



Rui Pedro Félix Baptista Fernandes

Avaliação do potencial de revestimentos de origem proteica incorporados com extrato e/ou óleo essencial de plantas aromáticas na preservação de produtos cárneos

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso e pela Professora Doutora Lúcia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Avaliação do potencial de revestimentos de origem proteica incorporados com extratos e/ou óleos essenciais de plantas aromáticas na preservação de produtos cárneos

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Orientador externo: Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso

Orientador interno: Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto

Rui Pedro Félix Baptista Fernandes

Coimbra

Setembro 2015

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida”. – Johann Goethe

AGRADECIMENTOS

Nesta importante etapa da minha vida que encerra com a realização deste trabalho, não poderia deixar de recordar e agradecer todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para que fosse possível a sua concretização.

Começo por agradecer a toda a minha família por todo o apoio, confiança, motivação e estabilidade que me proporcionaram durante este percurso.

Ainda, gostaria de agradecer à Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso pela oportunidade de realizar este trabalho e respetiva orientação, apoio e ensinamentos transmitidos.

À Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto, o meu obrigado pela sua disponibilidade, bem como pelo apoio, ensinamentos e tempo dispensado.

À Professora Doutora Maria José Gonçalves, Professora Doutora Olga Cardoso e Doutora Marta Henriques, quero agradecer pelo contributo, trabalho, conhecimento e tempo dispensado.

Aos meus colegas de laboratório, Jorge Silva e Marcelo Catarino, o meu agradecimento sincero por todos os momentos partilhados na realização deste trabalho, pelos ensinamentos e indispensável amizade.

A toda a equipa do laboratório, o meu agradecimento pela oportunidade, fantástica integração, conselhos, apoio e amizade.

Ao amigo Jorge Viegas por toda a ajuda, conhecimento e tempo dispensado.

À empresa Irmãos Monteiro, S.A, e em particular ao Engenheiro Daniel Gomes, gostaria de agradecer a colaboração e acompanhamento de parte deste trabalho, bem como o interesse demonstrado pelo projeto a ele subjacente (*Passaporte para o Empreendedorismo-IAPMEI*, projeto nº 1596).

Finalmente, mas não menos importantes, a todos os colegas de curso e amigos que me acompanharam neste percurso.

Por também fazerem parte ativa nesta caminhada, deixo aqui uma informal referência às instituições Filarmónica Boa Vontade Lorvanense e União Desportiva Lorvanense.

A todos, os meus sinceros agradecimentos! Rui Pedro Fernandes.

RESUMO

O consumidor moderno procura cada vez mais produtos alimentares mais naturais, minimamente processados, livres de aditivos sintéticos, mas cuja elevada qualidade, segurança estejam garantidas e se possível, com tempo de vida prolongado.

Aliado a isso, a legislação atual impõem medidas de proteção dos consumidores e de controlo dos géneros alimentares, de forma a ir ao encontro das necessidades do mercado e dos consumidores. Dentro dessas medidas destaca-se os termos de utilização/uso impostos aos aditivos sintéticos, num clima de compromisso entre os possíveis efeitos adversos na saúde e a necessidade de manter no mercado determinados alimentos tradicionais. Neste contexto, as indústrias alimentares são desafiadas a uma constante adaptação e inovação, incluindo a busca de novas matérias-prima naturais com capacidade antimicrobiana e antioxidante capazes de produzir efeitos benéficos na conservação dos seus produtos.

Neste campo de ação, certas plantas aromáticas que são utilizadas na alimentação com uma ação sensorial, têm vindo a ser estudadas com o intuito de, através das propriedades antioxidantes e antimicrobianas que possuem, conseguirem potenciar a conservação dos alimentos. Adicionalmente, a procura de materiais edíveis capazes de se conjugar com a proteção dos alimentos têm também sido valorizada.

Assim este trabalho é um contributo para a busca por novos métodos de conservação dos alimentos, através do desenvolvimento de revestimentos comestíveis e ecológicos (ex. biofilmes e soluções edíveis) incorporados com óleo essencial *Oreganum virens* e extrato aquoso *Oreganum vulgare*, para consequente aplicação destes revestimentos em enchidos portugueses, nomeadamente a alheira e painho.

Palavras-Chave: Segurança alimentar; Plantas aromáticas; Óleos essenciais; Extratos aquosos; Biofilmes; Produtos Cárneos; Conservação

ABSTRACT

The modern consumer is increasingly seeking more natural foods, minimally processed, free from synthetic additives, but whose high quality, safety are guaranteed and if possible, with prolonged lifetime. Along with that, the current legislation impose protective measures for consumers and control of foodstuffs in order to meet the needs of the market and consumers. Within these measures, the use of synthetic additives is restricted to roles based on the compromise between their possible adverse effects on health and the need to maintain certain traditional foods on the market. In this context, food industries are challenged to constant adaptation and innovation, including the search for new natural raw materials with antimicrobial and antioxidant capacity, capable of producing beneficial effects on the conservation of their products.

In this field of action, certain aromatic plants that are used in diet as spices, have been studied in order to enhance food preservation through their antioxidant and antimicrobial properties. In addition, the demand for edible materials able to combine with food protection have also been valued.

This work is intended to be a valid contribution to the search for new food preservation methods, through the development of edible and ecological biofilm and coating formulations incorporated with essential oil of *Oreganum virens* or a water extract of *Oreganum vulgare*, for consequent application in traditional portuguese sausages, namely *alheira* and *painho*.

Key-words: Food safety; Aromatic plants; Essencial oils; Water extracts; Edible films; Meat Products; Conservation

SUMÁRIO

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabela	xi
Índice de Anexos	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução.....	15
1.1 Enquadramento do tema de trabalho	15
1.1.1 Objetivo do estudo.....	17
1.2 Revisão bibliográfica.....	18
1.2.1 Segurança alimentar.....	18
1.2.2 Enquadramento legal europeu na segurança dos géneros alimentícios.....	20
1.2.3 Deterioração dos alimentos.....	21
1.2.4 Alimentos cárneos.....	23
1.2.5 Perigos Alimentares.....	25
1.2.6 Potencial aplicação de plantas aromáticas.....	36
1.2.7 Embalagens – materiais e objetos ativos e inteligentes.....	40
1.2.8 Biofilmes.....	41
2. Desenvolvimento Experimental – Materiais e Métodos.....	44
2.1 Seleção do extrato e/ou óleo essencial com atividade antioxidante e antimicrobiana promissora para aplicação em produtos cárneos.....	44
2.1.1 Aquisição de plantas aromáticas e óleos essenciais.....	44
2.1.2 Obtenção de extratos aquosos.....	45

2.1.3	Quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos aquosos.....	45
2.1.4	Avaliação do poder antioxidante pelo método de DPPH°.....	46
2.1.5	Avaliação da Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) dos extratos aquosos e dos óleos essenciais.....	47
2.1.6	Determinação do CMI e CML - Efeito dos extratos aquosos e óleos essenciais no crescimento de estirpes bacterianas.....	48
2.2	Desenvolvimento, otimização e caracterização dos revestimentos edíveis (biofilmes) incorporados com o extrato e óleo essencial promissor.....	49
2.2.1	Determinação da composição do concentrado de proteína de soro (CPS)..	49
2.2.2	Otimização da produção de biofilmes.....	49
2.2.3	Produção dos biofilmes com extrato e óleo essencial.....	50
2.2.4	Métodos analíticos para a determinação das características dos biofilmes....	51
2.3	Aplicação do revestimento edível (solução de biofilme) incorporado com o extrato e/ou óleos essencial promissores em produtos cárneos e monitorização da sua capacidade de preservação.....	53
2.3.1	Seleção dos produtos cárneos.....	54
2.3.2	Análises microbiológicas.....	55
2.3.3	Análise físico-química das amostras.....	57
2.3.4	Análise sensorial.....	61
<u>2.4</u>	Tratamento estatístico dos resultados.....	61
3.	Resultados e Discussão.....	62
3.1	Seleção do extrato e/ou óleo essencial com atividade antioxidante e antimicrobiana promissora para aplicação em produtos cárneos.....	62
3.1.1	Seleção das plantas mais promissoras.....	62
3.1.2	Extração e avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana dos extratos aquosos.....	66

3.1.3 Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais...	71
3.1.4 Escolha do óleo essencial e extrato aquoso com base nos resultados.....	75
3.2 Desenvolvimento, otimização e caracterização de biofilmes incorporados com o extrato e óleo essencial de oregão.....	75
3.2.1 Constituição do concentrado de proteína de soro de leite.....	75
3.2.2 Otimização dos biofilmes controlo e com incorporação de extratos aquosos e/ou OEs de oregão.....	76
3.2.3 Parâmetros físico-químicos dos Biofilmes.....	79
3.3 Aplicação da solução de biofilme incorporada com extrato e/ou óleos essencial de orégão em produtos cárneos e monitorização da sua capacidade de preservação.....	87
3.3.1 Escolha do revestimento edível de origem proteica.....	87
3.3.2 Escolha da percentagem de OE e EXTAq a adicionar na formulação da solução de biofilme.....	87
3.3.3 Resultado da aplicação da solução de biofilme.....	89
3.3.4 Análises microbiológicas.....	90
3.3.5 Análises físico-químicas.....	96
3.3.6 Análise sensorial.....	106
4. Conclusão.....	110
4.1 Trabalhos futuros.....	111
5. Bibliografia.....	112
6. Anexos.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferenças entre Food Safety e Food security (adaptado de Hanning, et.al, (2012).....	19
Figura 2: Cadeia alimentar "do prado para o prato" (adaptado CDC (2011))	20
Figura 3: Etapas de Avaliação de Risco (adaptado de OMS (2015)).....	32
Figura 4: Exemplificação do método de extração dos óleos essenciais (adaptado de Aleksic e Knezevic (2013))	39
Figura 5: Enchidos selecionados e fornecidos pela empresa Irmãos Monteiro, S.A.....	54
Figura 6: Exemplificação de um gráfico da análise de perfil da textura e respetivas zonas de cálculo das características dos produtos alimentares (adaptado de Gadiyaram e Kannan (2004)).....	60
Figura 7: Resultado dos primeiros testes de biofilmes otimizados.....	78
Figura 8: Espessura dos biofilmes com OE (A) e com EXTAq (B).....	79
Figura 9: Cor (ΔE) dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B).....	81
Figura 10: Exemplificação da aplicação de OE (1,2%) e EXTAq (2,5%) nos Biofilmes.	81
Figura 11: Transparência dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B).....	83
Figura 12: Humidade dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B).....	84
Figura 13: Solubilidade em água dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B).....	85
Figura 14: Permeabilidade ao vapor de água dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B).	86
Figura 15: Exemplificação da aplicação do biofilme (BO) na alheira.	89
Figura 16: Exemplificação do embalamento dos enchidos sem e com aplicação dos biofilme	90
Figura 17: Contagens microbiológicas das estirpes <i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i> (A), <i>B. subtilis</i> (B) e MTC 30°C (C) nas amostras de alheira.....	93
Figura 18: Contagens microbiológicas das estirpes <i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i> (A), <i>B. subtilis</i> (B) e MTC 30°C (C) nas amostras de painhos.....	95
Figura 19: Evolução da humidade nas alheiras (A) e painhos (B).....	99
Figura 20: Evolução da acidez titulável (% ácido láctico) nas alheiras (A) e painhos (B).	100

Figura 21: Evolução do pH nas alheiras (A) e painhos (B).....	101
Figura 22: Evolução da cor nas alheiras (A) e painhos (B).	103
Figura 23: Evolução da peroxidação lipídica (TBARS) nas alheiras (A) e painhos (B).....	106
Figura 24: Resultados da análise sensorial nas alheiras (A) e painhos (B).....	108
Figura 25: Alheiras após confeção para os testes sensoriais.	109

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1: Bactérias e respetivos alimentos associados a doenças de origem alimentar.....	28
Tabela 2: Condições experimentais das etapas de otimização da produção do biofilme.	50
Tabela 3: Valores de CMI descritos na literatura para OEs.....	63
Tabela 4: Valores de CFT descritos na literatura para EXTAq.....	64
Tabela 5: Resultados do rendimento de extração, CFT e ensaios antioxidantes realizados aos EXTAq das plantas selecionadas.	68
Tabela 6: Resultados da atividade antimicrobiana dos EXTAq, expressa em CMI e CML....	70
Tabela 7: Resultados da atividade antioxidantes dos OES das diversas plantas usadas neste estudo, expressa pelos métodos DPPH° e TBARS.	73
Tabela 8: Resultados da atividade antimicrobiana dos OEs, expressa em CMI e CML.	73
Tabela 9: Compilação dos resultados obtidos no presente trabalho e os descritos na literatura, relativos à atividade antimicrobiana dos OEs, expressa em CMI.	74
Tabela 10: Composição e características químicas do CPS.....	76
Tabela 11: Avaliação de biofilmes controlo formados a partir de diferentes formulações efetuadas no processo de otimização.	77
Tabela 12: Composição da solução dos biofilmes com concentração de 0,5% (m/m) de OE e EXTAq e respetiva avaliação das propriedades.....	78
Tabela 13: Resultados da determinação do valor de proteína nas amostras (Painhos e Alheiras) controlo, BO e BE no tempo zero (T0) de análise.	97
Tabela 14: Resultados da análise de perfil da textura dos enchidos (controlo e BO).....	104

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo a: Principais agentes patogénicos responsáveis por hospitalizações associados a doenças transmitidas por alimentos nos EUA em 2011 (adaptado CDC (2011)).....	121
Anexo b: Principais agentes patogénicos responsáveis por morte associados a doenças transmitidas por alimentos nos EUA em 2011 (adaptado CDC (2011)).....	121
Anexo c: Bactérias responsáveis por doenças alimentares nos EUA em 2011 (adaptado CDC (2011)).....	121
Anexo d: Vírus responsáveis por doenças alimentares nos EUA em 2011 (adaptado CDC (2011)).....	122
Anexo e: Parasitas responsáveis por doenças alimentares nos EUA em 2011 (adaptado CDC (2011)).....	123
Anexo f: Principais espécies de fungos produtores de micotoxinas associadas a doenças alimentares (adaptado CDC (2011)).....	123
Anexo g: Estrutura química de componentes dos óleos essenciais (Bakkali et al., 2008)..	124
Anexo h: Determinação da composição e características químicas do CPS	125
Anexo i: Evolução da análise de perfil da textura ao longo do tempo de análise.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

APT – Água Peptonada Tamponada

ADI – Ingestão diária aceitável

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ATCC – *American Type Culture Collection*

BE – Biofilme com Extrato de *Oreganum vulgare* Incorporado

BO – Biofilme com Óleo Essencial de *Oreganum virens* Incorporado

CDC – Centro de Controlo e Prevenção de Doenças EUA

CFT – Compostos Fenólicos Totais

CMI – Concentração Mínima de Inibição

CML – Concentração Mínima Letal

CPS – Concentrado de Proteína de Soro

DPPH – 2,3 difenil-1-picrilhidrazilo

DMSO – Dimetil Sulfóxido

EAG – Equivalente ácido gálico

ESAC – Escola Superior Agrária de Coimbra

E. coli – *Escherichia coli*

ETOH – Etanol

EXTAq(s) – Extrato(s) Aquoso(s)

IC₅₀ – 50% da Concentração Máxima Inibitória / concentração capaz inibir 50% a amostra

L. monocytogenes – *Listeria monocytogenes*

MDA – Malonaldeído

MCT 30°C – Microrganismos Totais a 30°C

MHA – Mueller Hilton Agar

NaOH – Hidróxido de Sódio

NP - Norma Portuguesa

OE(s) – Óleo(s) Essenciais(s)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

S. Typhimurium – *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico.

TCA – Ácido Tricloroacético

Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

UV/Vis – Radiação no Espectro Ultra Violeta/Visível

I-INTRODUÇÃO

I.1 Enquadramento do tema de trabalho

A qualidade, segurança e autenticidade dos alimentos constituem preocupações dos consumidores atuais. Assim, os produtores, as indústrias alimentares, indústrias transformadoras e retalhistas têm que assegurar a integridade e segurança dos alimentos nos diversos níveis: físico, químico, biológico, sensorial e nutricional (Oussalah et al., 2004). Esta segurança não é só mantida através do fabrico de produtos seguros e com qualidade, é também importante a existência de uma equipa responsável pelo controlo alimentar, que seja capaz de fazer face aos inúmeros desafios e problemas que colocam em causa a qualidade e segurança do alimento e dos seus consumidores, isto é, a contaminação e a deterioração dos alimentos (Moreira, 2011). Adicionalmente as boas práticas ao longo da cadeia alimentar, “do prado para o prato”, são fundamentais para evitar perdas funcionais dos alimentos, isto porque a contaminação e deterioração pode ocorrer em qualquer etapa do processamento do produto (produção, transformação, transporte ou armazenamento do produto) (Jayasena e Jo, 2013) (Silva et al., 2014).

Apesar de serem muitas as formas e fatores associados à inutilização de um alimento, nomeadamente através de processos físicos, químicos e biológicos, o presente trabalho é focado em duas principais vias da degradação alimentar: I) aquela derivada da oxidação das gorduras, proteínas e vitaminas e II) a derivada do desenvolvimento microrganismos (bactérias, vírus e parasitas) (Jayasena e Jo, 2013).

Reconhecendo os problemas associados à alimentação, na evolução do ser humano assistiu-se a uma renovação de estratégias preventivas e de prolongação do tempo de vida útil do produto (Negi, 2012). Apesar disso, algumas destas práticas não passam incólumes aos olhos dos consumidores mais atentos. Refira-se o exemplo do uso de aditivos antimicrobianos e antioxidantes sintéticos, os quais são associados como causadores ou promotores de doenças, entre as quais as do foro oncológico (Ramos, 2012).

Apesar das autoridades competentes afirmarem a sua segurança e confiança, existem diversos autores que reafirmam as suas preocupações sobre o uso de aditivos sintéticos nos alimentos (Carocho, Morales e Ferreira, 2015) (McCarthy et al., 2001) (Karre, Lopez e Getty, 2012) (Ramos, 2012). Este facto provoca desconfiança nos consumidores, que muitas vezes não possuem tempo e motivação para processar este tipo de informação ou a falta

dela (Bearth, Cousin e Siergrist, 2014). Estas dúvidas estão associadas ao facto de estar comprovado que a alimentação está diretamente associada à saúde Humana, que é bem refletida na frase de Hipócrates “deixa a comida ser medicina e a medicina ser a comida” (Burt, 2004) (Viuda-Martos et al., 2011). Desta forma, as pessoas tendem cada vez mais a apoiar um movimento verde, isto é, procurar produtos mais saudáveis e naturais, amigos do ambiente, frescos ou pouco processados (Burt, 2004) (Gupta e Abu-Ghannam, 2011) (Karre, Lopez e Getty, 2012) (Negi, 2012) (Viuda-Martos et al., 2011).

Por outro lado, a indústria depende destes agentes conservantes neste mercado global crescente e competitivo que se tornou o mundo (Carocho, Morales e Ferreira, 2015). Por isso é necessária a existência de um equilíbrio entre a segurança alimentar e a saúde do consumidor no imediato, e que adicionalmente não comprometa a saúde pública e do consumidor a médio/longo prazo devido ao consumo prolongado de aditivos. Naturalmente, a indústria necessita de tempo para se adaptar a esta busca por novas soluções de preservação dos alimentos. (Oussalah et al., 2004) (Realini e Marcos, 2014) (Silva et al., 2014) (Wrona, Bentayeb e Nerín, 2015).

Nesta procura por alternativas aos aditivos sintéticos, a evolução da tecnologia é fundamental. Hoje a pesquisa e investigação no acondicionamento, revestimento e embalagem dos alimentos possui um impacto positivo. As embalagens são mais que simples estruturas para acondicionar o alimento, possuindo sistemas ativos que interagem com alimento (Realini e Marcos, 2014) (Silva et al., 2014). Englobado nestes sistemas inserem-se as soluções edíveis e biofilmes, que são aplicados como revestimentos que envolvem o alimento de forma a conferir uma proteção do mesmo (Campos, Gerschenson e Flores, 2011) (Oussalah et al., 2004) (Ozdemir e Floros, 2001). Note-se que existem diferentes tipos de biofilmes e soluções edíveis no mercado alimentar.

A proteção destes revestimentos pode ser otimizada com a incorporação de compostos externos, com propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Neste sentido a implementação de compostos reconhecidos como seguros (GRAS) com potencial antimicrobiano e antioxidante pode ser uma alternativa ou complemento aos aditivos sintéticos/químicos utilizados atualmente (Campos, Gerschenson e Flores, 2011) (McCarthy et al., 2001) (Negi, 2012) (Ozdemir e Floros, 2001). Neste contexto, os óleos essenciais e extratos de plantas aromáticas possuem a vantagem de serem compostos GRAS e de existir conhecimento da sua aplicação na alimentação. Efetivamente, muitas das plantas aromáticas

são desde há séculos utilizadas na alimentação como especiarias e condimentos para potenciar efeitos sensoriais, e por essa razão a sua segurança é efetivamente conhecida. Adicionalmente, as aplicabilidades medicinais e farmacêuticas que são atribuídas a algumas dessas plantas constituem um ponto positivo (Negi, 2012) (Oussalah et al., 2004) (Viuda-Martos et al., 2011). Atendendo a estes fatores, a tendência atual é a utilização de soluções edíveis e/ou os respetivos biofilmes biodegradáveis, incorporados com óleos essenciais e extratos, comestíveis e que acrescentem valor nutricional ao produto em causa (Campos, Gerschenson e Flores, 2011) (Oussalah et al., 2004) (Ozdemir e Floros, 2001). Dentro dos alimentos, as carnes e produtos cárneos são muito expostos a deteriorações. No caso concreto da empresa Irmãos Monteiro S.A., existe a necessidade de prolongar o tempo de vida útil de vários dos seus enchidos tradicionais Portugueses, entre os quais a alheira tradicional e o painho.

1.1.1 Objetivo do estudo

Tendo em consideração o texto acima, o objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de um revestimento edível à base de proteínas de soro do leite, incorporado com extrato e/ou óleo essencial de uma planta aromática, e a avaliação da sua funcionalidade como conservante natural direcionado para produtos cárneos, designadamente nos enchidos alheira tradicional e o painho.

1.2 Revisão bibliográfica

1.2.1 Segurança alimentar

A alimentação e a saúde são dois tópicos que sempre se relacionaram. Para além de a alimentação fornecer elementos essenciais ao funcionamento do organismo, os alimentos podem também fornecer compostos e substâncias bioativas benéficas. Estas substâncias têm a particularidade de promover a saúde e prevenir doenças, possuindo para isso propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anticancerígenas (Gupta e Abu-Ghannam, 2011). Naturalmente, nem todos os alimentos possuem estas capacidades sendo atualmente utilizada a designação de alimentos funcionais para diferenciar aqueles com propriedades benéficas comprovadas (Lokesh, Channarayappa e Venkatarangana, 2015). Muitas vezes a alimentação saudável (ou alimentos funcionais) estão associados a estilos de vida tradicionais e de determinadas regiões, como é o exemplo da dieta mediterrânea, caracterizada por um modelo de vida, de seleção e consumo de produtos típicos, entre os quais o azeite, legumes, peixe, vinho e cereais, que no seu conjunto fornecem compostos (ácidos gordos monosaturados, vitaminas, antioxidantes, etc) que favorecem a saúde. Como exemplo disso mesmo, a dieta mediterrânea é associada à redução da incidência de doenças cardiovasculares, diabetes, certos tipos de cancro e doenças neurodegenerativas (Renna, Rinaldi e Gonnella, 2015).

