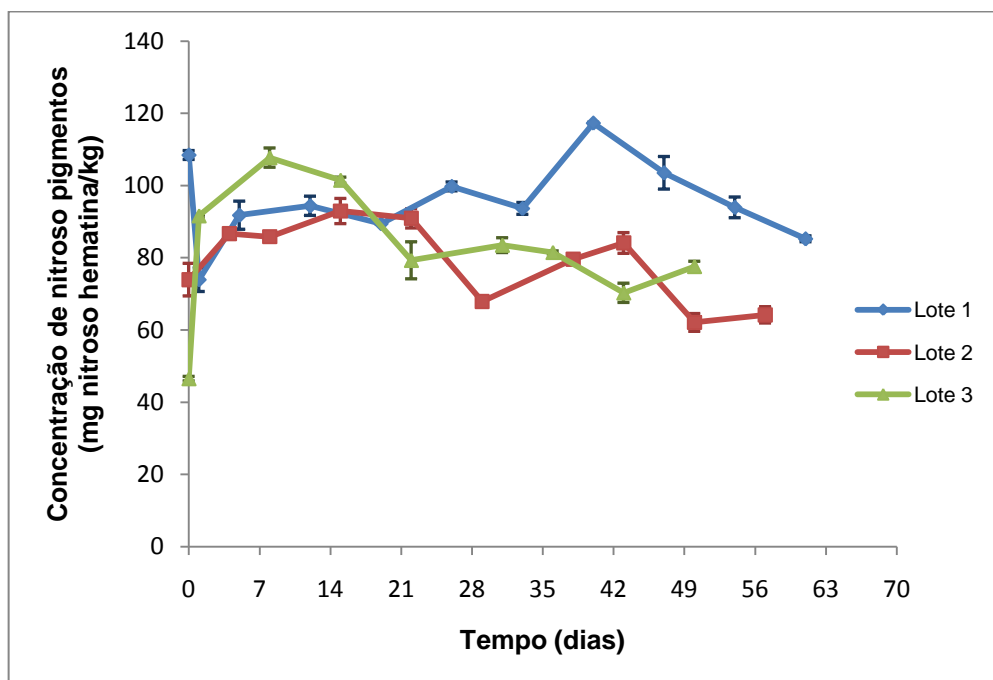


Figura 3.28: Gráfico representativo da evolução da concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados.

Ao se aplicar o teste ANOVA de uma entrada aos valores da concentração de nitroso-pigmentos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa das tabelas 3.11, 3.12 e 3.13, verifica-se que o valor de P é menor que 0,05 e que $|F|$ é superior a $F_{\text{crítico}}$ (ver figura 3.29). Como efeito, existem diferenças significativas entre as variâncias da concentração de nitroso-pigmentos de cada um dos lotes em estudo, e conseqüentemente mais erros associados aos valores determinados. Apesar desta ocorrência, continua-se a analisar este parâmetro para a mortadela.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Amostra 1	11	1051,54	95,594545	135,23739		
Amostra 2	9	701,55	77,95	131,62823		
Amostra 3	9	739,62	82,18	319,78441		
ANOVA						
Fonte de varia	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre gruç	1727,105045	2	863,55252	4,5233352	0,020618	3,369016
Dentro de	4963,674973	26	190,91058			
Total	6690,780017	28				

Figura 3.29: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único à concentração de nitroso-pigmentos dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo.

A partir do gráfico da figura 3.28, que descreve a evolução da concentração de nitroso-pigmentos de cada um dos lotes de mortadela analisados, traçou-se o gráfico da concentração média de nitroso-pigmentos em função do tempo, que se apresenta na figura 3.30 seguinte. No Anexo III é possível consultar com mais detalhe os valores usados na construção deste gráfico.

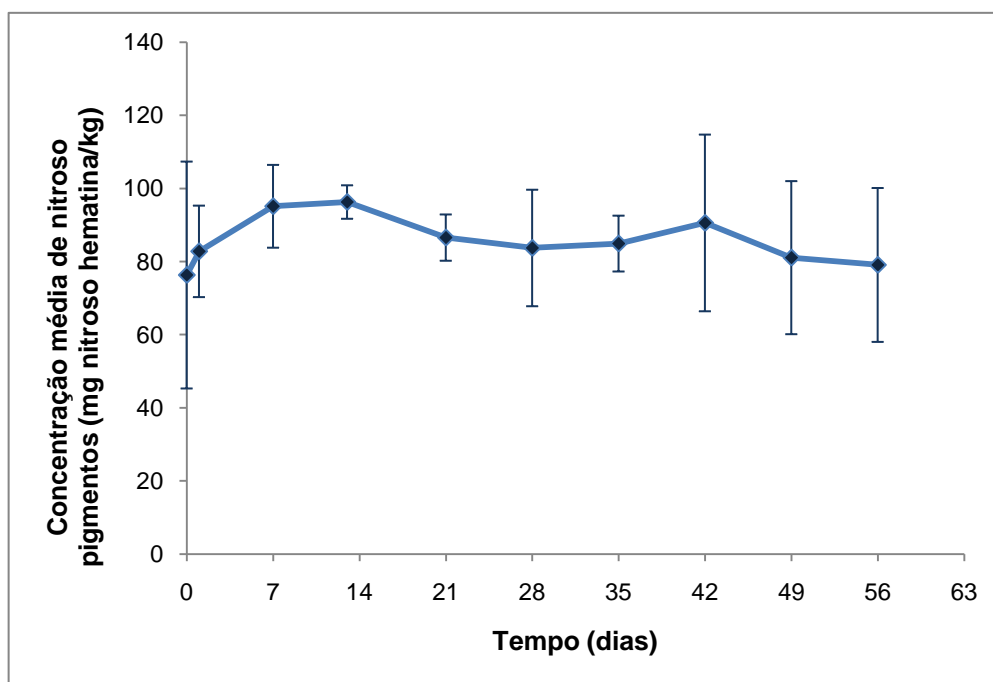


Figura 3.30: Gráfico da evolução da concentração média de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo.

Neste caso (ver figura 3.30), e ao contrário do que acontece no fiambre, verifica-se que a concentração média de nitroso-pigmentos obtida após o processo de mistura dos vários ingredientes que constituem a massa é elevada. Esta situação poderá estar associada a um efeito colorimétrico, já que este tipo de mortadela possui na sua composição o corante carmin cochonilha que confere cor ao produto.

Observando novamente a figura 3.30 e considerando o período de tempo experimental deste produto, os teores são mais ou menos constantes, verificando-se uma tendência inicial de subida (não significativa) da concentração de nitroso-pigmentos. A partir do 13º dia constata-se uma tendência de descida (não significativa). Neste caso, a presença de corante deverá estar a mascarar a situação: embora teoricamente a concentração média de nitroso-pigmentos esteja a aumentar, a concentração média de corante deverá estar a diminuir, mas de uma forma mais acentuada. Como resultado, o efeito cumulativo leva a que se verifique uma redução ligeira da concentração média de nitroso-pigmentos na mortadela em investigação.

Para se definir a função que melhor descreve a evolução da concentração média de nitroso-pigmentos da mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do tempo, para um intervalo de confiança de 95%, que se apresenta na figura 3.31.