Porém existe outra relação entre o alimento e a saúde, esta relativa a fatores externos ao alimento original e que põem em causa a segurança, qualidade e integridade do produto. Nesta última relação a segurança alimentar é a via ou designação usada para abordar a proteção dos alimentos. Note-se no entanto que o termo segurança alimentar pode ser entendido por duas vertentes, nomeadamente o de *food security* e *food safety*. O primeiro destes conceitos consiste na garantia da disponibilidade e acessibilidade de géneros alimentícios em quantidade e com valor nutritivo suficientes para suprimir as necessidades diárias da população e está normalmente garantido nos países desenvolvidos. Por outro lado, o conceito de *food safety* incide nas preocupações alimentares relativamente aos quais há uma obrigatoriedade de controlo por parte das autoridades oficiais, na medida em que os alimentos podem constituir um perigo real para o consumidor (Hanning et al., 2012). Contudo, em segurança alimentar estas duas vertentes devem estar interligadas. Na Figura 1 encontra-se representada de forma esquemática as principais diferenças entre *food safety* e *food security*.

Em conclusão, pode-se definir um alimento seguro quando existe a perceção que ele não constitui perigo para o consumidor e/ou quando é preparado, consumido ou utilizado em conformidade com a informações das autoridades competentes (Machado, 2011).

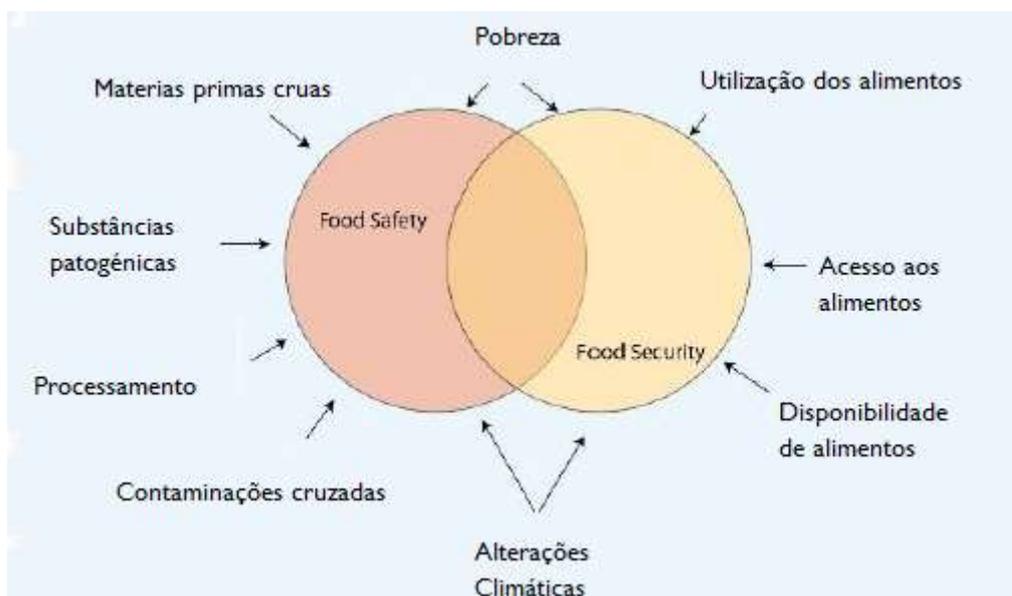


Figura 1: Diferenças entre Food Safety e Food security (adaptado de Hanning, et al., (2012)).

A necessidade de controlar e minimizar a ocorrência dos perigos originou a criação de vários mecanismos com vista à caracterização do problema de determinado alimento na cadeia alimentar (produção, processamento, transporte ou armazenamento) (Figura 2) (Mariano e Monteiro, 2015). Entre os quais pode destacar-se o reforço dos pré-requisitos de higienização, a análise de risco, a análise de perigos e dos pontos críticos de controlo (HACCP), que permitem identificar, prever, precaver e avaliar o perigo (Jevsnick, Hlebec e Raspor, 2008). Destaca-se ainda o plano nacional de colheitas de amostras (PNCA) que permite registar a (in)conformidade das normas a aplicar nas amostras e o sistema de alerta rápido para géneros alimentares e alimentos animais (RASFF), que permite comunicar os riscos entre autoridades competentes de vários países de forma rápida e eficaz. Adicionalmente a rastreabilidade permite identificar a origem do risco e corrigi-lo (Jevsnick, Hlebec e Raspor, 2008) (Regulamento (CE) n° 178/2002).



Figura 2: Cadeia alimentar "do Prado para o Prato" (adaptado CDC (2011)).

Uma vez que a alimentação se tornou num mundo global próprio, é hoje possível adquirir géneros alimentares de qualquer parte do mundo com relativa facilidade. Esta “abertura de fronteiras” requer critérios e padrões que devem ser seguidos para se evitarem crises do foro alimentar. Existem assim elevados padrões de segurança internacionais instaurados e que aproximam os países e suas legislações, numa tentativa de criar normas uniformes. Os padrões são definidos pelo *Codex Alimentarius*, criado pela comissão *Codex Alimentarius* e integrado pela união europeia (membro organizador), organização mundial de saúde (OMS), organização da agricultura e alimentação das nações unidas (FAO) e outros países membros. Efetivamente, só através da união entre países é possível garantir um elevado nível de proteção da vida e da saúde humana. Como exemplo disso mesmo destaca-se a legislação e cooperação aplicada nos países da união europeia (*Codex Alimentarius*, 2015).

1.2.2 Enquadramento legal europeu na segurança dos géneros alimentícios

O grande impacto da segurança alimentar na europa surgiu com a criação do regulamento (CE) nº 178/2002 de 28 de Janeiro de 2002. Esta legislação teve por base o controlo oficial dos géneros alimentícios dos estados membros através da determinação de normas e princípios gerais da legislação alimentar, criação da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios, com o principal objetivo de garantir um elevado nível de proteção da vida e da saúde humanas. Adicionalmente surgiram outros regulamentos complementares ao

178/2002. Entre os quais, o regulamento (CE) n° 852/2004 relativo à higiene dos produtos alimentares, o regulamento (CE) n° 853/2004 mais específico relativamente a higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, o regulamento (CE) n° 854/2004 identifica controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais, e o regulamento (CE) n° 882/2004 relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. No global, estas medidas obrigaram cada país da comunidade europeia a reformar e a criar as suas próprias autoridades nacionais segundo estas normas. Em Portugal a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) foi fundada no ano de 2005 com o intuito de responder a estas necessidades.

Após estas medidas centrais, seguiram-se ainda renovações de regulamentos antigos e formação de novos regulamentos relativos a cada género e processos alimentares em particular. Neste trabalho destacam-se os seguintes:

Regulamento (CE) n° 1129/2011 relativo a aditivos alimentares., que altera o regulamento (CE) n° 1333/2008 e suas alterações.

Regulamento (CE) n° 450/2009, relativo aos materiais e objetos ativos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos.

Regulamento (CE) n° 1441/2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, que altera o regulamento (CE) n° 2073/2005 e suas alterações.

Regulamento (CE) n° 396/2005 que altera a diretiva 91/414/CEE do Conselho, relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal.

1.2.3 Deterioração dos alimentos

Os alimentos enquanto substâncias orgânicas tendem a degradar-se naturalmente com o tempo. Assim a deterioração pode ser definida quando o alimento deixa de ser consumível. Normalmente é definido um tempo de vida útil que consoante o tipo de produto, é designado de data de durabilidade mínima (produto pode ser consumido depois) ou data limite de consumo (quando existe risco se consumido após a data definida). Porém o

alimento pode estar deteriorado e não ser perceptível ao consumidor e causar problemas de saúde e até ser uma causa de mortalidade (Kilcast e Subramaniam, 2000). Adicionalmente regista-se também o impacto económico da deterioração alimentar como mais um fator negativo (Bajpai, Rahman e Kang, 2008) (Montarjemi et al., 1995).

As interações entre o alimento, e o alimento e o meio envolvente, condicionam a maior ou menor deterioração do produto. Por outras palavras, associado ao alimento existem fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam o seu tempo de vida. Podem-se referir como fatores intrínsecos os nutrientes ou constituintes do produto, designadamente a sua percentagem de água (atividade de água), microflora natural, ingredientes/condimentos adicionados, pH e acidez. Por sua vez como fatores extrínsecos destacam-se a temperatura, luz, humidade, microflora ambiental, manipulação, tratamento térmico e composição da atmosfera onde o produto se insere (Kilcast e Subramaniam, 2000).

Neste ecossistema alimentar, estas interações podem promover o desenvolvimento de processos deteriorativos, que se estendem por três categorias principais: a deterioração física, química ou biológica (Kilcast e Subramaniam, 2000). Apesar de a deterioração física ser a que tem menor impacto ao nível da deterioração, esta não deve ser desprezada (Zheng et al., 2013). Nela incluem-se possíveis ameaças à integridade do alimento e que potenciam contaminações biológicas e químicas. Naturalmente, os processos de deterioração química estão associados à oxidação dos constituintes dos alimentos, enquanto a componente biológica é referente à ação microbiana (bactérias, vírus e parasitas) que se desenvolve. Estes fatores isolados ou em conjunto podem originar mudanças significativas ao nível físico-químico, tais como a alteração da cor, sabor, textura e ou produção de odores e aromas desagradáveis (Zheng et al., 2013). Contudo, deve realçar-se que se o desenvolvimento microbiano for patogénico, este pode constituir um perigo real para a saúde humana, uma vez que as alterações bioquímicas no alimento podem não ser perceptíveis aquando da refeição (Mohareb et al., 2015).

De forma a contrariar este problema, o Homem criou vários métodos de conservação capazes de aumentar o prazo de vida útil dos produtos. Contudo estes métodos apenas atrasam a deterioração dos alimentos, uma vez que existe sempre a tendência natural da sua degradação. Para além disso, é importante realçar que a ação do Homem no processamento alimentar poderá acelerar este processo caso não sejam mantidas as boas práticas adaptadas

a cada alimento, nas diversas etapas desde o campo até ao prato (Jayasena e Jo, 2013) (Sanches-Silva et al., 2014).

Nesta necessidade de adaptação o Homem foi correspondendo às necessidades numa constante renovação de métodos e técnicas preservativas capazes de fazer face aos processos deteriorativos dos alimentos (Sanches-Silva et al., 2014). Destes métodos indicam-se a refrigeração, a congelação, a redução da atividade de água, a restrição de nutrientes, as fermentações, a modificação do pH e pasteurizações e, mais recentemente, a utilização de agentes antimicrobianos e antioxidantes sintéticos/químicos, a irradiação, o embalamento a vácuo e/ou atmosfera modificada, embalagens e revestimentos ativos e inteligentes e por fim a engenharia genética (Kilcast e Subramaniam, 2000) (Negi, 2012).

Numa reflexão global cerca de 25% de toda a comida no mundo produzida (após colheita e *post mortem*, no caso animal) é deteriorada através da ação microbiana (Gram et al., 2002). Por exemplo nos alimentos cárneos, cerca de um quarto ou mesmo um terço da produção mundial é efetivamente deteriorada (Oussalah et al., 2004).

1.2.4 Alimentos cárneos

Segundo o regulamento (UE) nº 1129/2011 os alimentos cárneos podem dividir-se em dois grupos: I) as carnes processadas/transformadas e II) as carnes não transformadas. O primeiro grupo engloba, entre outros, os enchidos e os produtos curados. Já o último grupo engloba as carnes frescas e preparados de carne fresca, tais como as salsichas frescas e carnes picadas.

Apesar da divisão, ambos os grupos enquanto alimentos cárneos possuem características que os tornam suscetíveis à deterioração biológica e química. Estas características devem-se à própria composição, englobando as proteínas, lípidos, minerais e também uma pequena percentagem de hidrato de carbono. Para além disso, existem ainda fatores externos que podem estar associados à perda de qualidade das carnes. (Regulamento (CE) nº 1129/2011)

Neste contexto, torna-se crucial o uso de aditivos para controle de processos deteriorativos dos produtos cárneos. Note-se no entanto que o uso de conservantes e antioxidantes químicos ocorre mais frequentemente em produtos cárneos transformados, embora exista regulamentação para o uso de aditivos nos outros produtos cárneos. (Regulamento (CE) nº 1129/2011)

1.2.4.1 Enchidos e produtos cárneos curados

Segundo o regulamento (CE) n.º 853/2004, os enchidos são produtos cárneos pertencentes ao grupo dos preparados à base de carne, os quais se definem como produtos transformados resultantes da transformação da carne ou da anterior transformação desses produtos transformados, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca (Laranjo et al., 2015). Contudo, a designação mundial destes produtos centra-se no termo “salsicharia”, que engloba os enchidos e todos os produtos de transformação cárnea (Mendes, 2013).

Pensa-se que a origem dos enchidos está relacionada com a necessidade de conservação da carne, que assim era picada, adicionada às tripas dos animais (utilizados como invólucros) e depois passava por processos de maturação e cura (fumagem), originando um dos mais antigos produtos alimentares processados. Essa receita foi passando de geração em geração e devido às características organolépticas e nutricionais, hoje reconhece-se a qualidade dos produtos (Mendes, 2013) (Silva, 2012).

Para além disso, os enchidos são produtos que caracterizam regiões ou mesmo países, nomeadamente os países da região mediterrânea (Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia), onde existe uma forte tradição na sua elaboração (Laranjo et al., 2015). Nessas zonas, os enchidos representam mesmo uma componente económica importante. Em Portugal, principalmente no interior norte do País (Trás-os-Montes) encontra-se uma grande variedade de enchidos tradicionais portugueses (Silva, 2012). Naturalmente, surgiram estratégias de valorização comercial dos produtos tradicionais, através da certificação e consequente atribuição das marcas: Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG) (Mendes, 2013).

A segurança alimentar dos enchidos e produtos cárneos fumados está relacionada com o processo de cura. A cura de carnes é um procedimento que tem por finalidade conservar a carne por um período de tempo mais longo, além de lhe conferir determinadas qualidades sensoriais, como sabor e aroma mais agradáveis e coloração vermelha mais atraente (Mendes, 2013).

Em Portugal, para uma parte dos produtos, pode-se dizer que a cura está diretamente relacionada com o processo tradicional de fumagem, que é um método capaz de alterar sensorialmente os enchidos e conferir propriedades conservantes e antioxidantes através da

queima de madeira. Pode-se referir a alheira como exemplo. Contudo em alguns casos, devido à variedade de produtos e métodos de produção, para além da fumagem existe a necessidade de adicionar agentes de cura nos enchidos e produtos cárneos fumados (exemplo: chouriço, salpicão, paio, presunto) (Anónimo) (Mendes, 2013). Estes agentes de cura, os nitritos e os nitratos, são sais capazes de combater eficazmente o aparecimento de bactérias e esporos patogénicos (*C. botulinum*) e também de alterar sensorialmente o produto. No entanto a cura com estes agentes apresenta restrições de utilização, numa medida preventiva a favor do consumidor, devido às possíveis consequências na saúde abordados no decurso do trabalho, no ponto 1.2.5.2.2. (Mendes, 2013).

1.2.5 Perigos Alimentares

Casos de doença ou de mal-estar relacionados com a ingestão de alimentos ocorrem em todos os países e a todo o instante, mesmo nos países desenvolvidos. O número exato destes casos é no entanto impossível de determinar uma vez que mesmo sendo um problema de grande dimensão, nem sempre é reportado. No entanto, segundo dados de 2011 do centro de controlo e prevenção de doenças (CDC), cerca de 48 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América ficaram doentes devido a ingestão de comida imprópria. Destes, cerca de 128 mil necessitaram de cuidados de saúde hospitalar e 3 mil acabaram por falecer. Ainda, segundo a recente campanha da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 2 milhões de pessoas morrem todos os anos devido à ingestão de alimentos contaminados, referindo-se à contaminação por bactérias, vírus, parasitas e por substâncias químicas como as principais causas de morte (OMS, 2015a).

Estes factos realçam a existência de um fator de risco associado a cada refeição, como consequência da existência de um perigo no alimento. Assim define-se o risco como a probabilidade de um efeito nocivo ocorrer e a respetiva gravidade do mesmo. Enquanto o conceito de perigo relaciona-se com a presença de qualquer agente de natureza biológica, química ou física nos alimentos com potencialidade de causar efeitos negativos na saúde (Hilário, 2011) (OMS, 2008) (Regulamento (CE) nº 178/2002). Contudo é importante realçar que os valores nutricionais dos produtos também podem constituir um perigo para a saúde, como são os casos de um excesso de sal, gorduras, açúcares e a presença de alérgenos (ASAE, 2015). Neste ponto de vista a caracterização do alimento na embalagem, através da rotulagem, é fundamental para que o consumidor tenha liberdade de escolha e em consciência (Bieberstein e Roosen, 2015).

Por último é importante referir que as escolhas dos alimentos e as práticas de segurança são afetadas pela perceção do risco dos consumidores. Desta forma as doenças alimentares são também influenciadas pela informação e aptidão que as pessoas possuem aos diversos alimentos e crenças (Bieberstein e Roosen, 2015).

1.2.5.1 Perigos biológicos

Qualquer alimento pode ser uma matriz suscetível de desenvolver todo o tipo de microrganismos, contudo deve-se entender por perigo biológico a proliferação de microrganismos patogénicos nos alimentos. Na verdade, a deterioração alimentar via microbiana é normalmente detetada pela presença de odores e outras alterações bioquímicas e sensoriais que previnem o seu consumo, mesmo quando essa deterioração apenas representa uma perda na qualidade nutricional do produto sem constituir perigo para o consumidor (Mohareb et al., 2015). No entanto, outros microrganismos, afetando ou não aquelas características, poderão beneficiar o desenvolvimento de microrganismos patogénicos ou levar à produção de toxinas, transformando-os em produtos perigosos para a saúde. Este perigo deve-se à possível ação inócua do ponto de vista sensorial, que torna difícil detetar a presença do agente patogénico no alimento e possibilita assim ingestão e posteriores sintomas (McCarthy et al., 2001) (Mohareb et al., 2015).

Do ponto de vista patogénico devem considerar-se 2 vias de ação: 1) infeção alimentar e 2) intoxicação alimentar. A infeção alimentar é referente ao desenvolvimento microbiano no alimento, servindo este de veículo de transmissão microbiana. Por outro lado, a intoxicação alimentar é caracterizada pela existência de produção de toxinas causadoras de enfermidade, para além do desenvolvimento microbiano no alimento (Hilário, 2011).

De entre as três naturezas de perigos referenciadas no tópico anterior (1.2.5), estima-se que o perigo biológico representa cerca de 90% das doenças transmitidas pelos alimentos. Este valor é realmente bastante elevado e justifica-se pela possibilidade dos microrganismos se desenvolverem naturalmente em qualquer etapa do processamento desde o “campo até ao prato”, pelo que o sistema de segurança deve estar bem estruturado ao nível das principais fontes de transmissão mais comuns: ambiente, matérias-primas e pessoal manipulador, de maneira a prevenir o maior número de casos (ASAE, 2015) (Hilário, 2011).

Os dados acima referidos englobam doenças transmitidas por bactérias, vírus e parasitas, no entanto salienta-se que de entre um grupo de mais de 250 géneros/tipos de bactérias, vírus e

parasitas, apenas um grupo restrito aparece com maior frequência nos alimentos (ASAE, 2015) (Hilário, 2011). O foco de ação principal destes microrganismos é a região intestinal, causando infecções entéricas (gastroenterites) caracterizadas com sintomas frequentes de diarreias, vômitos e dores abdominais, classificada como uma doença auto-limitante (Fhogartaigh e Dance, 2013). No entanto, cada agente patogénico tem o seu modelo de desenvolvimento específico, que pode evoluir com maior ou menor gravidade ao longo do tempo, caso não seja diagnosticado e tratado eficazmente. A predominância de cada agente variam naturalmente com a região geográfica e condições sanitárias dos países (Fhogartaigh e Dance, 2013).

Neste contexto, os dados do CDC referem que os vírus, nomeadamente os norovirus (58%), lideram o grupo de agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos, seguidos das bactérias *Salmonella spp.* (11%), *Clostridium perfringens* (10%), *Campylobacter spp.* (9%) e *S. aureus* (3%). De entre estas causas, a infeção por *Salmonella spp.* é a que se encontra associada a maior percentagem de hospitalizações e de mortes (ANEXO a; c respetivamente) (CDC, 2011). Numa recente publicação da OMS, estima-se que 22 diferentes formas de gastroenterites provocaram 582 milhões de casos de hospitalização em 2010, dos quais resultaram 351 mil mortes. Em paralelo ao estudo do CDC, também a OMS identificou mais mortes associadas a infeções por *Salmonella typhimutium* (58 mil mortes), seguido da *Escherichia coli* (37mil mortes) e norovirus (35 mil mortes) (WHO, 2015b). Globalmente, estes dados permitem destacar as bactérias e os vírus como principais agentes infecciosos nos alimentos na atualidade. No entanto, não deve ser desprezada a ocorrência de outras estirpes, bem como o desenvolvimento de parasitas. Em anexo encontra-se informação mais detalhada sobre este tópico (ANEXOS c; d; e) (CDC, 2011).

1.2.5.1.1 Bactérias

As bactérias são seres unicelulares que facilmente se multiplicam quando possuem condições favoráveis ao seu desenvolvimento, sendo os alimentos potencialmente indicados para este desenvolvimento. Na Tabela I encontra-se representado a relação entre as bactérias e as doenças alimentares, associadas aos respetivos alimentos. (ASAE, 2015).

Tabela 1: Bactérias e respetivos alimentos associados a doenças de origem alimentar.

Bactérias Implicadas em Doenças de Origem Alimentar*		
Género	Espécies	Alimentos frequentemente associados.
<u>Bacillus</u>	<i>B. cereus</i>	Arroz, cereais, pratos de carne, vegetais; alimentos que tenham tido contacto com o solo ou com pó.
<u>Brucella</u>		Leite cru e derivados de animais contaminados.
<u>Campylobacter</u>	<i>C. jejuni</i>	Alimentos proteicos crus ou pouco cozinhados (<i>Gallus gallus</i> - galináceos); laticínios.
<u>Clostridium</u>	<i>C. botulinum</i>	Carnes insuficientemente curadas ou sem conservantes; conservas caseiras de carnes ou vegetais.
	<i>C. perfringens</i>	Alimentos sujeitos a manejo inadequado; refrigeração lenta ou aquecido a baixa temperatura.
<u>Escherichia</u>	<i>E. coli</i>	Água ou alimentos com contaminação fecal.
<u>Listeria</u>	<i>L. monocytogenes</i>	Leite, derivados do leite e saladas.
<u>Salmonella</u>	<i>S. Enteritidis</i> <i>S. typhimurium</i>	Frango, pato, peru e ovos.
	<i>S. typhimurium</i> <i>S. paratyphi</i>	Água.
<u>Shigella</u>	<i>S. dysenteriae</i>	Saladas, leite, aves, produtos hortícolas.
<u>Staphylococcus</u>	<i>S. aureus</i>	Carne, leite, ovos e derivados; alimentos sujeitos a manipulação; alimentos ricos em proteína e água.
<u>Streptococcus</u>	<i>S. pyogenes</i>	Leite cru, gelados, saladas, mariscos.
<u>Vibrio</u>	<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>	Peixe, marisco e moluscos crus ou insuficientemente cozinhados.
<u>Yersinia</u>	<i>Y. enterocolitica</i>	Leite cru, aves, carnes, mariscos, vegetais.

* Adaptado de ASAE (2015).

Em relação a alimentos cárneos, as principais bactérias causadoras de doenças derivadas por ingestão destes produtos são a *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*,

Staphylococcus aureus, *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* (ASAE, 2015) (Oussalah et al., 2004) (Ramos et al., 2014). Note-se que associado aos alimentos cárneos encontram-se bactérias com elevada percentagem de casos de hospitalizações e até mortes (Anexo a; b; c), pelo que o intuito de controlar o seu desenvolvimento é uma prioridade.

1.2.5.1.2 Vírus

Os vírus são agentes infecciosos de tamanho inferior ao das bactérias. Estes são constituídos por uma cápsula proteica ou cápside que envolve o genoma (ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA)), podendo ou não apresentar uma outra camada a envolver o cápside (envelope). Ao contrário das bactérias, os vírus necessitam de células vivas para se desenvolverem e por isso, uma vez nos alimentos, não se multiplicam mas também não se desativam, a não ser que sejam tratados adequadamente com temperatura (confeção) (ASAE, 2015) (Luxo, 2014).

A relação entre vírus e doenças de origem alimentar coloca o norovirus como principal vírus transmissor de doença, nomeadamente a gastroenterite. A sua transmissão deve-se ao consumo de água, gotículas ou aerossóis contaminados, transmitidos por pessoas infetadas e que contaminam os alimentos (Luxo, 2014). Esta via de transmissão é semelhante para o caso de astrovírus e rotavírus, mas a sua ação infetante é mais direcionada para crianças e pessoas com imunidade reduzida. A transmissão dos vírus das hepatites E e A está também associada ao consumo e uso de água contaminada e no caso particular da Hepatite A a transmissão está também muitas vezes associada à ingestão de alimentos específicos, como a de marisco crú e algumas saladas. No entanto, a sua transmissão através das carnes não constitui um motivo de preocupação específico (Luxo, 2014).

O número de casos de doença por vírus nos EUA encontra-se representado em Anexo d (CDC, 2011).

1.2.5.1.3 Parasitas e protozoários

O terceiro agente infeccioso de carácter biológico são os parasitas (incluindo os protozoários). Estes seres necessitam de outro organismo (hospedeiro definitivo e/ou intermediário) para sobreviverem e se multiplicarem, prejudicando assim o hospedeiro (Sousa, 2014). Em relação às bactérias e vírus, os parasitas contribuem com menor percentagem de doenças transmitidas pelos alimentos, no entanto podem ocorrer e causar graves consequências no Homem (ASAE, 2015).

Os parasitas podem ser transmitidos pelo contacto direto pessoa-pessoa e animal-pessoa ou através da ingestão de alimentos contaminados durante o ciclo de vida parasitário: hospedeiro – vector/reservatório – hospedeiro. A invasão ocorre ainda numa fase embrionária ou “larval”, desenvolvendo-se posteriormente no organismo do hospedeiro infetado (Sousa, 2014). As espécies de parasitas que mais frequentemente se encontram nos alimentos são as de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* (protozoários) e *Cyclospora cayetanensis*, que normalmente são transmitidos pela água e alimentos contaminados (normalmente crus); as de *Trichinella spiralis*, *Taenia saginata*, *Taenia solium* e *Toxoplasma gondii*, cuja transmissão é efetuada através de carnes e *Anikasis simplex* e *Diphyllobothrium latum*, habitualmente transmitido através do consumo de peixes (ASAE, 2015) (CDC, 2011) (Sousa, 2014). No anexo E encontram-se discriminada as espécies de parasitas relatados nos EUA. Devido a uma potencial presença de alguns parasitas nas carnes, os modernos sistemas de produção alimentar têm incorporados mecanismos que reduzem ou impedem a exposição a certos tipos de parasitas (Gamble, 2015).

1.2.5.2 Perigos químicos

Os alimentos estão intimamente associados à presença de compostos ou resíduos químicos. Muitos destes químicos foram introduzidos na cadeia alimentar intencionalmente pelo Homem como uma função tecnológica, mas também existem resíduos que se fixam nos alimentos por motivos que lhe são alheios. Efetivamente, estes perigos podem por exemplo ter uma origem natural, como sendo o de desenvolvimento de fungos que produzem toxinas, normalmente designadas de micotoxinas (Anexo F) e que contaminam os alimentos. Adicionalmente, para além das micotoxinas pode-se destacar ainda nos alimentos resíduos de medicamentos, desinfetantes, aditivos alimentares, adubos, pesticidas, metais pesados, poluentes industriais, ambientais e domésticos (ASAE 2015) (García-Cela, Ramos e Marin, 2012) (Nova e González-Schnake, 2014).

Normalmente o tipo de ação toxicológica destes tipos de perigos são associados a uma toxicidade crónica, mas dependendo da quantidade presente, poderá conferir toxicidade aguda como é verificado nos casos de perigos biológicos (García-Cela, Ramos e Marin, 2012). Para além disto, os efeitos tóxicos são geralmente semelhantes de pessoa para pessoa, embora a sensibilidade individual à sua exposição possa ser diferente (García-Cela, Ramos e Marin, 2012).

Ao contrário dos perigos biológicos, a origem dos perigos químicos no alimento é mais ou menos previsível. Estes perigos estão normalmente ligados aos alimentos na primeira fase do processamento, ainda como matérias-primas ou ingredientes, ou através de certas etapas do processamento em que são adicionados intencionalmente estes produtos químicos (García-Cela, Ramos e Marin, 2012). Após o contato com alimento, o poder de ação ou perigosidade ao longo do tempo não sofre alterações significativas, o que é também oposto ao que acontece na presença de perigo microbiológico, uma vez que os microrganismos podem-se multiplicar e desenvolver toxinas (Berlin e Anker, 2013).

Importante referir que muitos destes compostos apresentam grande estabilidade à degradação e metabolização via físico-química, microbiológica e biológica, pelo que podem permanecer na cadeia alimentar, no sol, ar, água e mesmo no interior do organismo durante muito tempo. Nos organismos dos animais, os lípidos são os locais privilegiados para armazenamento de agentes de perigo químico, devido às características lipofílicas dos compostos (ASAE, 2015) (Berlin e Anker, 2013).

De facto, é importante realçar que a evolução da agricultura, indústria e civilização foi efetuada sem salvaguarda dos interesses ambientais e o resultado das décadas de uso destes químicos nas mais variadas ações humanas originou problemas ambientais severos que começaram a afetar os animais e humanos. Mas só em 1962, nos Estados Unidos da América foi dado o primeiro sinal de alerta através da publicação de Rachel Carson's, "Silent Spring" (silêncio da primavera), que relatava os efeitos de desregulação endócrina que os contaminantes químicos provocavam nos animais (Berlin e Anker, 2013) (Rasmussen, 1996).

Na Europa, para assegurar que os pesticidas e outros produtos químicos não causem problemas de saúde nos consumidores, animais e trabalhadores que os aplicam, as condições de uso são regulamentadas tal como as boas práticas agrícolas (BPA). Todavia cada produto sofre avaliações dos potenciais riscos para a saúde do consumidor e para o ecossistema. Assim, a regulamentação da utilização destes produtos é complementada pela definição dos Limites Máximos de Resíduos (LMRs), limite máximo legal de concentração de um resíduo de produtos químicos no interior ou à superfície de géneros alimentícios ou alimentos para animais, fixado nos termos do presente regulamento (CE) n° 396/2005, com base nas BPA (ASAE, 2015) (Grabowski et al., 2012).

Estão também estabelecidos os valores limite de consumo humano para os aditivos e os resíduos de contaminantes químicos, abaixo dos quais o risco para a saúde é ínfimo, vulgarmente designado por ingestão diária aceitável (ADI). Estes valores são estabelecidos recorrendo à análise de risco, nomeadamente avaliação do risco constituída por quatro etapas: 1) Identificação do perigo; 2) caracterização do perigo; 3) avaliação da exposição e 4) caracterização do risco (Figura 3) (ASAE, 2015) (Grabowski et al., 2012) (Maclachlan e Mueller, 2012).

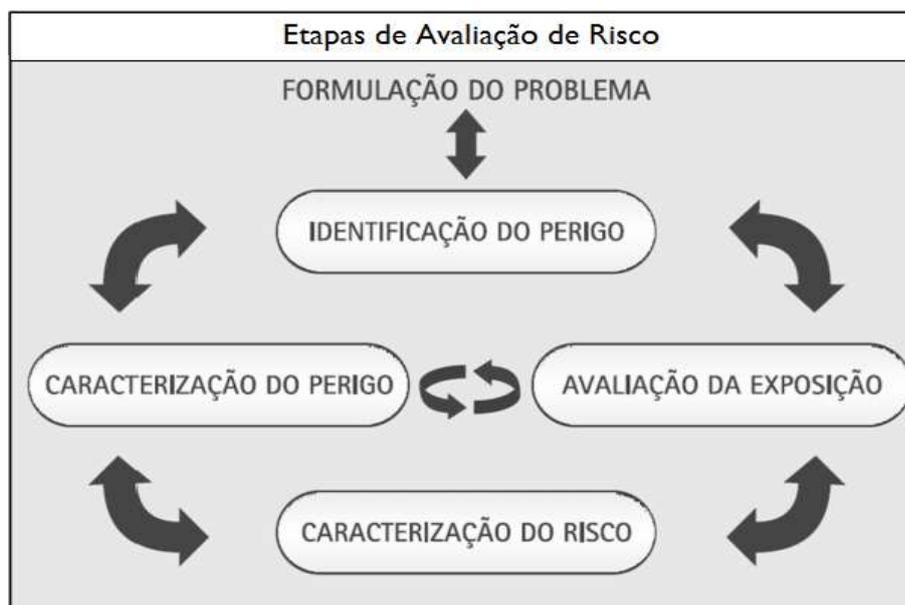


Figura 3: Etapas de Avaliação de Risco (adaptado de OMS (2015)).

1.2.5.2.1 Aditivos alimentares

Segundo o regulamento (CE) N°1333/2008, os aditivos são definidos como “qualquer substância não consumida habitualmente como género alimentício em si mesma e habitualmente não utilizada como ingrediente característico dos géneros alimentícios, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição é intencional aos géneros alimentícios. Possui um objetivo tecnológico na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios”. Neste contexto, os aditivos alimentares são adicionados aos alimentos por forma a desempenharem determinadas funções que podem ser classificadas em 3 grupos: 1) tecnológicas; 2) organoléticas e 3) nutricionais.

O grupo dos aditivos tecnológicos é constituído por: a) conservantes, que são substâncias adicionadas aos alimentos para prolongarem o seu período de duração, geralmente impedindo o crescimento de bactérias e fungos. O uso de conservantes permite reduzir ou mesmo evitar riscos associados a contaminação microbiológica patogénica; b) antioxidantes, que são adicionados aos alimentos para impedir a alteração dos alimentos causada pela degradação dos óleos, gorduras e algumas vitaminas em contacto com o ar, contribuindo para aumentar a sua durabilidade. Podem também acrescentar características funcionais aos alimentos; c) conjunto de emulsionantes, estabilizantes, espessantes, aglutinantes e gelificantes, que são adicionados aos alimentos para modificar a sua textura ou a sua consistência; d) outros aditivos tecnológicos que são intencionalmente utilizados na transformação das matérias-primas, dos géneros alimentícios ou dos seus ingredientes, para atingir determinado objetivo tecnológico (ASAE, 2015) (Carocho, Morales e Ferreira, 2015) (Regulamento (CE) N°1333/2008).

Nos aditivos organoléticos destacam-se os: a) edulcorantes, que são substâncias adicionadas aos alimentos para adoçar. Esta família de aditivos inclui os que são utilizados em substituição do açúcar, e os que são comercializados como edulcorantes de mesa; b) corantes, os quais são substâncias que conferem ou restituem cor a um género alimentício. Este grupo de aditivos inclui componentes naturais de alimentos e substâncias naturais, que normalmente não são consumidos como géneros alimentícios em si mesmos nem utilizados como ingredientes característicos dos produtos alimentares (ASAE, 2015) (Carocho, Morales e Ferreira, 2015) (Regulamento (CE) N°1333/2008).

Por fim, os aditivos nutricionais, tais como vitaminas, pró-vitaminas, aminoácidos, oligoelementos, são adicionados aos alimentos para lhes acrescentar características funcionais (ASAE, 2015) (Carocho, Morales e Ferreira, 2015) (Regulamento (CE) N°1333/2008).

1.2.5.2.2 Agentes antimicrobianos e antioxidantes nos produtos cárneos curados

As carnes processadas/transformadas enquadram-se nos géneros alimentícios dos quais a adição de conservantes e antioxidantes sintéticos constitui uma função tecnológica importante na segurança alimentar (Regulamento (CE) N°1129/2011). De entre os aditivos alimentares de síntese usados nos produtos cárneos destacam-se os conservantes nitrito de potássio (E 249), nitrito de sódio (E 250), nitrato de sódio (E 251) e nitrato de potássio (E

252) e os antioxidantes butil-hidroxianisolo (BHA) (E 320) e butil-hidroxitolueno (BHT) (E 321) (Regulamento (CE), N° 1129/2011).

Os nitratos e nitritos incluem-se no grupo dos aditivos utilizados nos enchidos e produtos curados, designando-se por agentes de cura. A adição destes sais tem como objetivo criar um meio seletivo que impeça o desenvolvimento de bactérias decompositoras e patogénicas destes produtos, destacando-se a inibição do *Clostridium botulinum*, que é responsável pela criação de toxinas desencadeadoras do botulismo. Para além disto, estes aditivos são capazes de funcionar como antioxidantes e minimizar, ou mesmo prevenir a formação de ranço nos produtos num determinado período de tempo. Adicionalmente, estes sais conseguem interferir no pigmento da carne, a mioglobina, através de uma reação com iões dos sais e assim controlar e manter uma cor vermelha-viva da carne (Hilário, 2011) (Sindelar e Milkwski, 2012).

As principais desvantagens associadas à utilização destes agentes de cura são essencialmente associadas à toxicidade atribuída ao nitrito que, ao ligar-se à hemoglobina do sangue de uma forma semelhante à que faz com a mioglobina da carne, forma metahemoglobina, a qual é incapaz de transportar oxigénio. Para além disso, existe ainda a possibilidade de formação de nitrosaminas (agentes cancerígenos), por reação de sais de nitrito com as proteínas durante a confeção dos produtos alimentares a elevadas temperaturas ou na passagem pelo estômago durante o processo digestivo (ASAE 2015) (Hilário, 2011) (Sindelar e Milkwski, 2012).

A adição de nitritos em produtos cárneos é efetuada sempre com a referência do teor máximo de resíduo no produto final, fixado entre 10 – 180 mg/kg de carne (dependendo do produto), enquanto os nitratos podem ser adicionados em quantidade superior, tendo em consideração o intervalo de resíduos permitido de 250 – 300 mg/kg de carne. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de que os problemas de saúde são normalmente associados aos nitritos e que, apesar de os nitratos serem precursores dos nitritos aquando do contacto com enzimas da boca e estômago, nem todos os nitratos se convertem em nitrito (Butler, 2015) (Regulamento (CE), n° 1129/2011).

Por outro lado, os antioxidantes BHA e BHT são essencialmente utilizados em carnes processadas para prevenção de reações de oxidação que surgem pelo contacto com o oxigénio e pelas temperaturas elevadas por vezes utilizadas nas etapas de processamento das

mesmas. A sua utilização está limitada a um limite máximo de resíduos 200 mg/kg de carne (Regulamento (CE), nº 1129/2011).

1.2.5.2.3 Controvérsia do uso de aditivos sintéticos

Atualmente existe uma divisão de opiniões relativamente ao uso de aditivos sintéticos nos alimentos. Muitos têm sido os autores que defendem as suas preocupações, principalmente devido às atividades cancerígenas associadas aos aditivos sintéticos. Contudo, existem muitos outros tantos autores que afirmam não haver perigos para a saúde (Carocho e Ferreira, 2013). Devido a este fato, conhecer melhor as substâncias é essencial para ter conclusões mais fidedignas. Numa dessas tentativas, e com a obrigação de legislar, as autoridades competentes foram “forçadas” a acionar medidas preventivas e controladoras do uso destes compostos, numa medida cuidadosa e com base nas análises de risco, de forma a obter as ADI dos compostos (Carocho e Ferreira, 2013). Apesar disso, existem consumidores que optam por evitar produtos tratados com estes compostos e que optam por movimentos e estilos de vida saudáveis (Khan et al., 2011).

Assim, no global é possível afirmar que os consumidores possuem a noção de que a utilização de aditivos químicos nos produtos cárneos, como nos outros géneros alimentares, tem o benefício de melhorar a conservação, qualidade dos alimentos e prevenção de doenças alimentares graves, mas por outro lado possuem receios de que existam riscos para a saúde derivados do consumo excessivo de certos conservantes e antioxidantes de origem sintética.

Esta discussão teve o seu início em 1970, ano em que se realizou um debate político acerca dos nitritos, e como resultado quase eram banidos como agentes de cura. No entanto apenas se aplicaram medidas de controlo do seu uso pelas empresas, mas a contestação social foi crescendo, e um dos pontos que se apoiaram foi de não se ter considerado todas as fontes de nitritos passíveis de ingestão (Sindelar e Milkowski, 2012). De facto, este é um ponto de vista importante, pois segundo as medidas que foram tomadas a alimentação não foi considerada como um todo, mas apenas tendo em consideração os produtos curados. Por exemplo, no caso dos nitritos, é facilmente entendível que a dieta humana não é só afetada pelas concentrações que estão presentes nas carnes, mas sim em todos os alimentos que fazem parte da dieta dos indivíduos. Ainda, devido à aplicação de adubos nitrogenados nas culturas durante a produção, entre outras fontes, os produtos hortícolas tornaram-se na

principal fonte alimentar de nitritos e nitratos, seguindo-se a água e os produtos cárneos curados (ASAE, 2015) (Sindelar e Milkwski, 2012).

Concluindo, as pesquisas e estudos que associam os perigos de certos compostos e a dieta humana continuam, e certamente o debate de prós e contras da sua ingestão através dos alimentos vai prosseguir nos próximos anos, pelo que cabe ao consumidor e indústria escolher os seus produtos ou traçar outras escolhas e soluções (Sindelar e Milkwski, 2012).

1.2.5.3 Perigos físicos

Por fim os perigos físicos também devem ser considerados. Um perigo físico pode ser definido como qualquer objeto estranho ou matéria estranha num alimento e que pode causar doença ou lesão ao consumidor. Nesta categoria de perigos inclui-se um vasto conjunto de materiais, como exemplo podem-se identificar: fragmentos de metal, madeira ou vidro, ossos, agulhas, pedaços de embalagem do produto, pedras, insetos, objetos pessoais, ou qualquer outro material estranho não normalmente encontradas nos produtos alimentares. A origem destes materiais pode estar associada às matérias-primas, instalações e equipamentos mal conservados, processos de produção, práticas impróprias, má formação dos empregados, etc. Na tentativa de minimizar estes riscos físicos, e em semelhança aos homólogos perigos já abordados, deve-se realizar uma análise do risco e desenvolvimento de um plano HACCP para determinar, ou não, a severidade e a taxa de ocorrência desse risco/perigo e assim implementar um controle nesse ponto. Adicionalmente podem ser usados sistemas de controlo e deteção destes perigos, tais como detetores de metais e de ossos (raio-x), controlo de pestes e infestantes e implementação de sistemas de higiene, bem como a obtenção de certificações, matéria-prima inspecionada e manutenção dos equipamentos (Hilário, 2011) (UNL, 2005).

1.2.6 Potencial aplicação de plantas aromáticas

Desde há séculos o ser humano emprega plantas aromáticas para as suas atividades. Relatos e descrições deste uso remontam a anos “Antes de Cristo”(AC) no médio oriente, sendo o sabor e as propriedades conservante e medicinais as principais razões apontadas para a sua utilização. Obviamente, a composição química dessas plantas era desconhecida na altura, mas essa inexistência de informação tem vindo a ser invertida nas últimas décadas (Costa et al., 2015) (Bakkali et al., 2008).

Relativamente aos compostos presentes nas plantas, citam-se as proteínas, hidratos de carbono, ácidos gordos, fibras, vitaminas, minerais e as componentes bioativas, constituídos pelos compostos voláteis (óleos essenciais) e fitoquímicos (maioritariamente compostos fenólicos). Os compostos bioativos inserem-se nos metabolitos secundários que as plantas produzem e que ao contrário dos outros compostos referidos, os metabolitos primários, não aparentam ter funções metabólicas (Heldt e Piechulla, 2011). No entanto, a sua ação nas plantas poderá ser uma das seguintes: a) atracção de insectos polinizadores e outros animais benéficos; b) protecção contra alterações climatéricas; c) acção natural contra pragas, animais e microorganismos patogénicos (Heldt e Piechulla, 2011) (Pavela, 2015) ou d) protecção contra stress e radicais livres induzidos nas plantas (Costa et al., 2015).

Esta mixcelania de compostos é ubíquo nas plantas, mas os metabolitos secundários encontram-se com maior relevância nas plantas com características aromáticas e medicinais. Das cerca de 250 mil plantas superiores identificadas no planeta Terra, cerca de 80 mil possuem estas características, nomeadamente as angiospérmicas, entre as quais as espécies das famílias Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae e Asteraceae (Coelho, 2009) (Negi, 2012) (Pavela, 2015).

A distribuição dos compostos bioativos dos óleos essenciais (OEs) e dos compostos fenólicos (CFs) na planta não é uniforme. De facto, estes componentes são sintetizados e armazenados em glândulas em diferentes tecidos e órgãos (Burt, 2004) (Costa et al., 2015). Para além disso, a composição dos OEs e CFs é uma mistura e um equilíbrio entre constituintes, sendo uma característica única de cada espécie de planta. Apesar disso, é importante realçar que a composição destes compostos nas plantas da mesma espécie pode ainda ser afetada por acontecimentos (fatores bióticos e abióticos) que influenciem a produção e eficácia destes compostos bioativos, isto é, clima, radiação UV, geografia, stress das plantas, influência de outras espécies, estação do ano e respetiva fase de desenvolvimento da planta (ex. floração) na altura da colheita (Campos, Gerschenson e Flores, 2011) (Coelho, 2009) (Costa et al., 2015) (Embuscado, 2015).

Apesar desta instabilidade na composição dos compostos bioativos, muitos autores sugerem que estes compostos são responsáveis por diversas propriedades benéficas das plantas. Naturalmente, essas atividades são muitas vezes determinadas pelos constituintes bioativos maioritários da planta em questão. No entanto, os constituintes em menores percentagens podem ter uma ação sinérgica e por esse motivo a sua função bioativa não deve ser

desprezada (Campos, Gerschenson e Flores, 2011) (Pavela, 2015). De entre as muitas bioatividades atribuídas às plantas aromáticas e medicinais, destacam-se algumas como a antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antidiabética, que potenciam as plantas aromáticas para um nível superior de interesse. Efetivamente, estes efeitos benéficos na saúde incentivam a sua aplicação industrial em diversas áreas, como no desenvolvimento de fármacos e métodos medicinais, bem como o seu aproveitamento na indústria das fragrâncias, perfumaria, cosmética, na agricultura e na industrial alimentar, onde poderão ter um papel muito relevante na formulação de alimentos funcionais, mas também na conservação das propriedades nutricionais e funcionais dos alimentos (Costa et al., 2015) (Pavela, 2015).