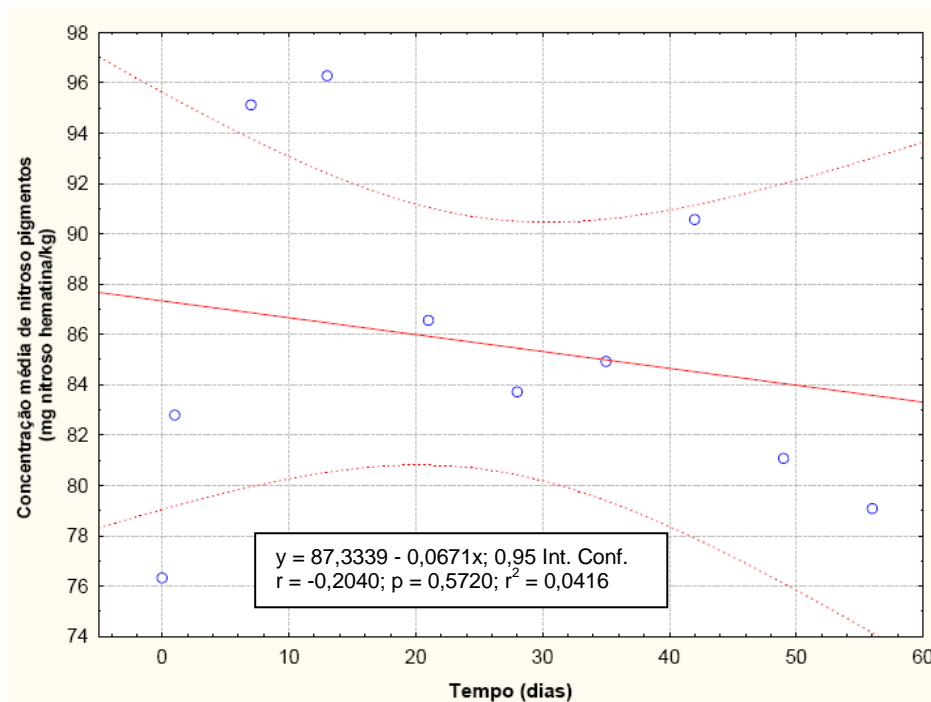


Figura 3.31: Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de nitroso-pigmentos (expressa em mg de nitroso hematina /kg) ao longo do tempo para a mortadela do tipo Bolonhesa analisada.

Embora também aqui o valor de R^2 obtido no gráfico da concentração média de nitroso-pigmentos em função do tempo esteja muito longe do valor de 0,995 (valor resultante do pequeno número de determinações efectuadas), a função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de nitroso-pigmentos na mortadela do tipo Bolonhesa é a linear. São necessários mais dados para averiguar se esta função é realmente a que melhor explica a evolução dos resultados.

Para a construção do gráfico representativo do teor de pigmentos totais da mortadela do tipo Bolonhesa em função do tempo (ver figura 3.32 seguinte) recorreu-se aos dados das tabelas 3.11, 3.12 e 3.13 anteriores.

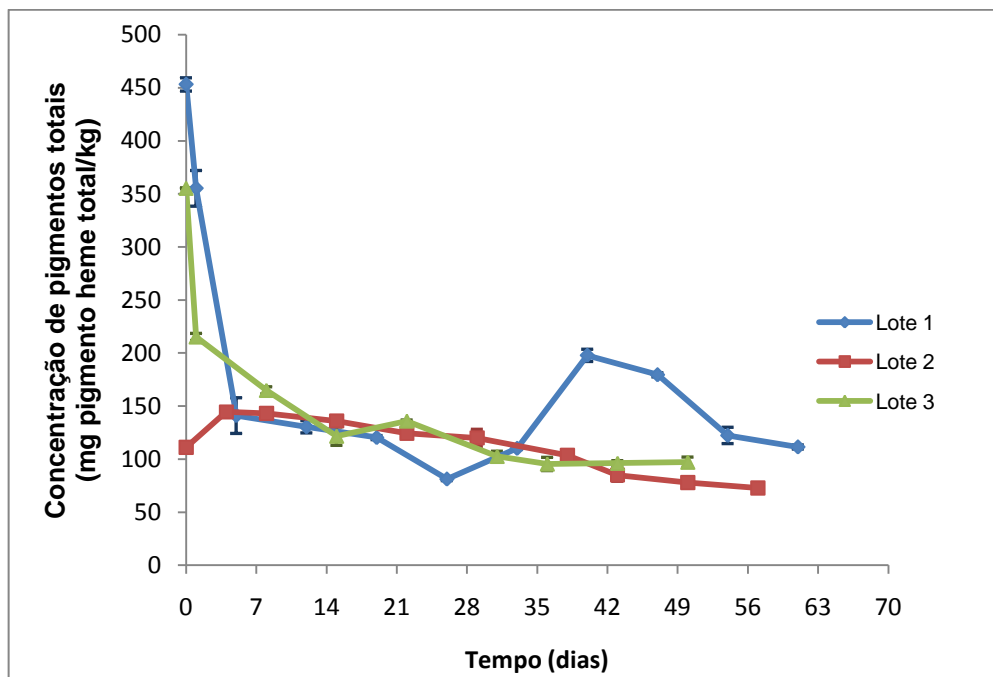


Figura 3.32: Gráfico representativo da evolução da concentração de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados.

Ao se aplicar o teste ANOVA de uma entrada aos valores da média da concentração de pigmentos totais dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa enumerados nas tabelas 3.11, 3.12 e 3.13, verifica-se que o valor de P é superior a 0,05 e $|F|$ é inferior a $F_{\text{crítico}}$ (ver figura 3.33). Desta forma, concluiu-se que não existem diferenças significativas entre os lotes em estudo, em termos da concentração de pigmentos totais.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Amostra 1	11	2003,28	182,11636	13579,89		
Amostra 2	9	974,16	108,24	641,9034		
Amostra 3	9	1384,74	153,86	7296,904		
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	27170,1281	2	13585,064	1,772178	0,189882	3,369016
Dentro de grupos	199309,309	26	7665,7426			
Total	226479,437	28				

Figura 3.33: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único à concentração de pigmentos totais dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo.

Após a análise anterior traçou-se o gráfico da concentração média de pigmentos totais em função do tempo (ver figura 3.34), considerando para tal os dados do gráfico da figura 3.32 precedente. No Anexo III é possível consultar com mais detalhe os valores usados na construção deste gráfico.