De facto, a capacidade conservante de algumas plantas foi desde muito cedo reconhecida pelo Homem, que as utilizava nas confecções alimentares. Essa utilização foi caindo em desuso com a entrada na era industrial e a criação dos antioxidantes e conservantes sintéticos. No entanto, as crescentes dúvidas e receios na utilização de produtos sintéticos nos alimentos por parte dos consumidores impulsionam a procura de alternativas naturais para a conservação dos alimentos e impulsionam a reintrodução das plantas nesta área. Estas medidas passam pela adoção das plantas aromáticas ou os seus OEs e CFs isoladamente (Badawy e Abdelgaleil, 2014) (Costa et al., 2015) (Embuscado, 2015) (Pavela, 2015).

1.2.6.1 Óleos Essenciais de plantas aromáticas

Os OEs podem-se definir como soluções líquidas aromáticas constituídas por compostos voláteis que integram a planta, incluindo terpenos, terpenoides e compostos aromáticos (Anexo G) (Bakkali et al., 2008) (Campos, Gerschenson e Flores, 2011). Atualmente é estimado que existam mais de 3000 óleos essenciais, dos quais 300 têm importância comercial (Badawy e Abdelgaleil, 2014). Destes 300, 150 foram reconhecidos como seguros para o consumo humano sem limitações pela Administração dos Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (FDA) (Costa et al., 2015).

O facto de serem considerados seguros é um aspeto fundamental para que os OEs possam ser empregues na alimentação humana de forma a tirar partido das propriedades bioativas dos seus componentes, tais como as características antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiparasitas, (Bakkali et al., 2008) (Campos, Gerschenson e Flores, 2011) (Palmer, Stewart e Fyfe, 1998) (Seow, et al. 2014) e antioxidantes (Bakkali et al., 2008). Estas bioatividades são de facto de elevada importância no setor alimentar e em parte podem ser atribuídas à

atuação dos OEs ao nível da membrana celular dos microrganismos. Por exemplo, a natureza lipofílica das membranas das bactérias favorece a acumulação dos componentes lipofílicos do OEs na membrana celular, o que provoca a sua rutura com consequente perda de funções (Campos, Gerschenson e Flores, 2011).

Existem no entanto alguns entraves à aplicação industrial generalizada de OEs, entre as quais a sua instabilidade biológica e química, bem como a sua reduzida solubilidade em água (Campos, Gerschenson e Flores, 2011). Outro fator que se mostra como uma desvantagem é o baixo rendimento de extração dos OE das plantas (<1 %), que torna o processo de extração pouco rentável, encarecendo por isso esta matéria-prima. Note-se que a extração de OEs para fins comerciais é efetuada por destilação a vapor (Figura 3), embora existam atualmente outros métodos de extração desenvolvidos na tentativa de otimizar o processo (Pavela, 2015).

Apesar dos fatores acima mencionados, vários estudos científicos demonstram que a utilização de OEs nos alimentos confere grandes benefícios na prevenção da deterioração dos alimentos e doenças derivadas de organismos patogénicos, podendo mesmo ser utilizados como alternativa aos conservantes sintéticos (Bakkali et al., 2008) (Burt, 2004) (Seow, et al., 2014). Note-se no entanto que as concentrações de OEs necessárias para estes efeitos são muitas vezes elevadas, podendo alterar as características sensoriais dos alimentos e assim provocar efeitos repressores na sua utilização industrial (Campos, Gerschenson e Flores, 2011).

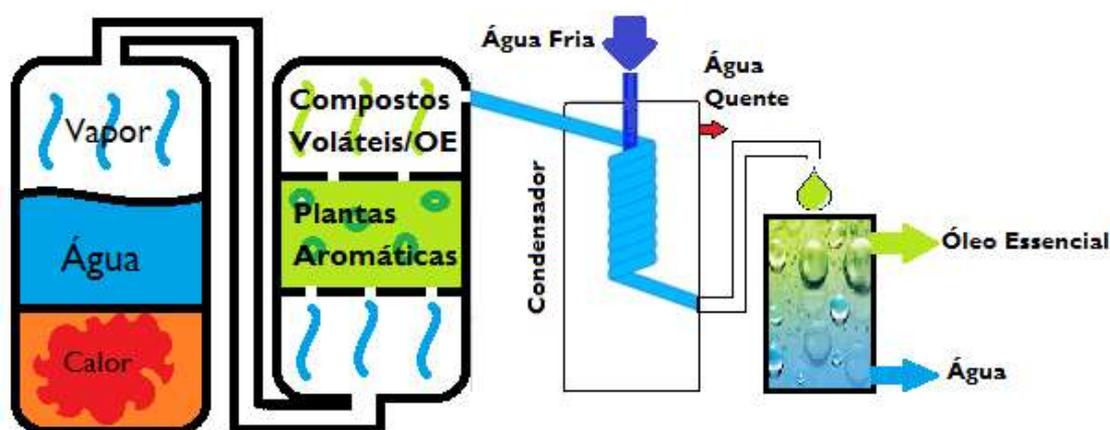


Figura 4: Exemplificação do método de extração dos óleos essenciais. (adaptado de Aleksic e Knezevic (2013)).

1.2.6.2 Compostos fenólicos das plantas aromáticas

Os CFs são outro grande grupo de fitoquímicos das plantas, dos quais se sobressaem os flavonóides como maior constituinte (Embuscado, 2015).

Comparativamente aos OEs, a extrações de CFs apresenta maiores rendimentos e não necessita de recorrer a uma logística de equipamentos tão desenvolvida. Um extrato enriquecido em compostos fenólicos pode por exemplo ser obtido através de uma extração com água, preferencialmente a quente. Apesar de os CFs serem solúveis em água, outros solventes como etanol, acetona e metanol podem também ser utilizados na sua extração, de forma a otimizar obtenção de alguns desses compostos (Costa et al., 2015).

Sem dúvida, a principal bioatividade atribuída aos CFs é a sua capacidade antioxidante (Costa et al., 2015) (Embuscado, 2015). Apesar disso, outras como a de capacidade antimicrobiana são também de grande importância (Bakkali et al., 2008). Estas atividades conferem a estes compostos grande potencialidade de aplicação na indústria alimentar, por exemplo no retardamento de deterioração dos alimentos.

1.2.7 Embalagens – materiais e objetos ativos e inteligentes

A embalagem é um componente essencial na indústria alimentar para que o alimento mantenha as suas características organolépticas, possua qualidade e seja seguro. Perante isto, Vanderroost et al. (2014) apresentou quatro tradicionais funções fundamentais das embalagens: a) proteção, através da função barreira que estabelece entre o alimento e a atmosfera, evitando possíveis contaminações e danos; b) comunicação, através da rotulagem, a embalagem transmite informações importantes sobre o produto alimentar contido e seu teor nutricional, bem como de orientações sobre a preparação; c) conveniência, permite aos consumidores desfrutar de comida, em sua conveniência, isto é, as embalagens alimentares podem ser projetadas para variados modos e estilos de vida; d) acondicionamento, que é a função mais básica da embalagem e que permite armazenar, transportar e manusear o produto. (Vanderroost et al., 2014)

A inovação e a inserção de tecnologias permite fazer “upgrades” às essências das embalagens de maneira a ir de encontro com as necessidades e desafios da comunidade moderna, que exige segurança, qualidade e rastreabilidade (Vanderroost et al., 2014). Hoje em dia existem já várias inovações que complementam ou até mesmo superam as embalagens tradicionais, sendo as embalagens com materiais ativos e inteligentes exemplos práticos e dinâmicos.

Segundo o regulamento (CE) n° 450/2009 as embalagens, materiais e objetos ativos destinam-se a alargar o prazo de validade dos alimentos, mantendo ou melhorando o estado dos alimentos embalados. São concebidas de forma a incorporar deliberadamente componentes que libertem substâncias para os alimentos embalados ou o ambiente que os envolve, ou que absorvam tais substâncias negativas desses alimentos ou do ambiente que os envolve. Enquanto as embalagens inteligentes são capazes de monitorizar o estado dos alimentos embalados ou do ambiente que envolve os alimentos (Realini e Marcos, 2014). O estado do alimento refere-se às propriedades sensoriais, de segurança e de qualidade (Pereira et al., 2014).

A contribuição da inovação deve abranger questões de sustentabilidade, visando o impacto negativo no ambiente através dos desperdícios alimentares e do descarte das embalagens de plástico e seus materiais e objectos não biodegradáveis (Vanderroost et al., 2014). Assim, materiais biodegradáveis bem como matrizes/polímeros edíveis começam a ser mais requisitados e estudados devido ao seu intuito ambiental (Silva et al., 2014). Neste contexto, os soluções edíveis e biofilmes têm vindo a ser muito estudados uma vez que para além da sua biodegradabilidade, podem incorporar substâncias ou componentes ativos (antimicrobianos e antioxidantes) naturais e assim constituírem um revestimento ativo, sendo atualmente perspetivados, não para substituir as embalagens, mas para se enquadrarem como um complemento activo e solução de futuro (Campos, Gerschenson e Flores, 2011) (Oussalah et al., 2004) (Ozdemir e Floros, 2001).

1.2.8 Biofilmes

Os biofilmes são estruturas formadas por material polimérico como agente estrutural (Yoshida e Antunes, 2004). Normalmente esses materiais biológicos são comestíveis e muitas vezes obtidos a partir de sub-produtos da indústria alimentar. Destes destacam-se proteínas (gelatina, caseína, albumina, glúten de trigo, proteínas de soro de leite, etc.) polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, etc.) lípidos (ceras e ésteres de ácido gordos, etc.) ou a combinação destes (Galus e Kadzinska, 2015a). Estes materiais necessitam de um agente plastificante para ultrapassar o problema na formação dos biofilmes (baixa humidade) que torna os biofilmes quebradiços e por essa

razão são normalmente adicionados plastificantes também edíveis, como o sorbitol e o glicerol (Yoshida e Antunes, 2004). +

Atualmente a aplicação dos biofilmes tem sido direcionada para os alimentos, numa medida de mitigar o impacto ambiental das embalagens alimentares (Silva, 2011) (Campos, Gerschenson e Flores, 2011), reduzir os custos das embalagens (Campos, Gerschenson e Flores, 2011), melhorar o tempo de vida dos produtos, reduzir o impacto da deterioração e opcionalmente ser uma alternativa aos aditivos sintéticos (Campos, Gerschenson e Flores, 2011) (Galus e Kadzinska, 2015b) (Ozdemir e Floros, 2001). Adicionalmente, no caso concreto dos biofilmes à base de proteína do soro do leite, aproveita-se um determinado sub-produto alimentar, da indústria dos laticínios, que seria desprezado e possivelmente constituiria a problema ambiental (Ozdemir e Floros, 2001). Para que o seu (re)aproveitamento seja possível, é necessário que os biofilmes providenciem boas características tecnológicas no que diz respeito à limitação da transferência de gases (ex. O₂), resistência mecânica e alongação, incorporação de compostos ativos naturais, (p.e. antioxidantes, antimicrobianos), retardamento da migração de óleos e gorduras na matriz, retenção de componentes voláteis (odores) dos alimentos, e prevenção da permeabilidade à humidade (Galus e Kadzinska, 2015b) (Ozdemir e Floros, 2001) (Yoshida e Antunes, 2004).

Note-se que os biofilmes obtidos a partir de proteínas (em foco no presente estudo) normalmente não apresentam boas propriedades à permeabilidade da humidade, o que constitui uma desvantagem à sua capacidade de retardamento de deterioração dos alimentos. Todavia a incorporação de lípidos, gorduras ou óleos, parece ser uma solução para contrariar a reduzida propriedade de barreira. Assim a adição de óleos essenciais parece ser a solução com duplo sentido, ou seja, poderá minimizar o problema da permeabilidade à humidade e constituir uma ação ativa (antimicrobiana e antioxidante) (Campos, Gerschenson e Flores, 2011) (Galus e Kadzinska, 2015b).

Deve ainda referir-se que para além da aplicação do biofilme nos alimentos, na literatura é definido um outro termo relacionado, *coating* (Galus e Kadzinska, 2015b) (Ugalde, 2014). Este termo normalmente é tido como um sinónimo de biofilme, devido ao facto de a sua constituição e aplicação ter os mesmos objectivos e princípios já definidos (Galus e Kadzinska, 2015b). Contudo, *coating* refere-se à aplicação ou revestimento de uma pequena camada da solução de material edível (biofilme líquido) no produto alimentar. Enquanto a aplicação ou revestimento por biofilmes refere-se a películas finas sólidas, pré-formadas e

aplicadas posteriormente nos alimentos. De referir que nem o biofilme nem o *coating* vão alterar os ingredientes originais e métodos de produção dos alimentos (Galus e Kadzinska, 2015b).

2 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL – MATERIAIS E MÉTODOS

Como já foi referido, o presente trabalho tem como objetivo a avaliação da conservação de alheiras e painhos após a aplicação de um revestimento à base de proteína de soro do leite, incorporado com óleo essencial e extrato de plantas aromáticas. Todavia este procedimento experimental insere-se em 3 etapas fundamentais: 1) Seleção do extrato e/ou óleo essencial com atividade antioxidante e antimicrobiana promissora para aplicação em produtos cárneos; 2) Desenvolvimento, otimização e caracterização do revestimento de origem proteica, incorporados com o extrato e óleo essencial mais promissor; 3) Aplicação do revestimento com incorporação do extrato e/ou óleos essencial mais promissor em produtos cárneos e monitorização da sua capacidade de preservação dos produtos em questão, através do registo da carga microbiológica, características físico-químicas e características sensoriais.

2.1 Seleção do extrato e/ou óleo essencial com atividade antioxidante e antimicrobiana promissora para aplicação em produtos cárneos

Esta seleção foi efetuada com o recurso à pesquisa bibliográfica, a testes e ensaios de análise de compostos fenólicos, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais das plantas aromáticas adquiridas.

2.1.1 Aquisição de plantas aromáticas e óleos essenciais

As plantas utilizadas neste estudo para a obtenção de extratos aquosos (EXTAq) foram adquiridas na forma desidratada a diferentes empresas nacionais, bem como os óleos essenciais. Em maior detalhe, as plantas adquiridas foram as seguintes:

Oreganum vulgare (oregão), cuja amostra possuía caule e folhas secas (Cantinho da Aromáticas, Lda); *Thymus vulgaris* (tomilho), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) cujas amostras possuíam caule e folhas secas (Ervital, Lda); *Cymbopogon citratus* (erva-príncipe), *Salvia officinalis* (salvia), cujas amostras possuíam folhas secas (Ervital, Lda); *Laurus nobilis* (louro), cuja amostra possuía folhas secas (Sabino Baptista, Lda) e *Cinnamomum cassia* (canela), apenas amostras de caule seco (Sabino Baptista, Lda);

Todas as amostras de plantas foram moídas e transformadas em pó para posteriores análises, com o auxílio de um moinho de crivos com poros de 1,5 mm existente na Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC).

Por outro lado, os óleos essenciais (OEs) utilizados neste estudo foram os seguintes: *Origanum virens* (oregão), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Laurus nobilis* (louro), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), (Ervidas Catitas, Lda) e *Cymbopogon citratus* (erva-príncipe) (Jardins a Vapor, Lda).

2.1.2 Obtenção de extratos aquosos

Os extratos aquosos das diversas plantas foram obtidos com 10 g da planta, por adição de 400 mL de água destilada a ferver, deixando-se repousar esta solução durante 15 minutos. De seguida a solução foi filtrada, inicialmente com gaze e depois com filtro Whatman nº1. O filtrado final foi colocado no balão do Rotavapor (Buchi, R210), enquanto o material vegetal retido na gaze foi novamente re-extraído em 400 mL de água a ferver e submetido a similar processo de filtração e evaporação. O produto da evaporação foi congelado e posteriormente liofilizado. Após liofilização, o extrato seco obtido foi mantido em exsiccador no escuro até utilização.

2.1.3 Quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos aquosos

Os compostos fenólicos foram avaliados pelo teste de Folin-Ciocalteu. Esta avaliação consiste na reação dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, que em meio alcalino reage com os compostos fenólicos existentes na amostra, ocorrendo assim a dissociação de um protão fenólico levando à formação do anião fenolato. Este anião tem a capacidade de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, formando o complexo azul de molibdénio, sendo a intensidade da cor da solução proporcional à concentração de compostos fenólicos totais. Assim, para quantificar os compostos fenólicos totais em extratos aquosos, foi adicionado num tubo de ensaio 100 μ L de solução de EXTAqs (1mg/mL), 1500 μ L de água e 100 μ L de reagente Folin-Ciocalteu, tendo-se homogeneizado a mistura em vortex. Após repouso durante 2 minutos, adicionaram-se 300 μ L de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e homogeneizou-se novamente no vortex, tendo a mistura sido mantida 30 minutos em banho-maria a 40°C. Após esta incubação, fez-se a leitura da absorvância a 765 nm no espectrofotómetro UV/Vis (DR Lange, ion 500), calibrado anteriormente com o branco. O branco contém todos os reagentes à exceção do extrato e do ácido gálico (composto de referência).

A curva de calibração com solução padrão de ácido gálico (0,2 mg/mL) em diferentes concentrações, medindo-se os seguintes volumes: 10, 20, 40, 60 e 80 μ L. Adicionou-se água até perfazer 1600 μ L em cada tubo de ensaio, depois o processo é igual ao anteriormente descrito para a amostra de extrato.

2.1.4 Avaliação do poder antioxidante pelo método de DPPH°

A avaliação do poder antioxidante foi efetuada através do radical livre 2,3 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH°).

Para determinar a atividade antioxidante foi utilizada uma solução metanólica $7,6 \times 10^{-5}$ M de DPPH° e os EXTAqs (dissolvidos em água destilada) ou óleos essenciais (OEs) (dissolvidos em metanol), preparados em eppendorfs em várias concentrações. Para uma leitura mais fácil, os EXTAqs e OEs são aqui denominados por amostra.

Colocou-se em tubo de ensaio diferentes quantidade da solução de amostra (20, 40, 60, 80 e 90 μ L) e completou-se o volume (100 μ L) com água destilada. Juntou-se 1,9 mL de solução de DPPH° e agitou-se no vortex. Guardou-se os tubos no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente e efetuou-se a leitura num espectrofotómetro UV/Vis (DR Lange, ion 500) a 517 nm, previamente calibrado com metanol.

O controlo contém todos os reagentes exceto a amostra (neste caso apenas água). A percentagem de inibição para cada concentração foi calculada através da equação I:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{Abs C - Abs A}{Abs A} * 100 \quad (1)$$

Onde:

Abs C: Absorvância do controlo

Abs A: Absorvância da amostra

Os resultados foram expressos em % de inibição vs concentração de amostra e no valor de IC₅₀ (mg/mL), que é definido como a concentração de amostra capaz de inibir 50% do radical DPPH°. Utilizou-se o ácido ascórbico (0,5 mg/mL) como padrão com diferentes concentrações, medindo se os seguintes volumes: 2, 4, 8, 12, 16 e 20 μ L e usando o mesmo procedimento experimental das amostras.

2.1.5 Avaliação da Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) dos extratos aquosos e dos óleos essenciais

A avaliação da peroxidação lipídica foi efetuada através do teste TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico).

Os EXTAqs dissolvidos em água destilada, e os OEs dissolvidos em metanol foram preparados em eppendorfs com diversas concentrações. Para uma mais fácil leitura definiu-se como amostra o EXTAq ou OE das plantas.

Este método foi realizado em banho de gelo. Mergulhou-se os tubos de ensaio no banho de gelo e colocou-se em cada tubo 100 μ L de cérebro de porco (14 mg/mL), a amostra em diferentes volumes (20, 40, 60, 80 e 100 μ L) e completou-se com água destilada até o volume de 300 μ L. Juntou-se 100 μ L de sulfato de ferro II (FeSO_4) (10 mM), 100 μ L de ácido ascórbico (0,1 mM) e agitou-se no vortex. Após 30 minutos em incubação a 37°C, a reação foi parada no banho de gelo e, passados 5 minutos adicionou-se 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 28% (m/v) e 380 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 2% (m/v). Os tubos de ensaio foram novamente incubados a 100°C durante 15 minutos e após isso, a solução foi transferida para tubos Falcon e centrifugada à velocidade de 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Recuperou-se o sobrenadante de cada tubo e efetuou-se a leitura no espectrofotómetro UV/Vis (DR Lange, ion 500) a absorvância de 530 nm.

O espectrofotómetro foi calibrado com o branco, que contém todos os reagentes exceto a amostra. Determinou-se a percentagem de inibição para cada concentração através da equação I.

Os resultados foram expressos em % de inibição vs concentração de amostra e no valor de IC_{50} (mg/mL), que é definido como a concentração de amostra capaz de inibir 50% de peroxidação lipídica. Utilizou-se o Trolox (0,25 mg/mL) como padrão com diferentes concentrações, medindo se os seguintes volumes: 20, 40, 60, 80 e 100 μ L, e o procedimento experimental anterior das amostras.

2.1.6 Determinação do CMI e CML - Efeito dos extratos aquosos e óleos essenciais no crescimento de estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas testadas nestes ensaios foram a *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 19571) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115).

Para a determinação da concentração mínima de inibição (CMI) e concentração mínima letal (CML) utilizou-se o método da macrodiluição descrito por IPCL (2012). Este método consiste na preparação de várias diluições de um agente antimicrobiano, por exemplo, os EXTAqs e OEs em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ou dimetil sulfóxido (DMSO), respetivamente. Note-se que a concentração de DMSO no meio de cultura não deverá exceder os 2%.

As concentrações das diluições variaram entre 0,2-10 mg/mL e foram adicionadas nos tubos esterilizados 100 µl e 10 µl de EXTAqs e OEs, respetivamente. A suspensão de células foi obtida de culturas recentemente repicadas (culturas frescas), e a densidade celular ajustada por turvação do tubo a 0,5 na escala de Mc Farland ($1.5 \times 10^8 / 10^3$ células/mL). As suspensões foram diluídas em meio RPMI/ Mueller Hilton Agar (MHA) e a densidade celular pode variar entre $1-2 \times 10^8 / 10^3$ células/mL. Dependendo de se tratar dos tubos com o meio com óleo essencial ou meio com extrato, adicionam-se 990 µl ou 900 µl da suspensão bacteriana, respetivamente. Os tubos ficam incolores e de seguida são incubados a 37°C durante 24h em ambiente aeróbio. As determinações das CMI foram efetuadas através da observação da “turvação” dos tubos. Esta turvação indica crescimento bacteriano e o tubo com menor concentração de óleo ou extrato, que não regista crescimento corresponde ao valor do CMI. Para estes tubos com resultado negativo de crescimento, foram inoculados em meio MHA e incubados nas condições acima descritas. As placas que não registaram qualquer formação de colónia, indicam que para além de inibir o crescimento, foram também letais para o seu desenvolvimento. Quando não se verifica crescimento nas placas, a concentração do agente antimicrobiano corresponde ao valor da CML.

A esterilidade do RPMI foi verificada em cada ensaio, adicionando-se com 990 µl de meio não inoculado. A inocuidade do DMSO também foi averiguada para cada estirpe, com a adição de 990 µl de meio inoculado e 10µl de DMSO. Todos os ensaios foram realizados em

duplicados e os resultados finais resultaram da média de três medições independentes. A unidade de expressão de CMI e CML é mg/mL.

2.2 Desenvolvimento, otimização e caracterização dos revestimentos edíveis (biofilmes) incorporados com o extrato e óleo essencial promissor

2.2.1 Determinação da composição do concentrado de proteína de soro (CPS)

O CPS utilizado neste trabalho foi produzido e liofilizado na Oficina Tecnológica de Lacticínios da ESAC, e por esse motivo a determinação da sua composição em termos de proteína, gordura, cinza, extrato seco, humidade, acidez titulável e pH (Anexo h) foi fundamental para elaborar a formulação dos biofilmes a produzir.

2.2.2 Otimização da produção de biofilmes

Para um volume final equivalente a 100 g (%m/m) de biofilme, pesaram-se para cinco copos diferentes, 24 g do CPS desidratado (correspondente a 10% de proteína). Adicionaram-se 76, 71, 66, 56 e 46 g (%m/m) de água (nos diferentes copos) agitando com magnete para completa dissolução. De seguida, mediu-se e ajustou-se o pH a 7 com a adição de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) (0,1M) previamente preparada. A solução foi aquecida em banho-maria (90°C) até esta ter uma aparência uniforme e depois deixou-se arrefecer um pouco, sempre sob agitação com magnete. Seguidamente procedeu-se à adição do glicerol numa gama de concentrações: 0%, 5%, 10%, 20% e 30%, respetivamente, em que cada concentração de glicerol correspondeu a um diferente copo com a solução (diferente amostra). Depois da homogeneização, retiraram-se 10 mL da solução de biofilme, de cada copo com o auxílio de uma pipeta e colocaram-se nas respetivas caixas de Petri descartáveis, devidamente identificadas. Estas foram colocadas numa câmara (Fitoclima S600 (DI200 pH-cl) a 20°C e 80% de humidade relativa durante 4 dias, depois foram transferidas para o exsiccador onde ficaram mais 4 dias. Após este tempo verificaram-se as diferenças entre as formulações de maneira a escolher o biofilme com melhores propriedades para o trabalho. Esta metodologia correspondeu/representou três etapas de otimização (I, II e III), simplificadas na Tabela 2.

A última etapa de otimização (otimização dos biofilmes com OE e EXTAq) (IV Tabela 2) consistiu na produção de biofilmes acima representada, com a seguinte modificação: Após a adição de glicerol (5%) procedeu-se à adição da solução aquosa de extrato (3%) ou da

solução etanólica (ETOH) e óleo essencial (3%), com a seguinte gama de EXTAqs e OEs: 0,1-0,5%.

A presente Tabela (Tabela 2) permite simplificar as etapas de otimização realizadas.

Tabela 2: Condições experimentais das etapas de otimização da produção do biofilme.

Etapas Experimentais	Composição Solução de Biofilmes (100g)*				
	CPS (do quais Proteína) (% m/m)	Glicerol (% m/m)	Água (%m/m)	Solução ETOH/OE (dos quais OE) (%m/m)	Solução Água/EXTAq (dos quais EXTAq) (%m/m)
I	24 (10)	-	76	-	-
II	24 (10)	10, 20 ou 30	66, 56 ou 46	-	-
III	24 (10)	5	71	-	-
IV	24 (10)	5	68	3 (0,1-0,5)	3 (0,1-0,5)

* Composição dos biofilmes calculada para 100g de Biofilme.

2.2.3 Produção dos biofilmes com extrato e óleo essencial

Para um volume final 100 g (%m/m) de biofilme, pesaram-se 24 g (correspondente a 10% de proteína) do CPS desidratado. Adicionaram-se a estes 68 g (%m/m) de água, agitando com magnete para completa dissolução. De seguida, mediu-se e ajustou-se o pH a 7 com a adição de uma solução de NaOH (0,1M) previamente preparada. A solução foi aquecida em banho-maria (90°C) até esta ter uma aparência uniforme e depois deixou-se arrefecer um pouco, sempre sob agitação com magnete. Seguidamente procedeu-se à adição do glicerol (5%) e da solução aquosa de extrato aquoso (3%) ou solução etanólica óleo essencial a testar (3%). Depois da homogeneização, retiraram-se 10 mL com uma pipeta que se colocam em caixas de petri descartáveis. Estas foram colocadas numa câmara (Fitoclima S600 (DI200 pH-cl) a 20°C e 80% de Humidade relativa durante 4 dias, depois foram transferidas para o exsiccador onde ficaram mais 4 dias. Após este tempo foram feitos os testes físico-químicos.

Os biofilmes utilizados para a avaliação das características físico-químicas produziram-se com as seguintes concentrações de óleo essencial e extrato, respetivamente: 0%; 0,3%; 0,75%; 1,0%; 1,2% e 0%; 2,5%; 5%; 7,5%.

2.2.4 Métodos analíticos para a determinação das características dos biofilmes

Os biofilmes produzidos foram caracterizados em termos das suas características físico-químicas: espessura, cor, transparência, humidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (Silva, 2011).

2.2.4.1 Determinação da espessura

Com o auxílio do micrómetro (Mader), mediu-se a espessura em várias posições diferentes, selecionadas aleatoriamente.

2.2.4.2 Determinação da cor

A cor (ΔE) foi medida no Colorímetro (Minolta Chroma Meter, CR-200b), previamente calibrado com o prato/branco modelo. Sobre a superfície do biofilme emitiu-se feixe de luz, no espectro visível, em vários pontos e aleatoriamente. Pode ser definido o valor para a cor (ΔE) através da seguinte equação (2):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (2)$$

ΔL - diferença da luminosidade entre o valor registado para o biofilme e o valor do standard;

Δa - diferença do valor do biofilme correspondente ao eixo “a” e o do standard para este eixo;

Δb - diferença do valor do biofilme correspondente ao eixo “b” e o do standard para este eixo.

2.2.4.3 Determinação da transparência

A determinação da transparência por unidade de espessura de biofilme foi efetuada através do corte de pequenas tiras de biofilme selecionadas aleatoriamente e pela leitura da absorvância num espectrofotómetro UV/Vis (DR Lange, ion 500) para o comprimento de onda de 600 nm. A espessura foi determinada através da equação 3:

$$\text{Transparência} = \frac{A_{600}}{\Delta x_{\text{mm}}} \quad (3)$$

A600 - absorvância do filme para um comprimento de onda de 600 nm;

Δx - espessura do filme em milímetros.

2.2.4.4 Determinação da Humidade

A determinação da humidade foi efetuada através da desidratação em estufa (Memmert) a 105 °C. Um pedaço de biofilme (aprox. 0,3 g) foi pesado para uma caixa de petri de vidro e colocado na estufa a 105°C durante 1h e, após esse período de tempo, o biofilme foi colocado no exsicador e pesado. O teor de humidade foi calculado através da seguinte equação (4):

$$\% \text{ Humidade} = \frac{m_1 - m_0}{m_1} \times 100 \quad (4)$$

m_1 - massa de filme a desidratar (g);

m_0 - massa do filme após secagem durante 1 h a 105 °C (g).

2.2.4.5 Determinação da solubilidade

A solubilidade foi determinada através do seguinte esquema: Pesou-se 0,2 g de biofilme para um copo de precipitação de 25 mL de capacidade. Adicionou-se 20 mL de água destilada e com auxílio de um magnete e placa de agitação e procedeu-se à dissolução do biofilme durante 1 h. Findo este tempo, filtrou-se a solução com filtros Whatman nº1, previamente pesados e identificados. A matéria retida no filtro seguiu, juntamente com o filtro, para a estufa (Memmert) a 105°C durante 24h. No dia seguinte o filtro foi colocado a arrefecer no exsicador para posterior pesagem. O cálculo da solubilidade foi determinado através da seguinte equação (5):

$$\% \text{ Solubilidade} = 100 - \frac{m_0 - m_1}{m_2} \times 100 \quad (5)$$

m_0 - massa do cadinho + massa do resíduo desidratado (g);

m_1 - massa do cadinho (g);

m_2 - massa do biofilme inicial desidratado (massa do biofilme inicial usado no teste – massa do biofilme usado no teste (% de humidade do biofilme / 100)) (g).

2.2.4.6 Determinação da permeabilidade ao vapor de água

Para determinar a permeabilidade ao vapor de água dos biofilmes foi necessário um copo com rosca e respetiva tampa recordada ou com abertura de diâmetro 3,4 cm. A partir do biofilme recortou-se uma circunferência com 3,5 cm de diâmetro e colocou-se na abertura da tampa. Neste momento colocou-se no copo sílica (≈ 3 g) previamente seca, e enroscou-se a tampa com biofilme. A massa inicial (T_0) do copo com sílica e biofilme foi registada e colocou-se na câmara (Fitoclima S600 (DI200 pH-cl)) a 20°C e 80% humidade relativa. Durante um período 2h registou-se a variação do aumento de massa da sílica (massa vs tempo). A equação (6) determinou os valores da permeabilidade:

$$\% WVP = \frac{C \times \Delta x}{A \times \Delta P} \times 100 \quad (\text{g mm/m}^2 \text{d kPa}) \quad (6)$$

Δx - espessura do filme (mm);

A - área do filme (m²);

ΔP - variação da pressão parcial do vapor de água entre as duas faces do filme (kPa);

C - Variação do aumento de massa da sílica vs tempo (declive do ajuste linear) (g/d).

2.3 Aplicação do revestimento edível (solução de biofilme) incorporado com o extrato e/ou óleos essencial promissores em produtos cárneos e monitorização da sua capacidade de preservação

A avaliação da influência nas características físicas e químicas, microbiológicas e organolépticas dos produtos cárneos devido à aplicação da solução de biofilme teve duração de aproximadamente 85 dias para as alheiras e de 112 dias para os painhos. Durante este período efetuaram-se análises microbiológicas, físico-químicas e sensorias às amostras controlo e às amostras com o biofilme.

2.3.1 Seleção dos produtos cárneos

As amostras selecionadas foram a alheira tradicional e o painho, dois tipos de enchidos característicos de Portugal (Figura 5). Estas amostras foram gentilmente fornecidas pelos profissionais da empresa Irmãos Monteiro, S.A, sediada na Gafanha de Encarnação, em Aveiro. Os prazos de validade dos enchidos são de 60 e 90 dias, para as alheiras e painhos respetivamente.



Figura 5: Enchidos selecionados e fornecidos pela empresa Irmãos Monteiro, S.A. Legenda: Alheiras (Suporte de amostras da esquerda); Paio inteiro (Suporte de amostras da direita). (Foto tirada pelo autor).

2.3.1.1 Aplicação da solução de biofilme nos produtos cárneos

A solução de biofilme (biofilme líquido) foi aplicada na linha de produção da empresa Irmãos Monteiro, S.A, na etapa do embalamento do produto. Antes da prensagem e celagem tradicional da embalagem (a vácuo), a solução de biofilme ($\approx 1\text{mL}$) foi adicionada manualmente com recurso a um pincel, de ponta sintética, cobrindo toda a superfície das amostras (*coating*). Importante referir que os painhos com tamanho original entre 20-30 cm, foram cortados em pedaços mais pequenos, com aproximadamente 5 cm, antes da aplicação do revestimento da solução de biofilme.

Após aplicação da solução de biofilme, as amostras com e sem a solução (amostra controlo) ficaram armazenadas nas câmaras frigoríficas da empresa, sendo resgatadas ao longo do tempo, nos períodos de análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais.

2.3.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram efetuadas às amostras (alheira e painho) controlo e com biofilme nos diversos tempos de análise: Alheiras: T0, T1 (14 dias), T2 (36 dias), T3 (58 dias), T4 (70 dias), T5 (85 dias); Painhos: T0, T1 (21 dias), T2 (49 dias), T3 (75 dias) e T4 (112 dias). A equação 7 foi utilizada na contabilização de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) /g de carne:

$$N = \frac{\sum \text{Colónias Formadas}}{V(n_1 + 0.1n_2) \times d} \quad (7)$$

N - UFC por grama de carne;

V - volume adicionado de suspensão/amostra por placa;

n_1 - número placas primeira diluição contável;

n_2 - número placas segunda diluição contável;

d- primeira diluição contável.

Após a determinação do valor N é aplicado a equação logarítmica e os valores expressos por log (UFC/g).

2.3.2.1 Preparação da suspensão inicial das amostras

As suspensões iniciais das amostras foram efetuadas de acordo com a norma ISO 6887-2:2003. De cada amostra foram retiradas assepticamente 25 g, em porções aleatórias de diversos locais dos enchidos, para um saco esterilizado de “Stomacher”. De seguida adicionaram-se 225 ml de Água Peptonada Tamponada (APT) (Biokar Diagnostics, França), tendo-se procedido à homogeneização durante cerca de 2 minutos, no homogeneizador Stomacher (Lab-Blender 400) a fim de se obter a suspensão inicial (diluição 10^{-1}). Paralelamente, fez-se o mesmo com outros 25 g de amostra, a que se adicionaram 225 ml de Fraser I (Biokar Diagnostics, França) para pesquisa de *Listeria Monocytogenes* (ver ponto 2.3.2.7).

2.3.2.2 Preparação das diluições

As diluições decimais foram realizadas conforme o método descrito na norma portuguesa (NP 3005:1985). Assim, retirou-se 1 ml de suspensão inicial da amostra e transferiu-se para um tubo de ensaio contendo 9 ml de APT (Biokar Diagnostics, França) seguida de homogeneização em vortex. Obtendo-se desta forma a diluição 10^{-2} .

Procede-se sucessivamente até às diluições consideradas necessárias para a realização das contagens dos microrganismos.

2.3.2.3 Contagem de microrganismos totais a 30°C

A contagem de microrganismos totais a 30°C (MT30°C) foi efetuada segundo a norma ISO 4833:2003. Foram tomadas, a partir das diluições decimais, alíquotas de 1 ml de inóculo e semeadas por incorporação em meio de cultura Plate Count Agar (PCA) (Biokar Diagnostics, França). As placas foram homogeneizadas e incubadas a 30°C por 24-48 horas em aerobiose. Os resultados obtidos foram expressos em log (UFC/g).

2.3.2.4 Contagem de *Escherichia coli*

A contagem de *Escherichia coli* foi efetuada segundo a norma ISO 16649-2:2001. A sementeira foi efetuada por incorporação de 1 ml de inóculo de cada uma das diluições em meio de cultura Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) (Biokar Diagnostics, França). A contagem de colónias características (colónias lisas de cor azul), foi efetuada após incubação a 44°C durante 24 horas. Os resultados foram expressos em log (UFC/g).

2.3.2.5 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

A contagem de *Staphylococcus* foi efetuada segundo a norma ISO 6888-1:1999. Utilizou-se o meio agar Baird Parker (Biokar Diagnostics, França) e depositando-se 0,1 ml da diluição, sobre a superfície do agar solidificado. Com o auxílio de um espalhador, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio e as placas foram incubadas a 37°C, por 24 a 48 horas. Após o período de incubação, foram selecionadas as placas contendo colónias típicas: negras, lisas e pequenas, circundadas por zona opaca e/ou halo transparente. Em seguida, as colónias de cada placa foram inoculadas em tubos contendo 1 ml de caldo Brain-Heart Infusion (BHI) (Biokar Diagnostics, França), incubando-se a 37°C, por 24 horas. A partir da cultura desenvolvida em BHI, realizou-se a prova de coagulase com Rabbit Plasma liofilizado (Biokar Diagnostics, França), que consistiu em transferir 0,1 ml do inóculo para um tubo de ensaio e adicionar 0,1 ml do plasma de coelho e incubar a 37°C durante 4 horas. Considerou-se como positivo a formação do coágulo no fundo do tubo.

Os resultados foram expressos qualitativamente e definiu-se a presença ou ausência de *Staphylococcus*. No caso da presença de *Staphylococcus* estes são expressos em log (UFC/g).

2.3.2.6 Pesquisa de *Salmonella spp.*

A pesquisa de *Salmonella spp.* foi efetuada segundo a norma ISO 6579: 2002. Os sacos de “Stomacher” com a suspensão-inicial foram incubados em estufa a 37°C, por 24 horas. Após a incubação, foram transferidas de cada amostra 0,1 ml do caldo de pré- enriquecimento para um tubo de ensaio contendo 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) (Biokar Diagnostics, França) e incubou-se a 42°C por 24 horas. Do crescimento no meio de enriquecimento seletivo semeou-se por estria em placas de Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) (Biokar Diagnostics, França) e incubou-se a 37°C durante 24 horas. Os resultados foram expressos qualitativamente e definiu-se a presença ou ausência de Salmonelas.

Nota: As colónias típicas no meio XLD: colónias vermelhas, transparentes e com halo negro.

2.3.2.7 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi efetuada segundo a norma ISO 11290-1:1995.

As 25 g de amostra, referidos no ponto 2.3.3.1. a que foram adicionados 225 ml de Fraser I (meio de enriquecimento seletivo primário) (Biokar Diagnostics, França), foram homogeneizados no Stomacher (Lab-Blender 400) e incubado a 30°C durante 24 horas, sendo depois recolhido do saco de Stomacher, 1 ml da suspensão para um tubo de ensaio com 10 ml de Fraser II (meio de enriquecimento seletivo secundário) (Biokar Diagnostics, França) e incubou-se durante 24 horas a 37°C. Com uma ansa estéril retirou-se um inóculo da suspensão inicial (Fraser I) e semeou-se por esgotamento na superfície do meio de cultura seletivo Palcam (Biokar Diagnostics, França), seguido de incubação a 37°C durante 24 horas. No dia seguinte retirou-se do tubo com Fraser II nova amostra com uma ansa e semeou-se por esgotamento em placa com meio Palcam (Biokar Diagnostics, França) e incubou-se a 37°C durante 24 horas. Os resultados foram expressos qualitativamente e definiu-se a presença ou ausência de *Listeria*.

Nota: As colónias típicas do meio Palcam: Halo preto (hidrólise da esculina) a rodear colónias de centro côncavas e de cor cinzento-esverdeado.

2.3.3. Análise físico-química das amostras

Em paralelo aos testes microbiológicos realizaram-se as análises físico-químicas. Estas foram realizadas a cada amostra (alheira e painho) controlo e com biofilme nos diversos tempos de

análise: Alheiras: T0, T1 (14 dias), T2 (36 dias), T3 (58 dias), T4 (70 dias), T5 (85 dias); Painhos: T0, T1 (21 dias), T2 (49 dias), T3 (75 dias) e T4 (112 dias).

2.3.3.1 Determinação da proteína

As proteínas foram determinadas com base no protocolo de azoto total (azoto proteico e não proteico) definido na NP 1612 de 1979.

Pesou-se 2g de produto cárneo para um papel de filtro whatman nº42 e colocou-se no balão kjeldahl a amostra juntamente com o filtro. Em seguida, adicionou-se 1,5 g de sulfato de potássio e 0,5 g de sulfato de cobre (II) e juntou-se 25 ml de ácido sulfúrico concentrado no balão. Ao conteúdo aplicou-se aquecimento até levantar ebulição durante 2h. Após esse tempo deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se 50 mL de água. Transferiu-se a solução para o aparelho de digestão (balão kjeldahl foi lavado com 50mL de água) e no tubo de saída colocou-se um balão de Erlenmeyer com 50 mL da solução de ácido bórico (4%) e $\frac{3}{4}$ gotas de solução de indicador. Adicionou-se 100 mL de NaOH (50%) e aqueceu-se até à ebulição por 20min até se obter um volume de 150 mL de volume recolhido. Por fim titulou-se a solução com ácido clorídrico (0,1N) e registou-se o volume de ácido gasto na titulação. Os resultados da proteína foram expressos em % de proteínas, a partir do valor de azoto total (%) definido pela equação 8. Para isso multiplicou-se esse valor pelo coeficiente proteico (6,25).

$$AzotoTotal(\%) = 0,0014 X (Vb - Va)X\left(\frac{100}{m}\right) \quad (8)$$

Vb- Volume de ácido clorídrico gasto no ensaio branco (mL);

Va- Volume de ácido clorídrico gasto nos ensaios da amostra (mL);

m- massa das amostras (g).

2.3.3.2 Determinação da humidade

A determinação da humidade foi efetuada através da desidratação em estufa (Memmert) a 105°C. Um pedaço de cada amostra (≈ 5 g) foi pesado para uma caixa de petri de vidro e colocado na estufa a 105°C durante 24 h. Após esse tempo o biofilme foi colocado no exsiccador e posteriormente pesado. O teor de humidade foi calculado através da equação 4, descrita no ponto 2.2.4.4.

2.3.3.3 Determinação da acidez titulável e pH

A acidez titulável foi avaliada de acordo com o método descrito na AOAC (1998). Para cada uma das amostras, foram pesados 5 g e homogeneizados (Ultra-Turrax, Ika T25 digital) com 45 mL de água destilada fervida a 12,000 rpm durante 1 min. Após a solução repousar e arrefecer, o pH das amostras foi determinado. Seguidamente a solução foi filtrada com discos de papel whatman nº1 e o filtrado foi titulado com uma solução padrão 0,1M NaOH, com fenolfetalina (1%) como indicador (Xu et al., 2010). Os resultados da acidez titulável foram expressos em % acidez láctica, segundo a equação 9:

$$\text{Acidez láctica(\%)} = \frac{\text{mL base titulável} \times \text{normalidade da base} \times \text{eq.acidez}}{\text{Volume de amostra (mL)}} \times 100 \quad (9)$$

2.3.3.4 Determinação da cor

A cor (ΔE) foi medida no Colorímetro (Minolta Chroma Meter, CR-200b), previamente calibrado com o prato-branco modelo. Sobre a superfície das alheiras e painhos foi emitido um feixe de luz, no espectro visível. A operação foi feita em vários pontos aleatórios.

O valor da cor foi definido através da seguinte equação (2), descrita no ponto 2.2.4.2.

2.3.3.5 Análise de perfil da textura

As amostras foram analisadas à temperatura ambiente e não foram confeccionadas antes da análise no texturómetro (stable microsystems). Para este teste programou-se o texturómetro para análise de perfil da textura, que consistiu num ciclo de duas compressões consecutivas no mesmo ponto da amostra (segunda compressão 50% inferior à primeira), com um intervalo de 5 s entre compressões e uma velocidade 5 mm/s. Utilizou-se um sensor cilíndrico de alumínio com 2 mm de diâmetro e 25 mm de altura. Os parâmetros avaliados foram: dureza (g) i.e., máxima força requerida para comprimir a amostra; aderência (g/s) i.e., aderência do produto quando retorna da primeira compressão, que corresponde à área formada após a primeira compressão; elasticidade, que corresponde à habilidade do alimento retornar à posição inicial; mastigabilidade (g), que é a força que simula o trabalho dos maxilares sobre o alimento e a coesão, corresponde ao ponto que o material se pode deformar antes da rutura (Gadiyaram e Kannan 2004) (Herrero et. al, 2008).