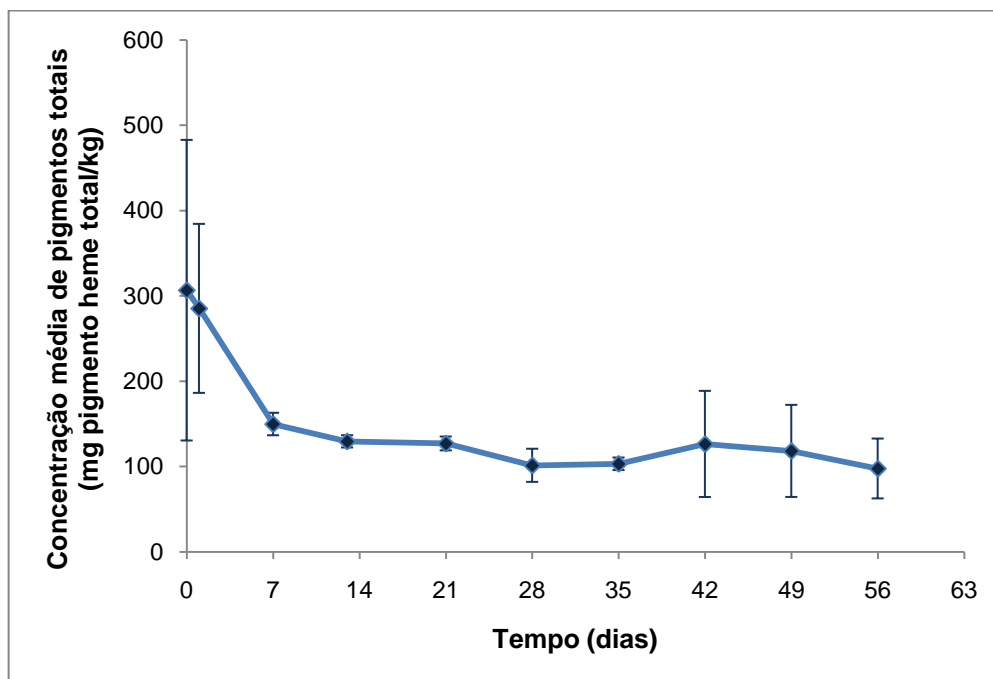


Figura 3.34: Gráfico da evolução da concentração média de pigmentos totais (expressa em mg pigmento heme total/kg) ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa analisada.

No gráfico da figura 3.34, e ao contrário do que acontece no fiambre, verifica-se que a concentração média de pigmentos totais obtida após o processo de mistura dos vários ingredientes que constituem a massa é elevada. Esta verificação deverá, mais uma vez, estar associada a um efeito colorimétrico resultante da presença do corante carmim cochonilha que mascara as determinações de pigmentos obtidas para este produto.

Observando novamente a figura 3.34, mas considerando agora o período de tempo experimental deste produto, apura-se que a tendência da concentração de pigmentos totais é de descida.

Por último, definiu-se a função que melhor descreve a evolução da concentração média de pigmentos totais da mortadela do tipo Bolonhesa ao longo do tempo, para um intervalo de confiança de 95%, tal como se pode observar no gráfico da figura 3.35.

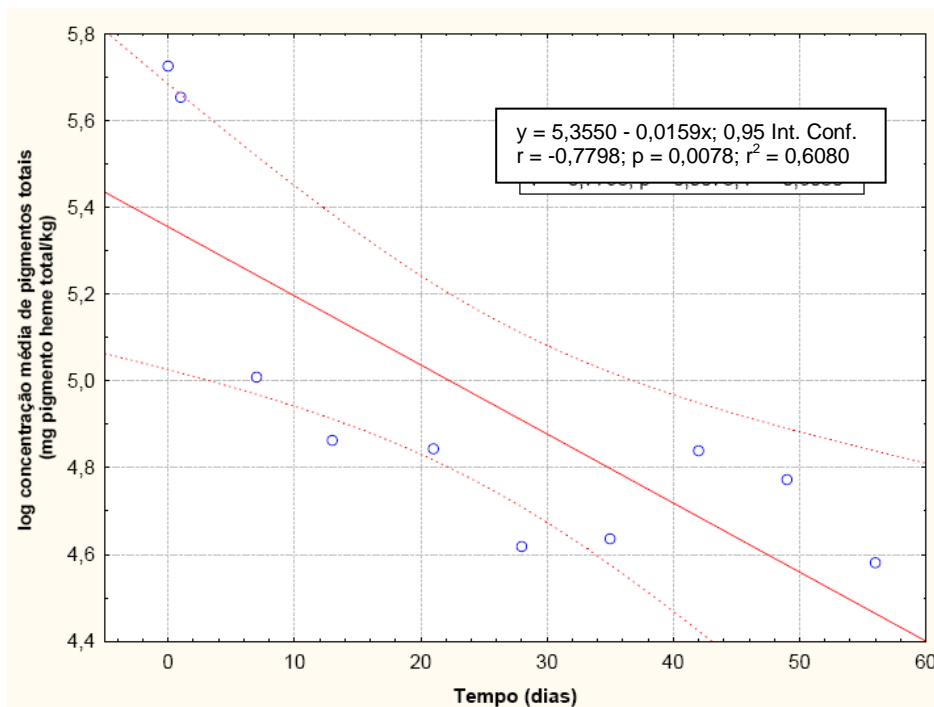


Figura 3.35: Gráfico da função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de pigmentos totais (expressa em mg de pigmento heme total/kg) ao longo do tempo para a mortadela do tipo Bolonhesa analisada.

Mais uma vez o valor de R^2 obtido no gráfico da concentração média de pigmentos totais em função do tempo é inferior a 0,995 (valor resultante do pequeno número de determinações efectuadas), a função que melhor poderá definir o comportamento da concentração média de nitroso-pigmentos na mortadela do tipo Bolonhesa é a logarítmica. São necessários mais dados para averiguar se esta função é realmente a que melhor explica a evolução dos resultados.

Com o propósito de verificar a evolução da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais, recorreu-se agora aos valores expostos nas tabelas 3.11, 3.12 e 3.13 e traçou-se o gráfico da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais da mortadela do tipo Bolonhesa em função do tempo, que se apresenta na figura 3.36.

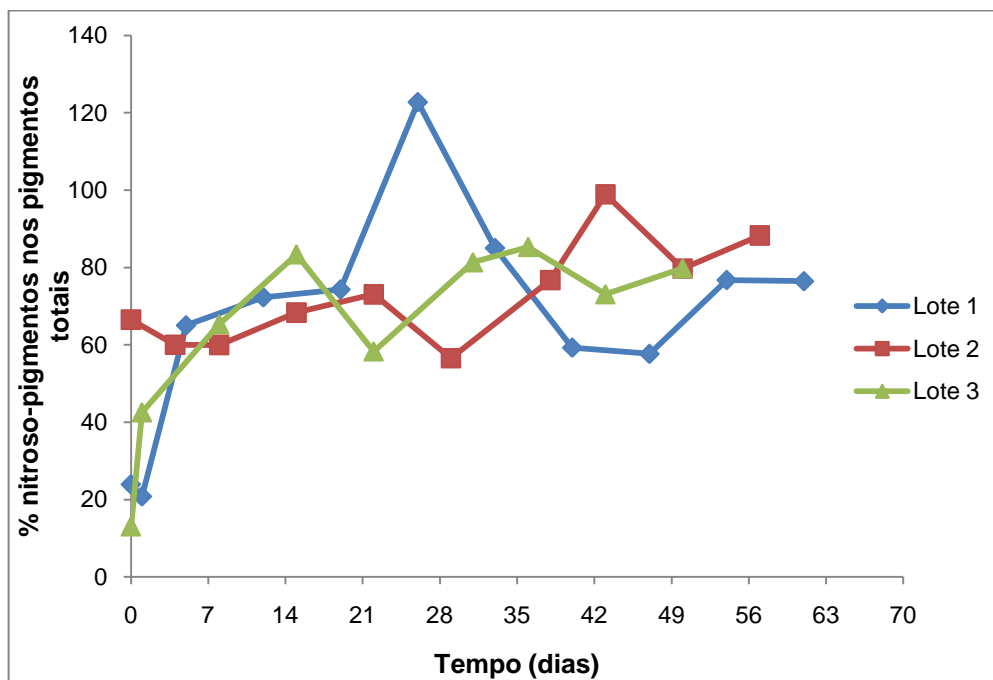


Figura 3.36: Gráfico representativo da evolução da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo de cada um dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa analisados.

A aplicação do teste ANOVA de uma entrada aos valores da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa indicados nas tabelas 3.11, 3.12 e 3.13, demonstrou que o valor de P é superior a 0,05 e que $|F|$ é inferior a $F_{\text{crítico}}$ (ver figura 3.37), concluindo-se que não existem diferenças significativas entre os lotes em estudo, em termos da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais.

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variança		
Amostra 1	11	734,3912	66,76284	783,9499		
Amostra 2	9	668,1213	74,2357	182,0536		
Amostra 3	9	582,2201	64,69113	567,6094		
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	459,7388	2	229,8694	0,431935	0,653826	3,36901636
Dentro de grupos	13836,8	26	532,1847			
Total	14296,54	28				

Figura 3.37: Resultados obtidos da aplicação do teste ANOVA – factor único à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais dos três lotes de mortadela do tipo Bolonhesa em estudo.

Considerando o gráfico da figura 3.36 construiu-se o gráfico da percentagem média de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais em função do tempo que se apresenta em seguida (ver figura 3.38).

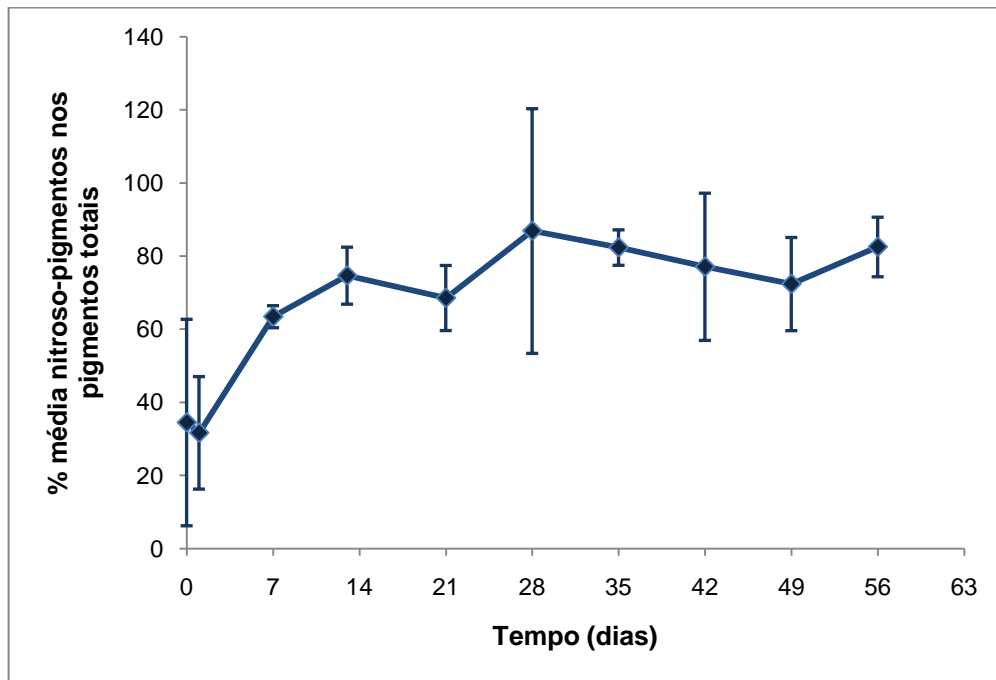


Figura 3.38: Gráfico da evolução da percentagem média de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em análise.

Ao se observar o gráfico da figura 3.38 verifica-se que a percentagem média de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais apresenta uma tendência crescente ao longo do tempo em resultado dos dados anteriormente descritos.

4. CONCLUSÃO

No decorrer deste trabalho experimental estudou-se a evolução do teor médio de nitritos e de nitratos do fiambre da perna extra e da mortadela do tipo Bolonhesa.

Relativamente ao fiambre da perna extra verificou-se que o seu teor médio de nitritos vai diminuindo ao longo do tempo, sendo a função logarítmica aquela que melhor poderá definir este comportamento. No entanto, a presença de flora redutora nas amostras analisadas pode levar a um ligeiro aumento do teor médio de nitritos, tal como se verificou entre o 13^o e o 27^o dias de período de tempo experimental deste produto cárneo curado. Verificou-se também que o teor médio de nitritos diminui de uma forma mais acentuada entre o 48^o e o 55^o dias de período de tempo experimental, possivelmente devido ao desenvolvimento de bactérias lácticas, encurtando desta forma o prazo de vida útil destes produtos. Neste caso e segundo o observado, a maioria do teor médio de nitrito presente deu origem a nitroso-pigmentos de cor rosada.

Segundo a literatura, um produto cárneo curado está “protegido” contra o crescimento de *Clostridium botulinum* na presença de um teor mínimo de 20 mg de NaNO₂/kg de produto. Deste modo, considerando os resultados obtidos, verificou-se que até ao 48^o dia de período de tempo experimental, o fiambre da perna extra em estudo apresenta segurança alimentar (em termos dos teores em ião nitrito). Posto isto, e após posterior realização de análises microbiológicas que confirmem os resultados obtidos, e de análises que assegurem a manutenção dos padrões de qualidade – organolépticos, entre outros, poder-se-á aumentar o prazo de vida útil deste produto de 45 para 48 dias.

Considerando agora o teor médio de nitratos analisado no fiambre da perna extra, verificou-se que esse teor apresenta uma tendência oscilante ao longo do tempo, sendo a função linear aquela que melhor poderá definir este comportamento. Embora a formulação inicial deste produto cárneo curado não contemple a adição de nitratos, as determinações efectuadas após o processo de massagem demonstraram que este composto está presente no produto em questão, como resultado da oxidação do nitrito a nitrato. As diminuições mais acentuadas da evolução poder-se-ão dever à presença e/ou ao desenvolvimento de flora microbiana que origina reacções de redução do nitrato a nitrito.

No caso da mortadela do tipo Bolonhesa verificou-se que o teor médio de nitritos vai diminuindo, enquanto o teor médio de nitratos apresenta uma tendência crescente ao longo do tempo, sendo a função logarítmica aquela que melhor poderá definir o comportamento do primeiro parâmetro e a função linear aquela que melhor poderá definir o comportamento do segundo parâmetro. A redução do teor médio de nitritos ficou a dever-se ao facto desta substância interagir continuamente com outros compostos presentes no produto cárneo curado em estudo. Neste caso, a maioria do teor médio de nitrito presente oxidou-se a nitrato, devido à presença de glucodeltalactona na formulação do produto.