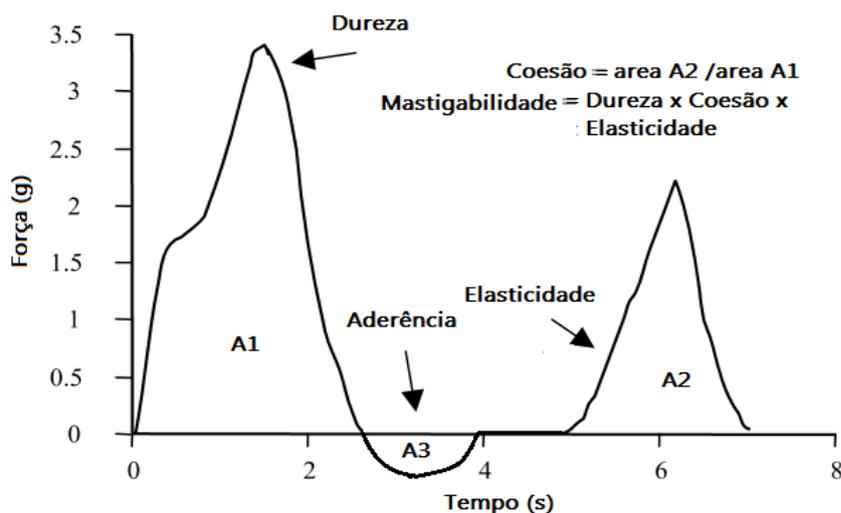


Figura 6: Exemplificação de um gráfico da análise de perfil da textura e respectivas zonas de cálculo das características dos produtos alimentares (adaptado de Gadiyaram e Kannan (2004)).

2.3.3.6 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método foi realizado à temperatura ambiente. Para cada amostra pesou-se 25 g de porções aleatórias, e homogeneizou-se em 25 mL de TCA (5%) com auxílio do Ultra-Turrax (Ika T25 digital). Seguidamente a solução foi filtrada com gaze e retirou-se o maior resíduo sólido, enquanto o filtrado foi novamente submetido a filtração com discos de papel Whataman nº1. O filtrado final de cada amostra foi usado na reação com o TBA.

Nos tubos de ensaio devidamente identificados, colocou-se 5mL de filtrado/amostra e 5mL TBA (280mM) e agitou-se no vortex. Em simultâneo preparou-se o branco, adicionou-se num outro tubo de ensaio 5 mL de TCA (5%) e 5 mL TBA (280 mM) e agitou-se no vortex. Os resultados foram expressos por mg malonaldeído (MDA) /kg de amostra. Para converter estes resultados de absorvância em mg MDA/ kg, efetuou-se a uma curva de calibração de MDA, que serve de padrão. Assim realizou-se em paralelo aos ensaios, a curva de calibração/padrão: Em 4 tubos de ensaio adicionou-se respetivamente 1, 2, 3 e 4 mL de MDA (2,39 µg/mL), 4, 3, 2, e 1 mL de TCA (5%), 5 mL de TBA (280 mM) e homogeneizou-se no vortex. Seguidamente, os tubos de ensaio com as preparações foram mergulhados num banho a 100°C durante 40 min para ativar a reação. Após este período de tempo foi efetuada a leitura de absorvância a 530 nm no espectrofotómetro UV/Vis (DR Lange, ion 500).

2.3.4 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada na Escola Superior Agrária de Coimbra com um grupo de colaboradores não treinados, englobando estudantes, docentes e pessoal não docente da mesma instituição, com um intervalo de idades entre os 17 e 50 anos.

Esta análise foi realizada separadamente a cada produto (alheira e painho), num só período de análise, a saber, 1 mês e 27 dias e 2 meses e 18 dias para alheiras e painhos respetivamente. Naturalmente, corresponderam a datas dentro dos prazos de validade referidos e estimados pela empresa produtora dos mesmos.

A avaliação envolveu 3 testes sensoriais. No primeiro teste o parâmetro avaliado foi o aspeto visual do produto na embalagem, o segundo consistiu na distinção do aroma dos produtos na embalagem aberta e por último teste avaliaram-se diversos parâmetros, a saber, cor, sabor, textura e aroma, inseridos numa análise triangular de preferência. Neste teste triangular as alheiras foram cozinhadas (no forno) e divididas em pedaços, enquanto as amostras de painho foram apenas cortadas e distribuídas pelos provadores.

A escala utilizada para a classificação dos testes sensoriais foi a seguinte: 1- desgosto muito 2- desgosto; 3- não gosto nem desgosto 4- gosto 5- gosto muito.

2.4 Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados obtidos nos métodos desenvolvidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), utilizando o *software* Statistica V.12.0 (Statsoft, 2013). Seguidamente, no tratamento dos resultados realizou-se o teste Tukey HSD a todos os parâmetros para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos resultados das amostras controlo e com biofilme. Todos os testes foram analisados com um nível de confiança de 95%.

3. Resultados e Discussão

3.1 Seleção do extrato e/ou óleo essencial com atividade antioxidante e antimicrobiana promissora para aplicação em produtos cárneos

3.1.1 Seleção das plantas mais promissoras

A primeira abordagem a este trabalho constituiu na seleção de espécies de plantas que, com base na literatura científica, demonstrassem potencial aplicabilidade para aplicação dos seus óleos essenciais (OEs) e/ou extratos aquosos (EXTAq). Esta seleção foi primeiramente efetuada com base nas capacidades antimicrobiológicas e antioxidantes descritas para os OEs e/ou EXTAq de várias espécies das plantas. Secundariamente, mas não menos importante, tentou-se sempre procurar e identificar plantas com precedentes usos na alimentação, e/ou com ação medicinal. Dentro destes critérios destacaram-se o oregão (*Oreganum vulgare*), salvia (*Salvia officinalis*), louro (*Laurus nobilis*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), tomilho (*Thymus vulgaris*), erva-príncipe (*Cymbopogon citratus*), canela (*Cinnamomum cassia*), murta (*Myrtus communis*), cravinho (*Syzygium aromaticum*), medronho (*Abutilon unedo*), funcho (*Foeniculum vulgare*), camomila (*Matricaria chamomilla*) e cortiça (*Quercus suber*).

Em maior detalhe, a pesquisa bibliográfica efetuada demonstrou que os OEs e EXTAqs possuem diferentes capacidades antimicrobianas e antioxidantes, i.e, no geral os OEs são melhores agentes antimicrobianos enquanto os EXTAqs normalmente possuem capacidade antioxidante superior à dos OEs (Burt, 2004) (Palmer, Stewart e Fyfe, 1998) (Seow et al., 2014) (Embuscado, 2015) (Mata et al., 2007). A título de exemplo, nas Tabelas 3 e 4 encontram-se compilados dados relativos as capacidades antimicrobianas dos OEs e antioxidantes dos EXTAq, representados pela concentração mínima de inibição (CMI) e compostos fenólicos totais (CFT) respetivamente. Naturalmente esta abordagem poderia ter sido efectuada tendo por base outros métodos antimicrobianos e antioxidantes, todavia optou-se pelos métodos e respetivos resultados de CMI e CFT, uma vez que estes foram possíveis de obter para a maioria das plantas acima referidas. Para além disso os testes referidos foram aplicados na atividade prática deste trabalho.

Tabela 3: Valores de CMI descritos na literatura para OEs.

Óleos Essenciais*	Microorganismos - CMI (mg/mL)				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Cinnamomum cassia</i> ⁶	0,42-0,50	0,63	0,63	-	0,42-0,75
<i>Oreganum vulgare</i> ^{1,3,6}	0,13-1,20	0,42-1,20	0,50-1,25	3,00	0,08-1,20
<i>Thymus vulgaris</i> ^{1,3,6}	0,45-1,25	0,12-2,50	0,15-0,83	-	0,45-20,00
<i>Laurus nobilis</i> ^{2,3,4}	1,10-2,50	5,00-20	1,10-2,52	2,50	5,00-9,01
<i>Rosmarinus officinalis</i> ^{1,3,5,6}	4,50-20,00	0,25-11,20	0,20-5,00	-	5,00-20,00
<i>Salvia officinalis</i> ^{1,3,6}	3,50-5,00	0,75-11,20	0,20-5,00	-	0,08-20
<i>Cymbopogon citratus</i> ^{1,3,6}	0,60-10	0,12-2,50	1,25-8,30	2,10	2,50-5,00
<i>Myrtus communis</i> ⁷	40,00-10,0	4,00-20,00	5,00-30,00	5,00-20,00	5,00
<i>Matricaria chamomilla</i> ⁸	0,13	0,10	-	-	0,13
<i>Foeniculum vulgare</i> ⁸	0,13	0,10	-	-	0,15
<i>Abutus unedo</i> ⁹	SI **	-	-	SI **	-
<i>Syzygium aromaticum</i> ¹	0,40-2,50	0,40-2,50	0,20	-	>20,00

*Bibliografia consultada para a aquisição dos valores de MIC (mg/mL), indicada através dos números *superscript* na primeira coluna: 1 - Burt (2004); 2 - Ramos et al. (2012); 3 - Seow et al. (2014); 4 - Silveira et al. (2014); 5 - Celiktas et al. (2007); 6 - Dussault, Vu e Lacroix (2014); 7 - Aleksic e Knezevic (2013); 8 - Roby et al. (2012); 9 - Orak et al. (2011). **SI = Sem Inibição.

Tabela 4: Valores de CFT descritos na literatura para EXTAq.

EXTAq*	Compostos Fenólicos Totais
	($\mu\text{g EAG}^{\Delta}$ / mg extrato)
<i>Cinnamomum cassia</i> ¹	157,8-183
<i>Oreganum vulgare</i> ^{1,2}	32,1-92,4
<i>Thymus vulgaris</i> ^{3,11}	35,7-74,9
<i>Laurus nobilis</i> ^{4,10}	62-92
<i>Rosmarinus officinalis</i> ³	58,4
<i>Salvia officinalis</i>	ND**
<i>Cymbopogon citratus</i> ⁵	6,5
<i>Quercus suber</i> ^{6,7}	200-254
<i>Matricaria chamomilla</i> ⁸	3,7
<i>Foeniculum Vulgare</i> ^{8,10}	3,4-30,3
<i>Abutus unedo</i> ⁹	197,2
<i>Syzygium aromatic</i> ¹	113,2-296

*Bibliografia consultada para a obtenção dos valores de CFT, indicada através dos números *superscript* na primeira coluna: 1 - Embuscado (2015); 2 - Martins et al. (2014); 3 - Mata et al. (2007); 4 - Ramos et al. (2012); 5 - Wongs, Chaiwarit e Zamaludien (2012); 6 - Santos et al. (2010); 7 - Santos et al. (2013); 8 - Roby et al. (2012); 9 - Orak et al. (2011); 10 - Hinnerburg, Dorman e Hiltunen (2006); 11 - Gavaric et al. (2015). Δ EAG – Equivalente ácido gálico; ** ND - Valor não determinado. Notas: Os valores *Cinnamomum cassia*, *Syzygium aromatic* e (32,1) do *Oreganum vulgare* não possuem referência a EAG; O valor (74,9) do *Thymus vulgaris* corresponde à espécie *Thymus serpyllum* e o valor é definido em equivalente pyrogallol; *Rosmarinus officinalis* é definido em equivalente pyrogallol; Os valores (3,4) do *Foeniculum vulgare* e (3,7) da *Matricaria chamomilla* correspondem a extratos com o solvente metanol.

Em algumas das plantas é possível constatar que os resultados identificados estão inseridos num intervalo de valores (Tabelas 3 e 4). Este facto significa que existe variação de resultados entre a mesma espécie, que se deve, possivelmente, aos diversos métodos adotados, aos diferentes manipuladores e órgãos das plantas utilizados, bem como às diferenças intrínsecas das próprias plantas, que se adaptam às regiões, climas e geografias dos distintos locais dos estudos bibliográficos.

Sequentemente neste trabalho foi importante identificar algumas empresas nacionais que garantissem o *stock* das plantas a fim de minimizar as variações nestes dados. Outro aspeto essencial tido em consideração foi a realização de análises antioxidantes e antimicrobianas aos

EXTAqs e OEs das plantas selecionadas, de maneira a obter-se com menor erro as características das mesmas.

As plantas apresentadas nas Tabelas 3 e 4 foram as que apresentaram melhores propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Contudo devido à logística económica do trabalho foi necessário reduzir o número de amostras a testar. Com base nestes parâmetros foram excluídas as seguintes plantas: 1) cravinho (*Syzygium aromatic*), apesar de ter apresentado bons indicadores bibliográficos de CFT, possui um valor elevado na CMI para a estirpe de *Salmonella typhimurium*, que foi considerado inapropriado; 2) camomila (*Matricaria chamomilla*) porque apresentou o valor mais baixo de CFT e não foi possível encontrar na bibliografia o valor CMI para estirpe *Listeria monocytogenes*; 3) cortiça (*Quercus suber*) porque não foi possível identificar valores bibliográficos de CMI, apesar de ter apresentado dos mais elevados valores de CFT; 4) funcho (*Foeniculum vulgare*) uma vez que não foi possível determinar o valor bibliográfico CMI para estirpe *Listeria monocytogenes* e por ter apresentado maus indicadores bibliográficos de CFT; 5) medronho (*Abutus unedo*) apesar de ser descrita na literatura com bons indicadores de CFT, nos testes de CMI descritos não inibiu o crescimento das estirpes *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*; 6) murta (*Myrtus communis*) embora terem sido discritos resultados indicadores de inibição de crescimento para todas as espécies requeridas, o intervalo de ação relativamente a outras espécies de plantas foi demasiado elevado, para além de não se ter identificado dados bibliográficos de CFT.

Assim e apesar de questões relativas à aceitabilidade organoléticas de algumas plantas selecionaram-se numa primeira fase, para a obtenção dos extratos aquoso, oregão (*Oreganum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), erva-príncipe (*Cymbopogon citratus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), louro (*Laurus nobilis*), canela (*Cinnamomum cassia*) e salvia (*Salvia officinalis*). Estas corresponderam às amostras descritas previamente na literatura com melhores resultados relativos à inibição do crescimento bacteriano, com intervalos de valores identificados para todas as estirpes. Em contra partida apresentaram valores de CFT inferiores a algumas das plantas excluídas (cortiça, medronho e cravinho). Desta seleção, numa segunda fase adquiriram-se os respetivos óleos essenciais, com a exceção dos de canela (*Cinnamomum cassia*) e salvia (*Salvia officinalis*) que, por questões organoléticas, não foram considerados apropriados. No caso do oregão (*Oreganum vulgare*), devido à falta de stock, optou-se pela espécie *Oreganum virens*.

3.1.2 Extração e avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana dos extratos aquosos

Os resultados referentes aos rendimentos de extração dos EXTAq das plantas, bem como os relativos à quantificação de compostos fenóis totais e à capacidade antioxidante (método de DPPH e da inibição da peroxidação lipídica) dos EXTAq encontram-se representados na Tabela 5.

É possível concluir que o rendimento de extração para as várias plantas deste estudo variou entre 3,9% e 33,4%, tendo o valor máximo sido obtido para a *Salvia officinalis* e o valor mínimo encontrado para *Laurus nobilis*. Note-se no entanto que o rendimento de extração do *Laurus nobilis* foi condicionado por problemas na liofilização do extrato e não deve por isso ser considerado rigoroso. Segundo estudos efetuados por Hinnerburg et al., (2006) este rendimento deveria rondar os 25,8%. Relativamente à *Salvia officinalis* não foram identificados outros estudos que sustentem este valor. Com valores intermédios destacaram-se os rendimentos de extração do *Oreganum vulgare* (26,1%), *Cymbopogon citratus* (22,9%) e *Thymus vulgaris* (20,7%). Boroski et al., (2012) apresentou valores de rendimento semelhantes (25,4 %) na extração de uma amostra de *Oreganum vulgare*. Na extração de uma espécie diferente de tomilho (*Thymus serpyllum*), Mata et al., (2007), obteve valores mais elevados (36,8%). Já para o *Cymbopogon citratus* e *Cinnamomum cassia* (6,3%) não foi possível obter dados discritos na literatura para comparação. Em relação à amostra de *Rosmarinus officinalis* (18,8%), esta ficou aquém do rendimento obtido por Mata et al., (2007) (51,1%).

Numa perspetiva empresarial querer-se-à um maior rendimento de extração possível e nesse aspeto o *Oreganum vulgare* e a *Salvia officinalis* foram os que mais se destacaram. No entanto foi necessário assegurar que possuam boa capacidade antioxidante para que possam ser considerados uma mais-valia industrial.

O teor de compostos fenólicos totais apresentado na Tabela 5 permite destacar a seguinte evolução decrescente do valor de CFT dos EXTAq: *Cinnamomum cassia* > *Oreganum vulgare* > *Thymus vulgaris* > *Laurus nobilis* > *Rosmarinus officinalis* > *Salvia officinalis* > *Cymbopogon citratus*. Comparando os resultados obtidos no presente trabalho para os diversos extratos, com aqueles anteriormente publicados na literatura para extratos polares da mesmas espécies de plantas (Tabela 4), é possível concluir que os valores de CFT dos extratos de *Oreganum vulgare*, *Laurus nobilis* e *Rosmarinus officinalis* estão dentro dos valores bibliográficos, enquanto

os do extrato de *Cinnamomum cassia* ($125,1 \pm 6,74$ μg EAG/mg extrato) foi menor do que o esperado ($157-182$ μg EAG/mg extrato) (Embuscado, 2015). Por outro lado, os valores de CFT dos extratos de *Thymus vulgaris* ($87,4 \pm 15,83$ μg EAG/mg extrato) e principalmente o de *Cymbopogon citratus* ($45,9 \pm 9,46$ μg EAG/mg extrato) apresentaram valores superiores ao espectável ($74,9$ e $6,5$ μg EAG/mg extrato, respetivamente) (Gavaric et al., 2015) (Mata et al., 2007) (Wongsa, Chaiwarit e Zamaludien 2012).

Relativamente ao método DPPH, este caracteriza-se pela existência de radicais livres estáveis de azoto com cor violeta, e que mudam para tons de amarelo com uma reação de redução através da cedência de eletrões (Hinnerburg, Dorman e Hiltunen 2006). Os antioxidantes são as substâncias capazes de ativar esta reação, sendo também designados por sequestradores de radicais livres (Hinnerburg, Dorman e Hiltunen 2006). De forma geral, os resultados obtidos neste teste permitiram concluir que os extratos possuem uma boa capacidade sequestradora do radical DPPH, com valores de IC_{50} na gama de $0,008 \pm 0,002$ mg/mL (*Cinnamomum cassia*) e $0,024 \pm 0,003$ mg/mL (*Cymbopogon citratus*). Correspondendo ao *Cinnamomum cassia* o EXTAq mais eficaz na capacidade sequestrador de radicais. No entanto, estes resultados ficaram aquém do valor de IC_{50} $0,004 \pm 0,001$ mg/mL obtido para o ácido ascórbico (antioxidante de referência).

Note-se que os valores de IC_{50} aqui obtidos para as plantas *Oreganum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Laurus nobilis*, *Rosmarinus officinalis*, e *Cymbopogon citratus*, foram inferiores (resultados refletiram melhores capacidades antioxidantes) a valores descritos na literatura para EXTAq das mesmas espécies: *Oreganum vulgare* 0,055 mg/mL (Licina et al., 2013); *Thymus vulgaris* 0,0316 mg/mL (Mata et al., 2007) *Laurus nobilis* 0,49 mg/mL (Hinnerburg, Dorman e Hiltunen 2006) *Rosmarinus officinalis* 0,037 mg/mL (Mata et al., 2007) 0,019 mg/mL (Upadhyay e Mishra, 2014) 0,15 - 0,60 mg/mL (Jordan et al., 2013) e *Cymbopogon citratus* 0,090 mg/mL (Kanatt, Chawla e Sharma, 2014).

Por outro lado, em relação à *Salvia officinalis*, os dados obtidos no presente trabalho são equivalentes aos anteriormente publicados Upadhyay e Mishra (2014) (IC_{50} 0,013 mg/mL). Para o extrato *Cinnamomum cassia* não foi possível encontrar dados bibliográficos que permitissem uma comparação.

Através dos resultados obtidos é possível observar uma tendência para uma correlação diretamente proporcional entre os valores de CFT e a atividade antioxidante (DPPH $^{\circ}$), ou

seja, a diminuição da quantidade de compostos fenólicos parece estar associada a menor capacidade de sequestro do radical DPPH°.

Tabela 5: Resultados do rendimento de extração, CFT e ensaios antioxidantes realizados aos EXTAq das plantas selecionadas.

Plantas	Rendimento de extração (%)	Folin CFT (μg EAG ^Δ /mg extrato)	DPPH° IC ₅₀ [∞] (mg/mL)	TBARS IC ₅₀ [∞] (mg/mL)
<i>Cinnamomum cassia</i>	6,3	125,1±6,74 ^a	0,008±0,002 ^a	0,191±0,028 ^a
<i>Oreganum vulgare</i>	26,1	89,5±14,82 ^b	0,009±0,003 ^a	0,247±0,009 ^b
<i>Thymus vulgaris</i>	20,7	87,4±15,83 ^b	0,014±0,001 ^{b,c}	0,134±0,018 ^c
<i>Laurus nobilis</i>	3,9	77,6±2,89 ^b	0,017±0,002 ^b	ND*
<i>Rosmarinus officinalis</i>	18,8	76,2±5,11 ^{b,c}	0,015±0,001 ^{b,c}	0,097±0,015 ^d
<i>Salvia officinalis</i>	33,4	64,6±12,22 ^{c,d}	0,013±0,002 ^c	0,187±0,020 ^a
<i>Cymbopogon citratus</i>	22,9	45,9±9,46 ^d	0,024±0,003 ^d	0,411±0,287 ^e
Referência	-	-	0,004±0,001 ^e (ácido ascórbico)	0,029±0,003 ^e (trolox)

^ΔEAG - Equivalente ácido gálico; [∞]IC₅₀ - 50% da concentração máxima inibitória; *ND - Valor não foi possível determinar; Diferentes letras (a-e) superscript na mesma coluna indicam variações significativas (P < 0,05).

Em relação à análise da inibição da peroxidação lipídica, a maior parte dos extratos demonstraram possuir uma considerável capacidade de inibição da peroxidação lipídica, com valores de IC₅₀ no intervalo entre 0,097±0,015 mg/mL (*Rosmarinus officinalis*) e 0,247±0,009 mg/mL (*Oreganum vulgare*), à exceção do extrato proveniente de *Cymbopogon citratus*, cujo valor de IC₅₀ foi mais elevado (0,411±0,287 mg/mL). No entanto, estes resultados ficaram aquém do valor de IC₅₀ 0,029±0,003 mg/mL obtido para o trolox (antioxidante de referência).

A comparação com valores descritos na literatura não foi possível de se efectuar para todas as espécies, devido à escassez de valores IC₅₀ para o método TBARS. Em relação à amostra de *Cymbopogon citratus* os valores de IC₅₀ obtidos no presente trabalho mantiveram-se

próximos dos seus valores bibliográficos: 0,428 mg/mL (Roriz et al., 2015). No caso do *Rosmarinus officinalis* a sua posição em termos de compostos fenólicos não justifica a sua melhor prestação (IC_{50}) na peroxidação lipídica. Contudo os resultados são apoiados qualitativamente por Embuscado (2015) e Shah, Bosco e Mir (2014) que através de outras fontes bibliográficas destacam a ação protectora do *Rosmarinus officinalis* na prevenção da peroxidação lipídica. Relativamente à análise bibliográfica das restantes amostras para o *Thymus vulgaris* e *Cinnamomum cassia*, em semelhança com o *Oreganum vulgare*, não foi possível identificar valores de IC_{50} relativamente à peroxidação lipídica. Enquanto para a amostra de *Laurus nobilis*, Marquez et al. (2013) apenas afirmaram que é possível atingir 73% da inibição da oxidação lipídica para uma concentração de extrato $1g L^{-1}$.