Embora a formulação inicial da mortadela do tipo Bolonhesa também não contemple a adição de nitratos, as determinações efectuadas após o processo de massagem demonstraram que este

composto está igualmente presente neste produto. Também neste caso, a presença de nitrato resultou da oxidação do nitrito a nitrato. A partir do 13º dia de período de tempo experimental a alteração das condições do meio facilitaram a conversão do nitrito a nitrato, e o conseqüente aumento do teor médio deste último.

Tal como no caso do fiambre, verificou-se que até ao 49º dia de período de tempo experimental, a mortadela do tipo Bolonhesa em estudo apresenta segurança alimentar (em termos dos teores em ião nitrito). Posto isto, e após posterior realização de análises microbiológicas que confirmem os resultados obtidos, e de análises que assegurem manutenção dos padrões de qualidade – organolépticos, entre outros, poder-se-á aumentar o prazo de vida útil deste produto de 45 para 49 dias.

De acordo com os resultados obtidos, comprovou-se também que a quantidade de nitrito presente nas amostras analisadas se encontra de acordo com os limites estabelecidos pela legislação nacional.

No âmbito deste trabalho estudou-se também a evolução da concentração média de nitroso-pigmentos e de pigmentos totais do fiambre da perna extra e da mortadela do tipo Bolonhesa.

Relativamente ao fiambre da perna extra verificou-se que a concentração média de nitroso-pigmentos apresenta uma tendência crescente ao longo do tempo, sendo a função linear aquela que melhor poderá definir este comportamento. Verificou-se um aumento significativo da concentração média de nitroso-pigmentos logo no início do processo como consequência da conversão imediata de nitrito a NO, que por sua vez irá dar origem ao pigmento rosado característico deste tipo de produtos cárneos. As oscilações da concentração média de nitroso-pigmentos verificadas deveram-se à diferença de pigmentação das amostras analisadas, à instabilidade do pigmento nitrosilhemocromo e à sua reacção com a luz e/ou o oxigénio. Já para a concentração média de pigmentos totais deste produto cárneo curado, verificou-se que o seu valor vai diminuindo ao longo do tempo, sendo a função logarítmica aquela que melhor poderá definir o seu comportamento médio.

No caso da mortadela do tipo Bolonhesa verificou-se que a concentração média de nitroso-pigmentos vai diminuindo ao longo do tempo, sendo neste caso a função linear aquela que melhor poderá definir o seu comportamento. A evolução da concentração média de nitroso-pigmentos deverá ter sido mascarada devido à presença de corantes. Relativamente à concentração média de pigmentos totais verificou-se que ocorre a sua diminuição ao longo do tempo, mesmo que este comportamento esteja a ser mascarado pela presença de corante. Neste caso a função logarítmica é aquela que melhor poderá definir a evolução da concentração média de pigmentos totais.

Em resultado deste estudo ter sido baseado na análise de amostras reais, que como seria de esperar apresentam diferenças de homogeneidade, os modelos matemáticos que definem o comportamento dos parâmetros analisados apresentam valores de coeficiente de correlação baixos. É necessário analisar um maior número de lotes por produto alimentar estudado, para confirmação das funções que, com os dados obtidos, melhor explicaram a evolução dos parâmetros analisados.

Este trabalho experimental poderá ter impulsionado uma base para o desenvolvimento de outros estudos. Como orientação futura para outros trabalhos sugere-se a realização de análises

microbiológicas que confirmem os resultados obtidos, e de análises que assegurem a manutenção dos padrões de qualidade – organolépticos, com o intuito de aumentar o prazo de vida útil dos produtos cárneos curados aqui analisados. Sugere-se também o estudo da evolução dos teores médios de nitrito e de nitrato, bem como da concentração média de pigmentos em fiambre da perna extra e em mortadela do tipo Bolonhesa aos quais se adicionaram na formulação teores de nitrito inferiores para verificar se o prazo de vida útil destes produtos se mantém.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boles, J. A., Pegg, R. (2010), *Meat color*. In: *The Saskatchewan Food Product Innovation Program*, Montana State University and Saskatchewan Food Product Innovation Program University of Saskatchewan, 4p. Acessível em http://animalrange.montana.edu_courses_meat_meatcol, consultada em Setembro de 2010;

Cassens, R. G. (1990), *Nitrite-cured meat: A food safety issue in perspective*, Trumbull, CT: Food and Nutrition Press. Citado por Honikel, K.-O. (2008), The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, *Meat Science*, **78**, p 68-76;

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, 12 p;

Decreto-lei 33/2008 (2008), Estabelece as condições a que deve obedecer a utilização dos aditivos alimentares, com excepção dos corantes e edulcorantes., *Diário da República* nº **39**, I Série de 25 de Fevereiro de 2008, p.1215-1221;

Dederer, I. (2006), *Personal communication*. Citado por Honikel, K.-O. (2008), The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, *Meat Science*, **78**, p 68-76;

Directiva 2006/52/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 5 de Julho de 2006, que altera a Directiva 95/2/CE relativa aos aditivos alimentares com excepção dos corantes e dos edulcorantes e a Directiva 94/35/CE relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentares;

Dordević, V., Vuksan, B., Radetić, P., Durdica, H., Mitković, M. (1980). Prilog ispitivanju uticaja pojedinih faktora na promene sadržaja nitrita u mesu, *Tehnologija mesa*, **21** (10), p 287-290. Citado por Honikel, K.-O. (2008), The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, *Meat Science*, **78**, p 68-76;

Dryden, F. D., Birdsall, J. J. (1980), Why nitrite does not impart color, *Food Technology*, **34** (7), p 29-31. Citado por: Pegg, R. B., Shahidi, F. (2000), *Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*, Food and Nutrition Press, Inc., Canada, USA, p 268;

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*, vol. **14**, p 1-34;

Empresa X (2009a), *Capítulo IX – Plano HACCP – Linha Fatiados*, ed. 01, Departamento da Qualidade da empresa X;