No geral observou-se que não existe uma correlação concreta entre a quantidade de compostos fenólicos e a capacidade inibitória da peroxidação lipídica, uma vez que a *Cinnamomum cassia* ($0,191 \pm 0,028$ mg/mL) e *Oreganum vulgare* ($0,247 \pm 0,009$ mg/mL) (as duas amostras com maiores valores médios de CFT) apenas foram melhores, em termos inibitórios da oxidação lipídica, que a *Cymbopogon citratos* ($0,411 \pm 0,287$ mg/mL), que efetivamente possuía os menores valores CFT dos EXTAq. Contudo este facto poderá estar correlacionado com o perfil de compostos fenólicos, i.e., existência de compostos fenólicos lipofílicos que possuem maior capacidade protectora das gorduras. Ainda possível que existam outros compostos não fenólicos e que atuem como antioxidantes. Deste modo é importante conhecer a composição química das plantas (Gavaric et al., 2015). Assim, compostos com maior percentagem de CFT podem efetivamente não corresponder a um maior poder antioxidante de lípidos.

Com base nos rendimentos de extração, quantidade de CFT e respetivas propriedades antioxidantes, selecionaram-se três EXTAq para prosseguir a avaliação das propriedades antimicrobianas: 1) *Oreganum vulgare* por esta apresentar o segundo melhor rendimento de extração, quantidade de CFT e atividade sequestradora de radicais livres; 2) *Thymus vulgaris* por ter apresentado dos melhores rendimentos de extração e quantidade CFT e boas propriedades inibitórias da peroxidação lipídica; 3) *Salvia officinalis* por se destacar no rendimento de extração, e por exibir propriedades inibitórias da peroxidação lipídica e atividade sequestradora de radicais livres superiores ao registado para os extratos de *Oreganum vulgare* e *Thymus vulgaris*, respetivamente. Apesar de *Cinnamomum cassia* se ter destacado favoravelmente na quantidade de CFT e capacidade sequestradora de radicais

livres, e o *Rosmarinus officinalis* na inibição da peroxidação lipídica, ficaram aquém dos extratos selecionados na maioria dos outros parâmetros. Naturalmente os EXTAq de *Cymbopogon citratos* e o *Laurus nobilis* não foram os escolhidos por não se destacarem positivamente nestes parâmetros.

Na Tabela 6 encontram-se resumidos os resultados referentes à capacidade antimicrobiana dos EXTAq relativos aos microrganismos *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Deve realçar-se que estes testes foram efetuados tendo em consideração as principais estirpes patogénicas capazes de se desenvolver em alimentos cárneos. No entanto e relativamente à pesquisa de valores bibliográficos da capacidade antimicrobiana dos OEs (Tabela 3), apenas não se efectuaram as análises relativamente à estirpe *Escherichia coli* devido à falta inóculo disponível.

Tabela 6: Resultados da atividade antimicrobiana dos EXTAq, expressa em CMI e CML.

Origem extrato	Concentração Mínima Inibitória (mg/ mL)			Concentração Mínima Letal (mg / mL)		
	<i>Salmonella</i> ^Δ	<i>Listeria</i> ^β	<i>S.aureus</i> [∞]	<i>Salmonella</i> ^Δ	<i>Listeria</i> ^β	<i>S.aureus</i> [∞]
<i>Oreganum vulgare</i>	10,00	2,50	1,25	ND*	5,00	2,50
<i>Salvia officinalis</i>	ND*	2,50	2,50	ND*	5,00	5,00
<i>Thymus vulgaris</i>	10,00	10,00	2,50	ND*	5,00	2,50

*ND - Não foi determinado (extrato sem ação inibitória ou letal); ^Δ - *Salmonella typhimurium*; ^β - *Listeria monocytogenes*; [∞] - *Staphylococcus aureus*.

Os resultados da Tabela 6 realçaram que para os EXTAq não possuíam capacidade letal contra a *S. typhimurium*. Todavia indicaram o *Oreganum vulgare* como sendo o EXTAq com maior capacidade antibacteriana. É no entanto importante realçar que Licina et al. (2013), descreveram capacidades inibitórias e letais para um extrato polar da mesma espécie de planta, com valores de CMI de 5 mg/mL e 0,6 mg/mL e CML 5 mg/mL e 1,25 mg/mL contra *S. typhimurium* e *S. aureus*, respetivamente. Estes valores indicam melhores características antibacterianas, antecipando que esta propriedade antibacteriana sofre variações entre EXTAq da mesma espécie. Adicionalmente, Iturriaga, Olabarrieta e Maranon (2012) descreveram a atividade antibacteriana de um extrato polar de *Oreganum vulgare* contra uma outra estirpe de *Listeria* (*L. innocua*), tendo obtido um valor de CMI de 5 mg/mL, que

corresponde a uma atividade antibacteriana inferior à registada na Tabela 6. Contudo não se identificaram resultados sobre a estirpe de *Listeria* (*Listeria Monocytogenes*) pretendida para uma análise mais fidedigna. No global desta análise o EXTAq de *Oreganum vulgare* aqui estudado, parece ficar um pouco aquém da capacidade registada pelos estudos homólogos.

Em comparação com o extrato acima mencionado, o extrato de *Thymus vulgaris* apresentou uma capacidade inibitória semelhante contra a bactéria *S. typhimurium*, mas foi menos eficiente na proteção contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. De qualquer forma, os valores de CML deste extrato para a *L. monocytogenes* e *S. aureus* foram semelhantes aos obtidos para o extrato proveniente de *Oreganum vulgare*. Realça-se o seguinte valor de CMI descrito para extratos polares de *Thymus vulgaris*: 5 mg/mL com uma cultura de *Listeria innocua* (Iturriaga, Olabarrieta e Maranon, 2012). Verificou-se para este estudo bibliográfico (embora com uma cultura de *Listeria* de espécie diferente) que o valor da capacidade inibitória exibida pelo EXTAq *Thymus vulgaris* foi inferior à determinada neste trabalho. Para além deste resultado bibliográfico, outros valores contra as outras estirpes foram previamente descritos. No entanto, os extratos de *Thymus vulgaris* foram obtidos em soluções etanólica e metanólica, pelo que se considerou não estarem em concordância com a discussão destes resultados. Assim, para estes resultados (*Thymus vulgaris*) não foi possível obter-se uma analogia sobre a capacidade antibacteriana com outros dados da literatura.

Em relação à capacidade antibacteriana da *Salvia officinalis*, os resultados apresentados permitem concluir que este foi o EXTAq menos eficaz no que respeita à estirpe *S. typhimurium*. Por outro lado, em semelhança aos outros microrganismos testados foi tão eficiente como o *Oreganum vulgare* contra a *L. monocytogenes* e menos eficiente no caso da *S. aureus*. Relativamente ao *Thymus vulgaris*, a *Salvia officinalis* inibiu mais o crescimento da cultura *L. monocytogenes*, mas foi menos letal contra a *S. aureus*. Para a *Salvia officinalis* não foi possível identificar valores de CMI e CML descritos na literatura.

3.1.3 Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais

Na Tabela 7 encontram-se os resultados referentes à avaliação da capacidade antioxidante dos óleos essenciais selecionados, através dos métodos DPPH e TBARS. Relativamente ao primeiro método, de acordo com a Tabela 7, é possível concluir que os óleos essenciais possuem capacidade sequestradora do radical DPPH^o com valores de IC₅₀ entre 0,298 ±

0,084 mg/mL e $2,669 \pm 0,870$ mg/mL. O valor mais baixo (equivalente à melhor capacidade sequestradora do radical livre) foi relativo ao OE *Laurus nobilis*, enquanto os valores mais elevados foram referentes aos OEs de *Rosmarinus officinalis* ($2,669 \pm 0,870$ mg /mL), de *Oreganum virens* ($0,575 \pm 0,007$ mg/mL) e de *Thymus vulgaris* ($0,437 \pm 0,101$ mg/mL). Comparativamente ao valor de referência obtido pelo ácido ascórbico ($0,004 \pm 0,001$ mg/mL) verificou-se um maior afastamento deste com as amostras OEs, do que o verificado para as amostras EXTAq (Tabela 5). Este facto permite afirmar que os OEs possuem menores características sequestradoras do radical livre DPPH°.

Que se saiba, existem muito poucos estudos que apuram valores de IC_{50} para o método DPPH° com os óleos essenciais escolhidos neste trabalho. Contudo, Sahin et al. 2014 descreveram para o OE de *O. Vulgare* um valor de IC_{50} 8,9 mg/mL. Note-se que apesar deste valor ser muito mais elevado do que o obtido no presente estudo, os valores não são diretamente comparáveis uma vez que diferiram na espécie da planta. Neste caso, o OE de *Oreganum virens* aparenta possuir melhores características antioxidantes do que o descrito para o OE de *Oreganum vulgare*. Para os outros OEs não foi possível obter correlações com outros estudos.

Em relação ao método TBARS, deve realçar-se que os óleos essenciais proveniente de *Oreganum virens* e de *Thymus vulgaris* foram muito eficientes na prevenção de peroxidação lipídica (valores de IC_{50} de $0,033 \pm 0,007$ mg/mL e de $0,040 \pm 0,008$ mg/mL respetivamente). Em contrapartida o OE de *Rosmarinus officinalis*, a pare com o de *Cymbopogon citratus* registaram a pior capacidade antioxidante lipídica ($0,371 \pm 0,063$ mg/mL e $0,408 \pm 0,03$ mg/mL, respetivamente). Já o OE de *Laurus nobilis* revelou um valor intermédio ($0,186 \pm 0,029$ mg/mL). Estes resultados aproximaram-se mais do valor de referência ($0,029 \pm 0,003$ mg/mL) relativamente aos valores obtidos para os EXTAq da mesma espécie (Tabela 5). Neste contexto os OEs, com a exceção do *Rosmarinus officinalis* e do *Cymbopogon citratos* (para os quais se obtiveram valores de IC_{50} superiores ou semelhantes aos obtidos para os EXTAqs, respetivamente), apresentaram melhores capacidades inibidoras de peroxidação lipídica.

Note-se que a determinação das capacidades antioxidantes lipídicas dos OEs das plantas em foco neste estudo, através de outros trabalhos obtidos pelo teste de TBARS são escassas, não se tendo encontrado valores de IC_{50} que permitissem uma comparação com os valores obtidos neste trabalho.

Tabela 7: Resultados da atividade antioxidantes dos OES das diversas plantas usadas neste estudo, expressa pelos métodos DPPH^o e TBARS.

Origem Óleo essencial	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	TBARS IC ₅₀ (mg/mL)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	2,669 ± 0,870 ^d	0,371 ± 0,063 ^c
<i>Oreganum virens</i>	0,575 ± 0,007 ^a	0,033 ± 0,007 ^a
<i>Thymus vulgaris</i>	0,437 ± 0,101 ^b	0,040 ± 0,008 ^a
<i>Laurus nobilis</i>	0,298 ± 0,084 ^c	0,186 ± 0,029 ^b
<i>Cymbopogon citratos</i>	ND [*]	0,408 ± 0,03 ^c
Referência	0,004 ± 0,001 ^e (ácido ascórbico)	0,029 ± 0,003 ^a (trolox)

*ND – não foi possível determinar; Diferentes letras (a-e) *superscript* na mesma coluna indicam variações significativas (P < 0,05).

Na Tabela 8 encontram-se os resultados dos efeitos antimicrobianos dos OEs das diversas plantas, relativas às estirpes *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Tabela 8: Resultados da atividade antimicrobiana dos OEs, expressa em CMI e CML.

Origem do Óleo essencial	Concentração Mínima Inibitória (mg/mL)			Concentração Mínima Letal (mg/mL)		
	<i>Salmonella</i> ^Δ	<i>Listeria</i> ^β	<i>S.aureus</i> [∞]	<i>Salmonella</i> ^Δ	<i>Listeria</i> ^β	<i>S.aureus</i> [∞]
<i>Thymus vulgaris</i>	0,60	0,30	0,60	0,60	0,60	0,60
<i>Oreganum virens</i>	1,25	0,30	1,25	1,25	1,25	1,25
<i>Cymbopogon citratos</i>	1,25	0,60	0,60	1,25	1,25	0,60
<i>Laurus nobilis</i>	5,00	0,30	1,25	5,00	1,25	1,25
<i>Rosmarinus officinalis</i>	5,00	1,25	5,00	10,00	10,00	10,00

^Δ - *Salmonella typhimurium*; ^β - *Listeria monocytogenes*; [∞] - *Staphylococcus aureus*.

Os resultados globais da Tabela 8 indicaram que o óleo de *Thymus vulgaris* foi o que revelou os resultados mais promissores, com valores de CMI de 0,30 mg/mL para a *L. monocytogenes* e de 0,60 mg/mL para as estirpes *S. typhimurium* e *S.aureus*, bem como valores de CML de 0,60 mg/mL para as 3 estirpes estudadas. Para além deste óleo, foram também encontrados valores relativamente baixos de CMI e de CML (até 1,25 mg/mL) para os óleos de *Oreganum virens* e *Cymbopogon citratus*. Resumindo, estes OEs apresentaram valores de CMI

semelhantes (1,25 mg/mL) contra *S. typhimurium* e valores de CML semelhantes (1,25 mg/mL) contra *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*. Ainda para este dois OEs, nos restantes resultados obtidos, para a estirpe *S. aureus* a ação inibitória e letal foi mais eficiente com a interação do OE de *Cymbopogon citratos*, enquanto para a estirpe *L. monocytogenes* o OE de *Oreganum virens* registou maior capacidade inibitória do seu crescimento.

Relativamente ao OE de *Laurus nobilis* os resultados mostraram um ponto fraco nas suas capacidades inibitórias e letais contra a *S. typhimurium*. Em contrapartida destacou-se a sua capacidade inibitória eficiente (0,30 mg/mL) sobre a estirpe *L. monocytogenes*.

O OE de *Rosmarinus officinalis* foi o que apresentou menores capacidades antimicrobianas, visto que relativamente aos outros OE necessitou de maiores concentrações para inibir as três estirpes e para ser letal necessitou de concentrações de 10,00 mg/mL para ambas as estirpes.

De forma a facilitar uma comparação da capacidade antibacteriana dos OEs contra estas estirpes de bactérias (Tabela 8) e as descritas na literatura para os homólogos OEs e estirpes (Tabela 3), os resultados de MIC foram resumidos na Tabela 9.

Tabela 9: Compilação dos resultados obtidos no presente trabalho e os descritos na literatura, relativos à atividade antimicrobiana dos OEs, expressa em CMI.

Origem do Óleo essencial	Concentração Mínima Inibitória (mg/mL)*		
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>
<i>Thymus vulgaris</i>	0,60 (0,40-20,00)	0,30 (0,15-0,83)	0,60 (0,12-2,50)
<i>Oreganum virens (O.vulgare)</i> ^Δ	1,25 (0,08-1,25)	0,30 (0,5-1,25)	1,25 (0,42-1,25)
<i>Cymbopogon citratos</i>	1,25 (2,50-5,00)	0,60 (1,25-8,3)	0,60 (0,12-2,50)
<i>Laurus nobilis</i>	5,00 (5,00-9,10)	0,30 (1,1-2,52)	1,25 (5,00-20,00)

*Os valores bibliográficos da CMI encontram-se entre parêntesis. ^Δ - Valores bibliográficos relativos ao *Oreganum vulgare*.

Através da análise da Tabela 9 foi possível constatar que os valores experimentalmente obtidos neste trabalho ou se enquadraram nos respetivos intervalos de valores descritos na literatura para todas as estirpes ou foram inferiores.

Numa rápida análise de comparação com os resultados de CMI e CML obtidos para os EXTAqs (*Thymus vulgaris*, *Oreganum vulgare* e *Salvia officinalis*) (Tabela 6), é possível concluir

que em relação às obtidas para os EXTAq, visto que estes últimos apresentaram como mínima concentração inibitória e letal 2,5 mg/mL os OEs possuíram melhores capacidades letais e inibitórias de crescimento bacteriano.

3.1.4 Escolha do óleo essencial e extrato aquoso com base nos resultados

Resumidamente, relativamente aos EXTAqs, os OEs, possuíram melhores propriedades antibacterias e antioxidantes lipídicas. Em contrapartida os EXTAqs registaram ser melhores sequestradores do radical livre DPPH.

No geral tanto nos OEs como nos EXTAqs, o *Oreganum spp.* e o *Thymus vulgaris* foram os que se revelaram mais constantes, com as melhores características antimicrobianas, antioxidantes e também com maiores CFT. Com base nisso, foi através destes dois géneros de plantas que recaíram as opções para a aplicação no estudo. No entanto devido à disponibilidade da matéria-prima (quantidade limitada) para trabalhar e tempo para realizar os ensaios, necessitou-se de selecionar apenas uma amostra de OE e de EXTAq. Essa decisão teve o contributo dos profissionais da empresa Irmãos Monteiro, SA, que através dos seus *know-how*, se mostraram mais recetivos à experimentação e aplicação do OE *Oreganum virens* e EXTAq *Oreganum vulgare*.

3.2 Desenvolvimento, otimização e caracterização de biofilmes incorporados com o extrato e óleo essencial de oregão

3.2.1 Constituição do concentrado de proteína de soro de leite

Existem no mercado vários produtos à base de proteínas de soro desidratadas com diferentes composições químicas. Nomeadamente em relação aos seus teores proteicos que podem ser variáveis numa gama muito alargada (14 - 90%) (Cezar, 2012). O concentrado de proteína de soro (CPS) utilizado neste trabalho foi produzido na Oficina Tecnológica de Lacticínios da ESAC, e devido a oscilações nos parâmetros químicos nos lotes de CPS, considerou-se apropriado avaliar a sua composição e características químicas. Os resultados obtidos destas análises encontram-se resumidas na Tabela 10.

Tabela 10: Composição e características químicas do CPS

	Análise	Resultado
Composição Química (%)	Cinzas	12,00 ± 1,09
	Proteína	41,74 ± 0,27
	Gordura	2,00 ± 0,00
	Hidratos Carbono	44,26 ± 0,00
Outros Parâmetros Químicos	pH	5,83 ± 0,06
	Acidez titulável (%)	20,53 ± 0,71
	Extrato seco (%)	99,52 ± 0,02
	Humidade (%)	0,48 ± 0,01

3.2.2 Otimização dos biofilmes controlo e com incorporação de extratos aquosos ou OEs de oregão

A otimização da formulação dos biofilmes controlo (sem adição de OE ou extrato) é necessária para que estes apresentem as características desejadas, sejam produzidos de forma uniforme, facilmente reprodutíveis e para que seja possível proceder à adição de EXTAq e de OEs. Para otimização dos biofilmes controlo foi necessário adaptar as quantidades e volumes das diversas matérias-primas. É importante realçar que o conteúdo proteico do CPS era de aproximadamente 41,74% (Tabela 10) e que a solução final de biofilme foi efetuada com 10% de proteína, de acordo com os estudos efetuados por Ramos (2009).

Numa primeira etapa do trabalho (I, Tabela 11), procedeu-se à formulação dos biofilmes controlo por utilização de CPS e sem adição de glicerol, tendo-se observado que os biofilmes resultantes eram demasiado frágeis e quebradiços para serem manipulados fora das caixas de petri. Yoshida e Antunes (2004) descreveram o mesmo problema. Segundo esses autores, os biofilmes eram frágeis e sensíveis à fratura à medida que iam desidratando, devido à forte coesão polimérica da matriz.

Para contornar este tipo de problemas, normalmente são adicionados plastificantes em baixas concentrações (Yoshida e Antunes, 2004). De facto, as moléculas de plastificante (ex. glicerol) reduzem as forças atrativas entre as cadeias proteicas adjacentes, pelo alongamento e aumento do volume livre das cadeias, aumentando a viscoelasticidade e extensibilidade da

matriz, fornecendo assim estabilidade e resistência ao biofilme (Yoshida e Antunes, 2004). Tendo isso em consideração, numa segunda fase desta tarefa (II, Tabela II) foi utilizado glicerol na formulação dos biofilmes, com concentrações variáveis de 10, 20 e 30%. Porém, estas formulações resultaram em biofilmes demasiados viscosos, cuja manipulação fora da caixa de petri também não era possível.

Atendendo aos resultados anteriores, a terceira fase de otimização na formulação de biofilmes controlo foi efetuada com uma concentração de apenas 5% de glicerol, tendo-se conseguido a obtenção de biofilmes com as características pretendidas, nomeadamente a sua fácil remoção do suporte e seu manuseamento, após o tempo de secagem, para a sua caracterização físico-química. Na Figura 7A encontra-se uma imagem representativa deste biofilme.

Tabela II: Avaliação de biofilmes controlo formados a partir de diferentes formulações efetuadas no processo de otimização.

Condição Experimental	Composição*			Observações/ Propriedades do Biofilme	Avaliação Final
	CPS (Proteína) (% m/m)	Glicerol (% m/m)	Água (%m/m)		
I	24 (10)	-	76	Biofilme seco e quebradiço	Rejeitado
II	24 (10)	10, 20 ou 30	66, 56 ou 46	Biofilme demasiado viscoso	Rejeitado
III	24 (10)	5	71	Biofilme com propriedades pretendidas	Formulação aceite

* Composição das formulações efetuadas para 100g de biofilme.

Após a otimização dos biofilmes controlo efetuaram-se várias formulações com introdução de OE e de EXTAq de orégão numa gama de concentrações entre 0,1% - 0,5%. As várias concentrações não modificaram as propriedades que se tinham registado nos biofilmes controlo otimizados. Contudo registou-se uma ligeira alteração na textura, com o aparecimento de saliências na superfície dos biofilmes com OE (BO) e biofilmes com EXTAq (BE), mas mais salientes no BO. A título de exemplo, a Tabela 12 indica a composição detalhada das formulações de biofilmes contendo uma concentração de OE ou EXTAq de

0,5%, bem como as principais observações efetuadas. Ainda, os biofilmes testes resultantes destas formulações são apresentados na Figura 7B e 7C, para biofilme com EXTAq e OE respetivamente.

Tabela 12: Composição da solução dos biofilmes com concentração de 0,5% (m/m) de OE e EXTAq e respetiva avaliação das propriedades.

Componente	Composição* (% m/m)	Observações (BO ^A)	Observações (BE ^A)
Glicerol	5,0	Manutenção das propriedades registadas no biofilme controlo otimizado.	Manutenção das propriedades registadas no biofilme controlo otimizado.
CPS	24,0		
dos quais: proteína	10,0		
H₂O	68,0	Acentuado desenvolvimento de saliências na superfície do biofilme.	Desenvolvimento de saliências na superfície do biofilme.
Solução de OEs/EXTAq	3,0		
dos quais: OEs/EXTAq	0,5		
Etanol/Água	2,5		

*Composição das formulações efetuadas para 100g de biofilme. ^ABO- Biofilme com OE de *Oreganum virens* incorporado; BE - Biofilme com EXTAq de *Oreganum vulgare* incorporado.