- Empresa X (2009b), *Caderno de Encargos da empresa X.*, Departamento da Qualidade da empresa X;
- Epley, R. J., Addis, P. B., Warthesen, J. J. (1992), *Nitrite in meat*, VW-00974, Regents of the University of Minnesota, USA, 2 p;
- 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 – Campinas SP*, **3** (2), p 16-22;
- Gava, A. J., Silva, C. B., Frias, J. R. G. (2008), *Tecnologia de Alimentos – Princípios e aplicações*, Edições Nobel, 1ª edição, São Paulo;
- Gibson, A. M., Roberts, T. A., Robinson, A. (1984), Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized cured meats. Nitrite monitoring during storage of pasteurized pork slurries, *Journal of Food Technology*, **19**, p 29-44. Citado por Honikel, K.-O. (2008), The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, *Meat Science*, **78**, p 68-76;
- Gry, J., Rasmussen, N. J., Jensen, W. K., Brandt, I. G., Fabech, B. (1983), *Investigations on effects of nitrite in commercially prepared Danish cured meat products*. A report of the Federation of Danish Pig Producers and Slaughterhouses and the National Food Agency of Denmark. Citado por: 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*, vol. **14**, p 1-34;
- Guilherme, C. A., Santos, L. H. M., Becher, L., Stremel, P. I. (2008), Alterações bioquímicas na cor da carne. In: *VI Semana de Tecnologia em Alimentos*, Paraná, 13 a 16 de Maio de 2008, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa, **2º volume**, nº 29, 7p;
- Honikel, K.-O. (2008), The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, *Meat Science*, **78**, p 68-76;
- Honikel, K.-O. (2010), *Curing*. In: *Handbook of meat processing*, 1st edition, Fidel Toldrá Editors, USA, p 125-138;
- Hornsey, H. C. (1956). The colour of cooked cured pork. Estimation of the nitric oxide-haem pigments, *Journal of Food Science*, **7**, p 534-540. Citado por: Wrolstad, R. E., Decher, E., Schwartz, S., Sporns, P. (2005), *Handbook of food analytical chemistry – water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates*, 2nd edition, John Willey & Sons Publisher, New Jersey, USA;
- Jay, J. M. (2005), *Modern food microbiology*, 6ª edição, Tradução brasileira, Artmed Editora S.A., Porto Alegre, Brasil, 711 p;
- Killday, B. K., Tempesta, M. S., Bailey, M. E., Metral, C. J. (1988), Structural characterization of nitrosylhemochromogen of cooked cured meat: implications in the meat-curing reaction, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. **36**, p 909. Citado por: Pegg, R. B., Shahidi, F. (2000), *Nitrite*

- curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*, Food and Nutrition Press, Inc., Canada, USA, p 268;
- Koniecko, E. (1979), *Handbook for meat chemists*, Avery Publishing Group Inc., 1st edition, New Jersey, USA;
- Kudryashov (2003), *Personal communication*. In: Honikel, K.-O. (2008) The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, *Meat Science*, **78**, p 68-76;
- Legislação de carnes: mortadela (sem data), http://www.kraki.com.br/legisla/l_c_mort.htm, consultada em Setembro de 2010;
- Lidon, F., Silvestre, M. M. (2007), *Indústrias Alimentares. Aditivos e Tecnologia*; Escolar Editora, 1^a edição, Lisboa;
- Lidon, F., Silvestre, M. M. (2008), *Conservação de Alimentos. Princípios e Metodologias*, Escolar Editora, 1^a edição, Lisboa;
- Mancini, R. A., Hunt, M. C. (2005), Current research in meat color, *Meat Science*, **71**, 100-121;
- Mantese, F. (2002), *Transformação do músculo em carne*. Seminário apresentado na disciplina de bioquímica do tecido animal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Brasil, 15 p;
- Marchesi, C. M., Cichoski, A. J., Zanoelo, E. F., Dariva, C. (2006), Influência das condições de armazenamento sobre os pigmentos cárneos e a cor do salame italiano fatiado; *Ciência e Tecnologia Alimentar*, **26** (3), p 697-704;
- Margeson, J. H., Suggs, J. C., Midgett, M. R. (1980), Reduction of nitrate to nitrite with cadmium, *Anal Chemistry*, **52**, p 1955–1957. Citado por: Oliveira, S. M., Lopes, T. I. M. S., Rangel, A. O. S. S. (2004), Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in cured meat by sequential injection analysis, *Journal of Food Science*, **69** (9), p C690-C694;
- Mendes, B., Oliveira, J.F.S. (2004), *Qualidade da água para consumo humano*, LIDEL, Edições Técnicas, Lda, Lisboa, 626 p;
- Mirvish, S. S. (1994), Experimental evidence for inhibition of N-nitroso compound formation as a factor in the negative correlation between vitamin C consumption and the incidence of certain cancers. *Cancer Res*, **vol. 54**, p 1948–1951. Citado por: World Health Organization (2010), *Ingested nitrate and nitrite and cyanobacterial peptide toxins*, IARC monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans, **vol. 94**, Lyon, France, 462 p;
- Norma NP 1846 (2006), *Carnes e produtos cárneos. Determinação do teor de nitritos. Método de referência*, 8 p;
- Norma NP 1847-1 (2009), *Carnes e produtos cárneos. Determinação do teor de nitratos. Parte 1: Método de referência*; 10 p;

Norma NP 4393 (2001), *Fiambre. Definição e características*, 5 p;

Norma NP 720 (2009), *Mortadela. Definição, classificação e apresentação*, 6 p;

Oliveira, M. J., Araújo, W. M. C., Borgo, L. A. (2005), Quantificação de nitrato e nitrito em linguiças do tipo frescal, *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas, **25** (4), p 736-742;

Oliveira, S. M., Lopes, T. I. M. S., Rangel, A. O. S. S. (2004), Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in cured meat by sequential injection analysis, *Journal of Food Science*, **69** (9), p C690 – C694;

Ordóñez, J. A., Rodriguez, M. I. C., Álvarez, L. F., Sanz, M. L. G., Minguillón, G. D. G. F., Perales, L. H., Cortecero, M. D. S. (2005), *Tecnologias de alimentos*, vol.2, Tradução brasileira, Artmed Editora, Porto Alegre, Brasil, 279 p. Citado por: Leitão, A. L. (2009), Apontamentos referentes a *Alimentos de origem animal* da Disciplina de Qualidade Alimentar II, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Caparica, 40 p;

Pearson, A. M., Tauber, F. W. (1984), *Analytical methods*, Processed Meats, 2nd ed., A. M. Pearson and F. W. Tauber editions, AVI Publishing, Westport, p 360-361. Citado por: Wrolstad, R. E., Decher, E., Schwartz, S., Sporns, P. (2005), *Handbook of food analytical chemistry – water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates*, 2nd edition, John Willey & Sons Publisher, New Jersey, USA.

Pegg, R. B., Shahidi, F. (2000), *Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*, Food and Nutrition Press, Inc., Canada, USA, p 268;

Pennington, J. A. T. (1998), Dietary nitrates exposure models for nitrates and nitrites, *Food Control*, **6** (9), p 385-395;

Reddy, D., Lancaster, J. R., Cornforth, D. P. (1983), Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: electron spin resonance detection of iron-nitric oxide complexes, *Science* **221**, p 769-770. Citado por: Jay, J. M. (2005), *Modern food microbiology*, 6^a edição, Tradução brasileira, Artmed Editora S.A., Porto Alegre, Brasil, 711 p;

Robach, M. C., Ivey, F. J., Hickey, C. S. (1978), System for evaluating clostridial inhibition in cured meat products, *Applied and Environmental Microbiology*, **36** (1) , p. 210-211;

Roça, R. O. (2000), *Cura de carnes.*, <http://fca.unesp.br>, consultada em Julho de 2010;

Sebranek, J. G. (2009), Basic cured ingredients. In: *Ingredients in meat products – properties, functionality and applications*, 1st edition, Rodrigo Tarté Editor, USA, p 10-19;

Sebranek, J. G., Bacus, J. N. (2007), Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?, *Meat Science*, **77**, p 136-147;

Stegeman, D., Verkleij, T. J. (2008), *Reducing the amount of nitrites in the production of pasteurized organic meat products*, Report nº 940 of Agrotechnology and Food Sciences Group, Dutch Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality;

Tompkin, R. B. (1983), Nitrite. In: *Antimicrobials in foods*, ed. A. L. Branen and P. M. Davidson, p 205-206, New York: Marcel Dekker. Citado por: Jay, J. M. (2005), *Modern food microbiology*, 6ª edição, Tradução brasileira, Artmed Editora S.A., Porto Alegre, Brasil, 711 p;

URL:<http://medicina.med.up.pt/bcm/trabalhos/2006/aminhaproteinafavorita/estrutura.htm>, consultada em Setembro de 2010;

URL:<http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/hematin.html>, consultada em Setembro de 2010;

Woods, L. F. J., Wood, J. M., Gibbs, P. A. (1981), The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system in *Clostridium sporogens* by sodium nitrite, *Journal of Gen. Microbiol.* **125**, p 399-406. Citado por: Jay, J. M. (2005), *Modern food microbiology*, 6ª edição, Tradução brasileira, Artmed Editora S.A., Porto Alegre, Brasil, 711 p;

World Health Organization (2010), *Ingested nitrate and nitrite and cyanobacterial peptide toxins*, IARC monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans, **vol. 94**, Lyon, France, 462 p;

Wrolstad, R. E., Decher, E., Schwartz, S., Sporns, P. (2005), *Handbook of food analytical chemistry – water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates*, 2nd edition, John Willey & Sons Publisher, New Jersey, USA.


6. ANEXOS

Anexo I - Especificações da mistura de gases que constituem a atmosfera modificada usada no embalamento do fiambre da perna extra e da mortadela do tipo Bolonhesa.


Anexo II – Procedimento de preparação das soluções usadas nas determinações do teor de nitrito e de nitrato.

Anexo III – Valores médios e respectivo desvio-padrão usado na construção dos gráficos da evolução dos parâmetros médios em estudo.

Anexo I – Ficha técnica da mistura de gases que constituem a atmosfera modificada usada no embalamento do fiambre da perna extra e da mortadela do tipo Bolonhesa.




ALIGAL 13




ALIGAL é a solução Air Liquide dedicada ao mercado agro-alimentar

- **Aplicação**
Conservação de charcutaria
- **Informações de transporte**
Gás comprimido
Designação oficial: Gás comprimido, N.S.A. 1956
Nº ONU: Classe 2
ADR/RID: Código de classificação 1 A



- **Ficha de Segurança Produto**
Nº 300-15-001PT
Acesso: www.airliquide.pt

- **Propriedades físicas**
Densidade relativa, gás..... mais pesado que o ar
Côr..... Gás incolor
Odor..... Sem odor
- **Propriedades**
Identificação dos perigos: risco de asfíxia em concentrações altas
Domínio de inflamabilidade: não inflamável
Proteção pessoal: assegurar ventilação adequada
- **Equipamento das garrafas**
Rosca da válvula:
AFNOR C (21,7 x 1,814 SI - RH mecho)
Côr da ogiva: verde claro (RAL 6018)



- **Especificações do produto**

Componentes (% Vol. abs)	Impurezas (ppm v/v)	Modo de fornecimento	Dimensão da embalagem	Pressão (bar)	Capacidade (m³)	Referência produto
CO ₂ 30% ±3%	H ₂ O ≤ 50	Garrafa	L50	200	10,8	W050L50R2A001
N ₂ Q.B.	O ₂ ≤ 20					
	CO ≤ 10					
	NO/NO ₂ ≤ 10					
	C ₂ H ₆ ≤ 30					
	S total ≤ 0,5 (*)					
	óleo ≤ 5 ppm w/w (*)					

(*) Garantido na fonte de CO₂ Líquido
Os componentes da mistura estão em conformidade com as especificações E290 (Dióxido de carbono) e E941 (Azoto)
Produto conforme ao sistema HACCP

Esta ficha está abrangida pelo cláusulado em página 2 deste documento

1/2

Portugal-pt-ALIGAL13-10/2009-v6 // Código de ligação // ALIGAL13 é uma marca registada

ADVERTENCIA PREVIA

A informação contida nesta ficha de produto é genérica e não obedece a quaisquer condições ou regulamentações específicas ou locais. Esta ficha não é nem deve ser considerada como uma recomendação.
A Air Liquide não assume qualquer obrigação ou responsabilidade relativas à informação contida nesta ficha de produto excepto no que diz respeito às especificações do produto constantes da Ficha de Segurança, nem à sua completude nem ao uso da respectiva informação ou consequências desse uso. A Air Liquide não presta qualquer garantia, (directa ou indirecta) seja qual for a sua natureza, relativa a esta ficha.

Anexo II - Procedimento de preparação das soluções usadas nas determinações do teor de nitrito e de nitrato.

II.1 Solução-mãe de nitrito de sódio

Em balão de precisão de 100 mL dissolver em água 1,000 g de nitrito de sódio, previamente seco em estufa a 105°C, perfazer o volume com água e homogeneizar. Esta solução contém 10 mg de nitrito de sódio por mL (NP 1846:2006).

II.2 Solução-mãe de nitrato de potássio

Em balão de precisão de 100 mL dissolver em água 1,465 g de nitrato de sódio, previamente seco em estufa a 105°C, perfazer o volume com água e homogeneizar. Esta solução contém 14,65 mg de nitrato de potássio por mL (NP 1847-1:2009).

II.3 Solução-tampão amoniacal a pH entre 9,6 e 9,7

Em balão de precisão de 100 mL diluir 20 mL de ácido clorídrico concentrado ($\rho_{20} = 1,19$ g/mL) em 500 mL de água. Juntam-se 10 g de sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético $[(\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ e 55 mL de amônia concentrada ($\rho_{20} = 0,88$ g/mL).

Perfazer o volume com água, homogeneizar e verificar o pH da solução (NP 1847-1:2009).

II.4 Solução I para desenvolvimento da coloração

Em balão volumétrico de 1000 mL dissolver, por aquecimento em banho de água, 2 g de sulfanilamida ($\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$) em 800 mL de água.

Arrefecer, filtrar se for necessário e juntar, agitando, 100 mL de ácido clorídrico concentrado ($\rho_{20} = 1,19$ g/mL). Perfazer o volume com água e homogeneizar (NP 1846:2006).

II.5 Solução II para desenvolvimento da coloração

Em balão volumétrico de 250 mL dissolver 0,25 g de cloreto de N-naftil-etilenodiamina ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$) em água. Perfazer o volume com água e homogeneizar.

Conservar esta solução em frasco de vidro de cor âmbar, bem fechado, no frigorífico e no máximo durante uma semana (NP 1846:2006).

II.6 Solução III para desenvolvimento da coloração

Em balão volumétrico de 1000 mL, diluir 445 mL de ácido clorídrico concentrado ($\rho_{20} = 1,19$ g/mL) em água. Perfazer o volume com água e homogeneizar (NP 1846:2006).

II.7 Solução saturada de bórax

Dissolver 50 g de tetraborato de sódio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) em 1000 mL de água morna e deixar arrefecer à temperatura ambiente (NP 1846:2006).

II.8 Reagente I para defecação da amostra

Em balão marcado de 1000 mL dissolver 106 g de hexacianoferrato de potássio trihidratado [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] em água. Perfazer o volume com água e homogeneizar (NP 1846:2006).

II.9 Reagente II para defecação da amostra

Em balão marcado de 1000 mL dissolver 220 g de acetato de zinco dihidratado [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] em água e adicionar 30mL de ácido acético glacial. Perfazer o volume com água e homogeneizar (NP 1846:2006).

Anexo III – Valores médios e respectivo desvio-padrão usado na construção dos gráficos da evolução dos parâmetros médios em estudo.

Tabela III.1 – Valores relativos ao teor de nitritos (expresso em mg NaNO₂/kg) usados na construção do gráfico da evolução do teor médio de nitritos ao longo do tempo do fiambre da perna extra em estudo apresentado na figura 3.3.

Tempo (dias)	Teor de Nitritos (mg NaNO ₂ /kg)				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	124	130	122	126	4
1	80	44	36	53	24
7	29	45	34	36	8
13	20	34	28	27	7
20	31	36	24	30	6
27	22	35	32	30	7
34	21	29	26	25	4
41	17	22	27	22	5
48	24	16	18	19	4
55	5	4	4	4	1
62	--	4	4	4	0
69	3	--	--	--	--

Tabela III.2 – Valores relativos ao teor de nitratos (expresso em mg NaNO₃/kg) usados na construção do gráfico da evolução do teor médio de nitratos ao longo do tempo do fiambre da perna extra em estudo apresentado na figura 3.7.

Tempo (dias)	Teor de Nitratos (mg NaNO ₃ /kg)				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	47	55	78	60	16
1	54	39	34	43	10
7	34	31	26	31	4
13	23	35	28	29	6
20	38	41	36	38	3
27	37	47	38	41	6
34	36	47	40	41	6
41	42	40	35	39	4
48	27	35	32	31	4
55	33	33	29	31	2
62	--	33	29	31	3
69	31	--	--	--	--

Tabela III.3 – Valores relativos ao teor de nitritos (expresso em mg NaNO₂/kg) usados na construção do gráfico da evolução do teor médio de nitritos ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo apresentado na figura 3.11.

Tempo (dias)	Teor de Nitritos (mg NaNO ₂ /kg)				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	120	107	94	107	13
1	66		33	49	24
7	56	34	26	39	16
13	53	29	28	37	14
21	51	30	26	36	14
28	48	27	25	33	13
35	47	22	28	32	13
42	44	25	20	30	13
49	41	21	20	27	12
56	34	17		25	12

Tabela III.4 – Valores relativos ao teor de nitratos (expresso em mg NaNO₃/kg) usados na construção do gráfico da evolução do teor médio de nitratos ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo apresentado na figura 3.15.

Tempo (dias)	Teor de Nitratos (mg NaNO ₃ /kg)				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	29	34	31	32	2
1	47		35	41	8
7	40	42	22	35	11
13	36	18	36	30	10
21	51	46	39	46	6
28	53	49	52	51	2
35	43	63	47	51	11
42	62	57	53	57	4
49	59	51	55	55	4
56	51	54	--	52	2

Tabela III.5 – Valores relativos à concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) usados na construção do gráfico da evolução da concentração média de nitroso-pigmentos ao longo do tempo do fiambre da perna extra em estudo apresentado na figura 3.19.

Concentração de nitroso-pigmentos (mg nitroso hematina/kg)					
Tempo (dias)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	2	5	5	4	1
1	39	42	41	41	2
7	72	47	46	55	15
13	48	73	65	62	13
20	60	38	28	42	16
27	61	67	64	64	3
34	58	53	52	54	4
41	68	58	73	66	8
48	--	56	54	55	2
55	78	54	60	64	12
62	--	60	58	59	1
69	70	--	--	--	--

Tabela III.6 – Valores relativos à concentração de pigmentos totais (expressa em pigmento heme total/kg) usados na construção do gráfico da evolução da concentração média de pigmentos totais ao longo do tempo do fiambre da perna extra em estudo apresentado na figura 3.23.

Concentração de pigmentos totais (mg pigmento heme total/kg)					
Tempo (dias)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	23	22	26	24	2
1	147	139	133	140	7
7	104	147	165	139	31
13	101	131	133	121	18
20	117	138	100	118	19
27	98	119	139	119	21
34	87	93	60	80	18
41	106	103	91	100	8
48	--	116	109	112	5
55	97	110	138	115	21
62	--	91	83	87	6
69	104	--	--	--	--

Tabela III.7 – Valores relativos à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais usados na construção do gráfico da evolução da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo do fiambre da perna extra em estudo apresentado na figura 3.27.

% nitroso-pigmentos nos pigmentos totais					
Tempo (dias)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	11	23	19	18	6
1	27	31	31	29	2
7	69	32	28	43	23
13	48	56	49	51	5
20	51	28	28	35	14
27	62	56	46	55	8
34	67	57	86	70	15
41	64	56	81	67	13
48	--	49	49	49	0
55	81	50	44	58	20
62	67	66	69	67	2
69	28	--	--	--	--

Tabela III.8 – Valores relativos à concentração de nitroso-pigmentos (expressa em mg nitroso hematina/kg) usados na construção do gráfico da evolução da concentração média de nitroso-pigmentos ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo apresentado na figura 3.30.

Concentração de nitroso-pigmentos (mg nitroso hematina/kg)					
Tempo (dias)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	108	74	47	76	31
1	74		92	83	13
7	92	86	108	95	11
13	94	93	102	96	5
21	89	91	79	87	6
28	100	68	84	84	16
35	94	80	82	85	8
42	117	84	70	91	24
49	104	62	78	81	21
56	94	64		79	21

Tabela III.9 – Valores relativos à concentração de pigmentos totais (expressa em pigmento heme total/kg) usados na construção do gráfico da evolução da concentração média de pigmentos totais ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo apresentado na figura 3.34.

Concentração de pigmentos totais (mg pigmento heme total/kg)					
Tempo (dias)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	453	111	355	307	176
1	355		215	285	99
7	141	143	165	150	13
13	131	136	122	129	7
21	120	124	136	127	8
28	81	120	103	101	19
35	110	104	96	103	7
42	198	85	96	126	62
49	180	78	97	118	54
56	122	73	--	98	35

Tabela III.10 – Valores relativos à percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais usados na construção do gráfico da evolução da percentagem de nitroso-pigmentos nos pigmentos totais ao longo do tempo da mortadela do tipo Bolonhesa em estudo apresentado na figura 3.38.

% nitroso-pigmentos nos pigmentos totais					
Tempo (dias)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média	Desvio-padrão
0	24	67	13	35	28
1	21		43	32	15
7	65	60	65	63	3
13	72	68	83	75	8
21	74	73	58	69	9
28	123	57	81	87	33
35	85	77	85	82	5
42	59	99	73	77	20
49	58	80	80	72	13
56	77	88		83	8