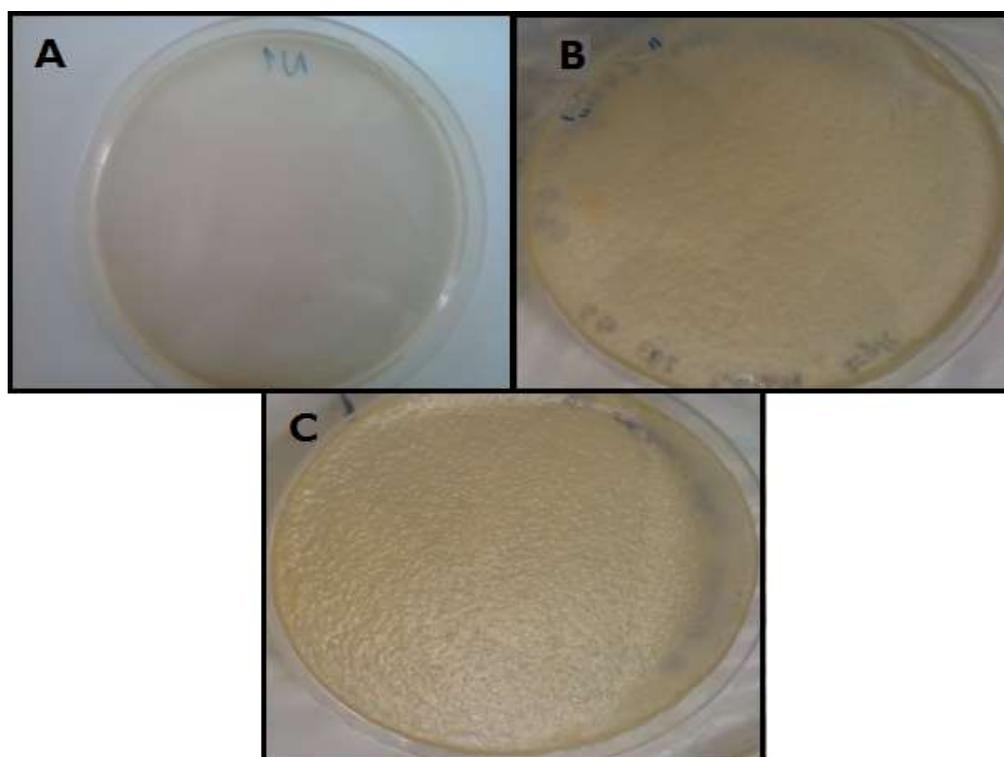


Figura 7: Resultado dos primeiros testes de biofilmes otimizados. (A) - Biofilme Controlo; (B) - Biofilme incorporado com EXTAq (0,5%) de *Oreganum vulgare*; (C) - Biofilme incorporado com OE (0,5%) de *Oreganum virens*.

3.2.3 Parâmetros físico-químicos dos Biofilmes

As análises físico-químicas foram efetuadas ao biofilme controlo e aos biofilmes contendo diferentes concentrações de OE (0,3%; 0,75%; 1,0% e 1,2%) ou de EXTAq (2,5%; 5% e 7,5%), ambos provenientes de *Oreganum virens* e *Oreganum vulgare*, respetivamente. A escolha destas concentrações foi efetuada tendo em consideração os intervalos de valores definidos por diversos autores, em estudos efetuados com biofilmes proteicos.

3.2.3.1 Espessura

A primeira característica testada nos biofilmes após o processo de produção foi a sua espessura. Esta característica encontra-se registada na Figura 8 e após a sua análise é possível afirmar que as diferentes concentrações de OE e EXTAq utilizadas não influenciam a espessura do biofilme.

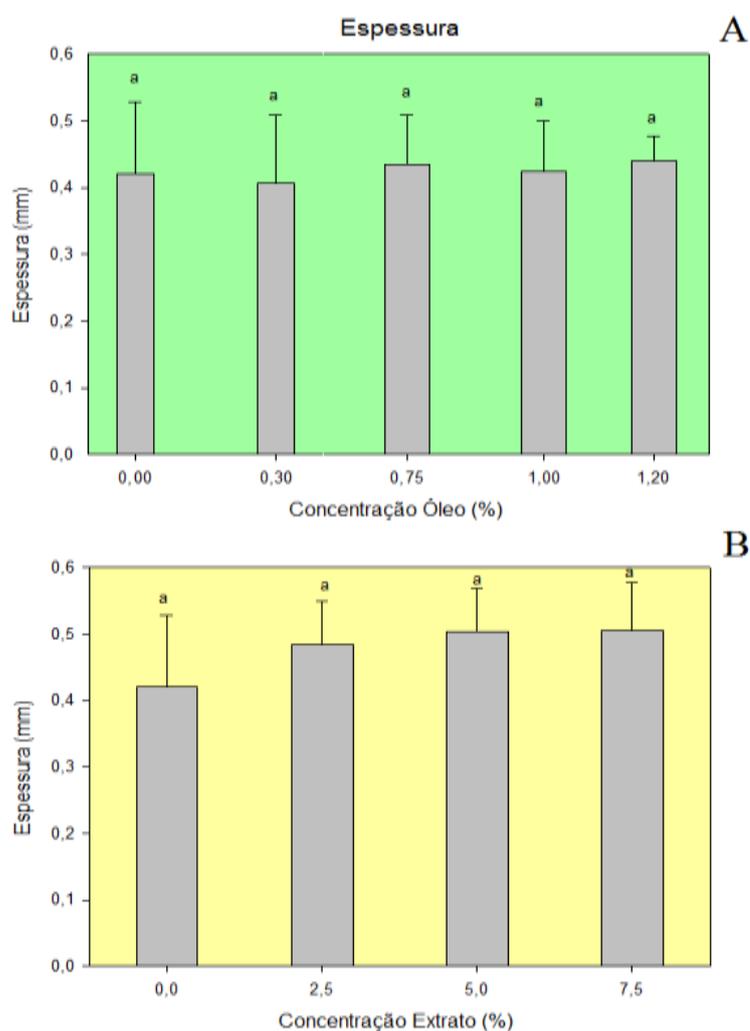


Figura 8: Espessura dos biofilmes com OE (A) e com EXTAq (B). Letras iguais (a) na parte superior das barras indicam ausência de diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.2.3.2 Cor

Em termos de evolução da cor com o aumento da concentração de OE (Figura 9A) é possível observar que não existem alterações significativas na cor dos BO. Com base na Figura (Figura 10A), correspondente ao biofilme com maior concentração de OE testado (1,2%), observa-se que este manteve uma cor branca, semelhante à do biofilme controlo e BO teste de concentração 0,5% (Figura 7A e 7C respetivamente). De forma oposta, no BE (Figura 9B), a alteração de cor foi expressiva logo para a concentração mínima testada de EXTAq (2,5%), verificando-se mesmo o maior valor de ΔE nessa concentração e assim contrariando o esperado (previsão de obtenção de biofilmes mais escuros com o aumento da concentração de extrato). Numa análise a “olho-nu” foi possível verificar esta influência da concentração de EXTAq (Figura 10A) na formulação do biofilme. O biofilme com 2,5% apresentou uma tonalidade castanha, bastante diferente do controlo (Figura 7A) e também do biofilme teste de concentrações de extrato 0,5% (Figura 7B). Assim a cor mais escura só foi verificada para concentrações superiores, neste caso só se constatou a partir de concentrações de 2,5% de EXTAq.

Note-se contudo que os ensaios efetuados neste estudo não permitem tirar qualquer conclusão sobre a alteração de cor no BO de concentrações mais elevadas (>1,2%).

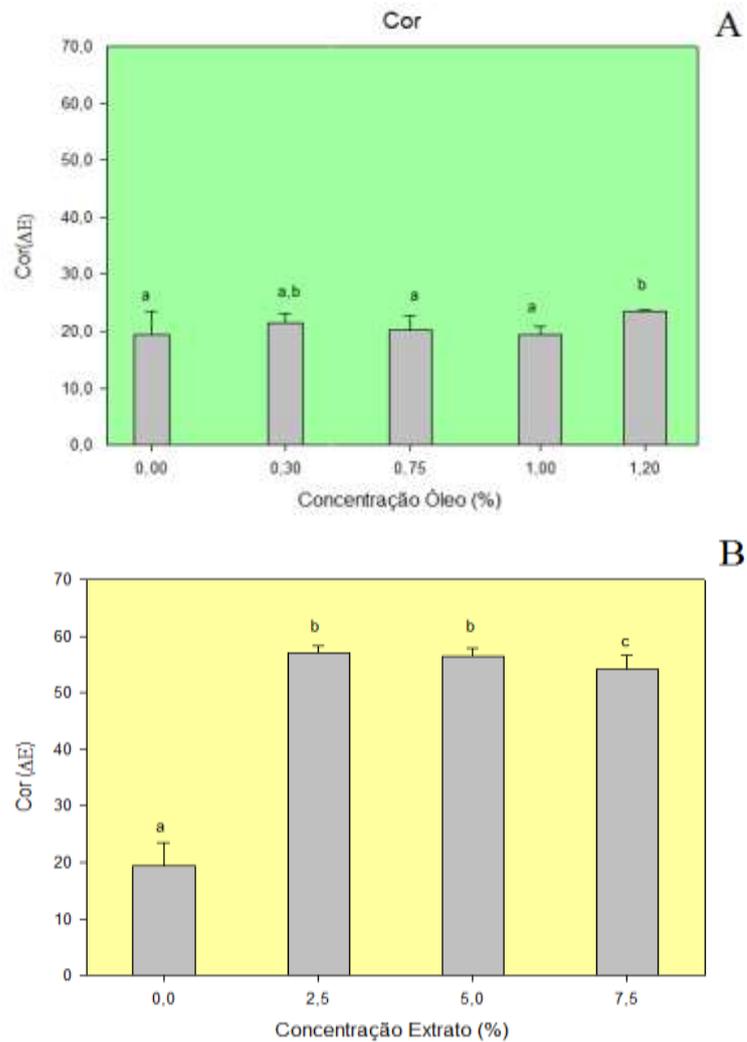


Figura 9: Cor (ΔE) dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B). Diferentes letras (a-c) na parte superior das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

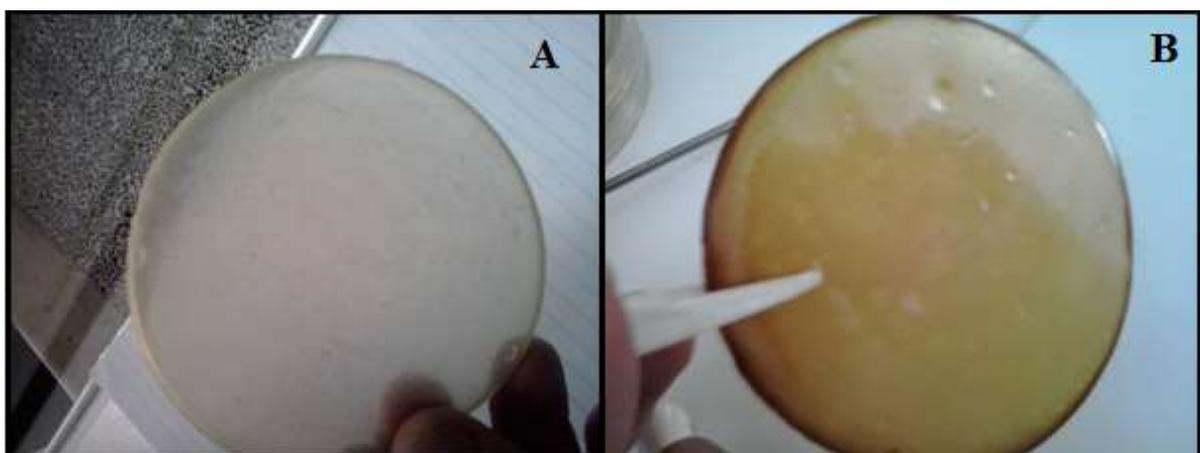


Figura 10: Exemplificação da aplicação de OE (1,2%) e EXTAq (2,5%) nos Biofilmes. (A) - Biofilme incorporado com óleo essencial de *Oreganum virens* com concentração 1,2%; (B) - Biofilme incorporado com extrato de *Oreganum vulgare* com concentração 2,5%.

3.2.3.3 Transparência

Na Figura 11 encontra-se representada a característica transparência dos biofilmes. Esta característica indicou a maior ou menor capacidade da passagem de luz através do biofilme, pelo que este teste está relacionado com a respetiva coloração dos biofilmes. Por isso, e em semelhança à Figura 9, verificou-se uma diferença muito significativa entre os biofilmes com OE e com EXTAq.

Nos BO, a transparência não sofreu alterações significativas com o aumento da concentração (Figura 11A), pelo que este resultado está em conformidade com o registado na avaliação da cor (Figura 9A). Por outro lado, e ao contrário do esperado, a transparência dos BE foi significativamente superior à do biofilme controlo, apesar da sua coloração castanha. Contudo, entre as três amostras BE verificou-se uma ligeira correspondência (embora não significativa) entre a diminuição da cor nas amostras BE (Figura 9B) e o aumento da transparência (Figura 11B).

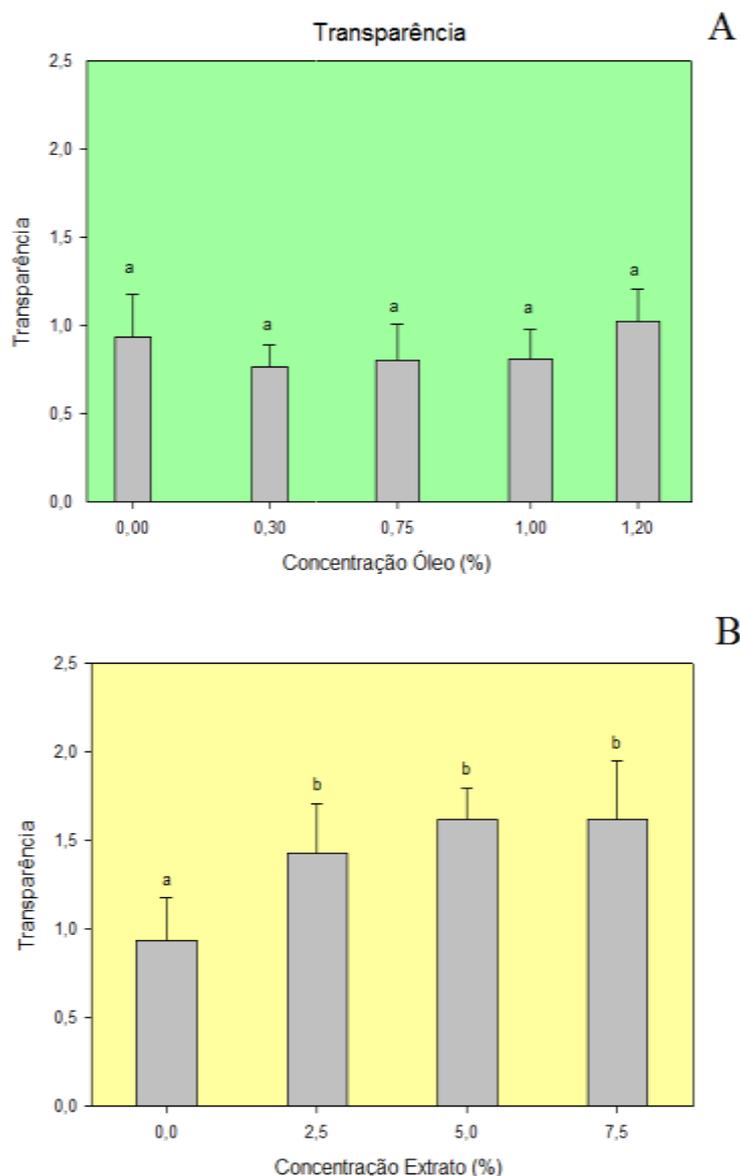


Figura 11: Transparência dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B). Diferentes letras (a-b) na parte superior das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.2.3.4 Humidade

De acordo com a Figura 12 foi possível verificar uma diminuição da humidade dos biofilmes com o aumento da concentração dos OE ou EXTAq incorporados. Este facto pode ser explicado tendo por base a formulação dos biofilmes, uma vez que ao serem adicionados OE/EXTAq, a quantidade de água adicionada diminuiu na formulação. Como tal era previsível esta diminuição na % de humidade com o aumento da concentração, pelo que os resultados estão dentro do esperado.

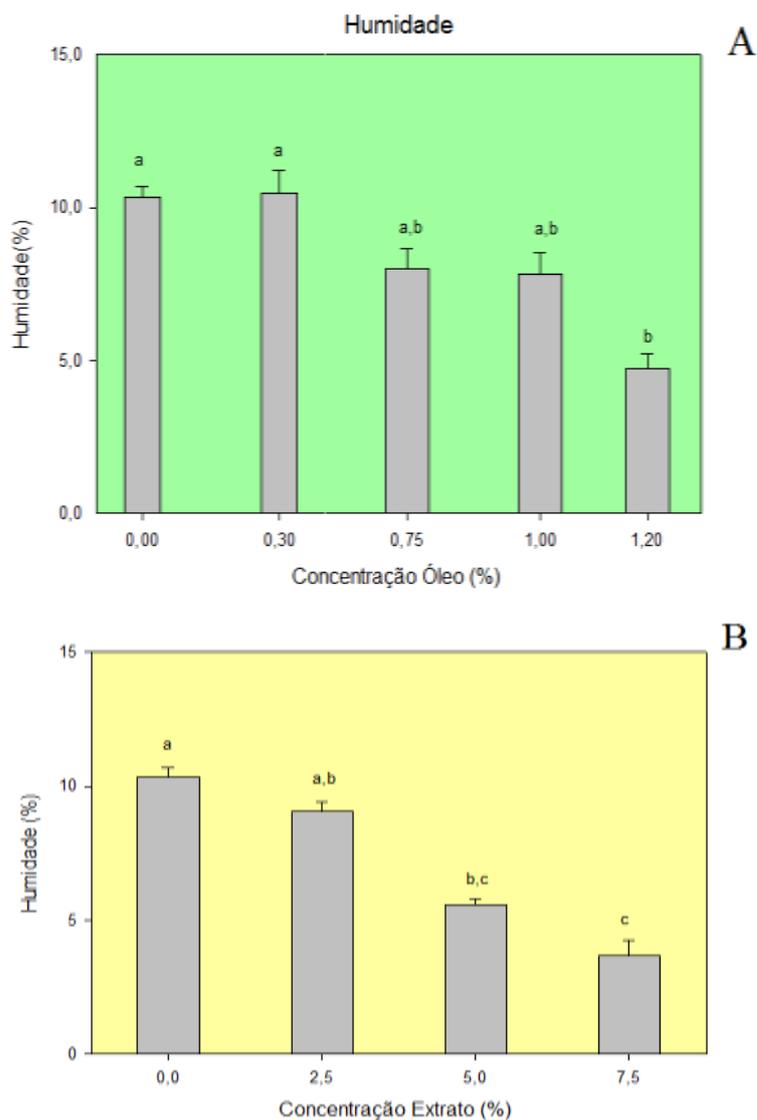


Figura 12: Humidade dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B). Diferentes letras (a-c) na parte superior das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.2.3.5 Solubilidade

Na Figura 13 encontram-se representados os resultados da solubilidade dos biofilmes em água. Da sua análise foi possível concluir que os biofilmes controlo e enriquecidos em OE ou EXTAq possuíam uma elevada solubilidade em água, que se situa acima dos 90%. Ainda esse valor não foi afetado significativamente para concentrações mais elevadas de OE ou extrato (I3A e I3B). Note-se que a elevada solubilidade destes biofilmes se deveu principalmente às características hidrofílicas naturais dos biofilmes de proteína de soro de leite (Seydim e Sarikus, 2006).

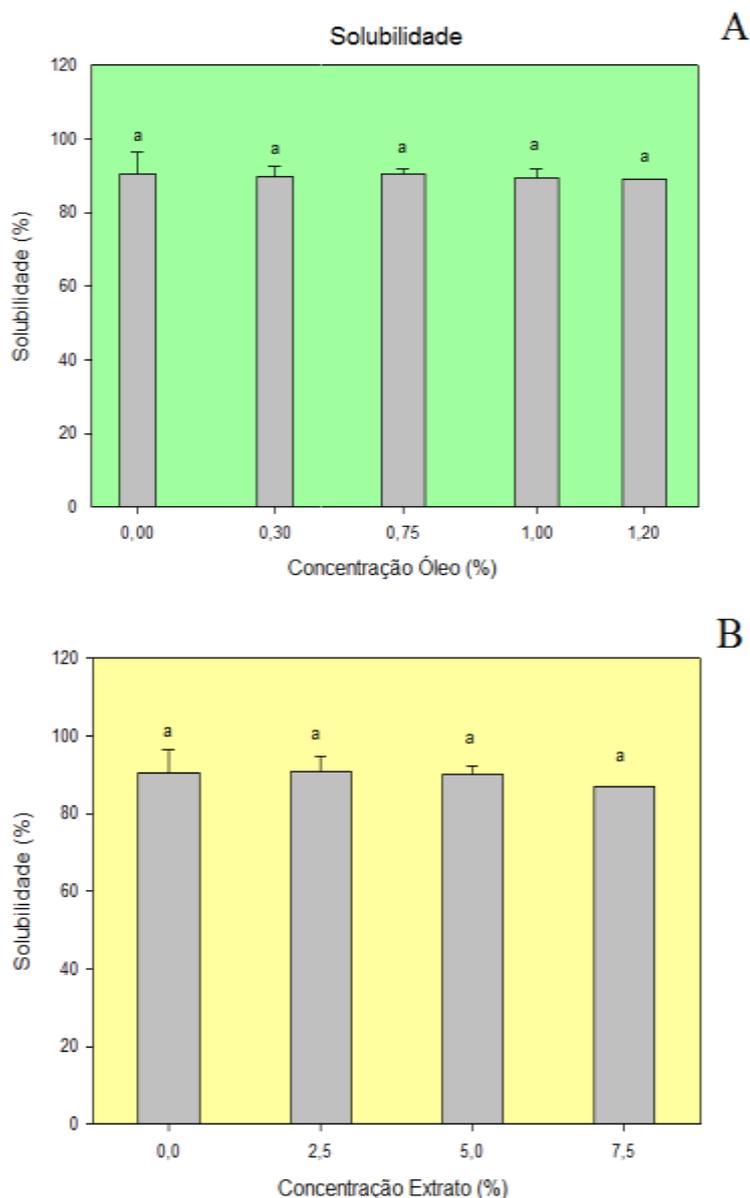


Figura 13: Solubilidade em água dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B). Letras iguais (a) na parte superior das barras indicam ausência de diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.2.3.6 Permeabilidade ao vapor de água

A análise da permeabilidade ao vapor de água permitiu simular e demonstrar as características de barreira à água das diversas amostras de biofilme. Seydim e Sarikus (2006) indicaram esta característica como sendo um ponto negativo nos biofilmes de proteína de soro de leite, apontando no entanto que esta pode ser melhorada com a adição de substâncias hidrofóbicas. Neste trabalho foi possível observar esta influência com a adição de OE, como principal agente hidrofóbico.

A adição de OE aos biofilmes diminuiu a permeabilidade ao vapor de água, quando adicionado nas concentrações de 0,30% e 0,75% (Figura 14). Contudo, este efeito não se verificou para os biofilmes contendo OE nas concentrações de 1% e 1,2%, onde se registaram valores de permeabilidade semelhantes às do biofilme controlo. Atendendo a estes resultados, é possível justificar que para concentrações elevadas de OE existiu um novo rearranjo na matriz que retirou o efeito hidrofóbico pretendido do OE.

Como esperado, a incorporação de EXTAqs não influenciou a permeabilidade dos biofilmes nas diversas concentrações testadas. Em oposição, para maiores valores de concentração de EXTAqs esse valor de permeabilidade tende também a aumentar.

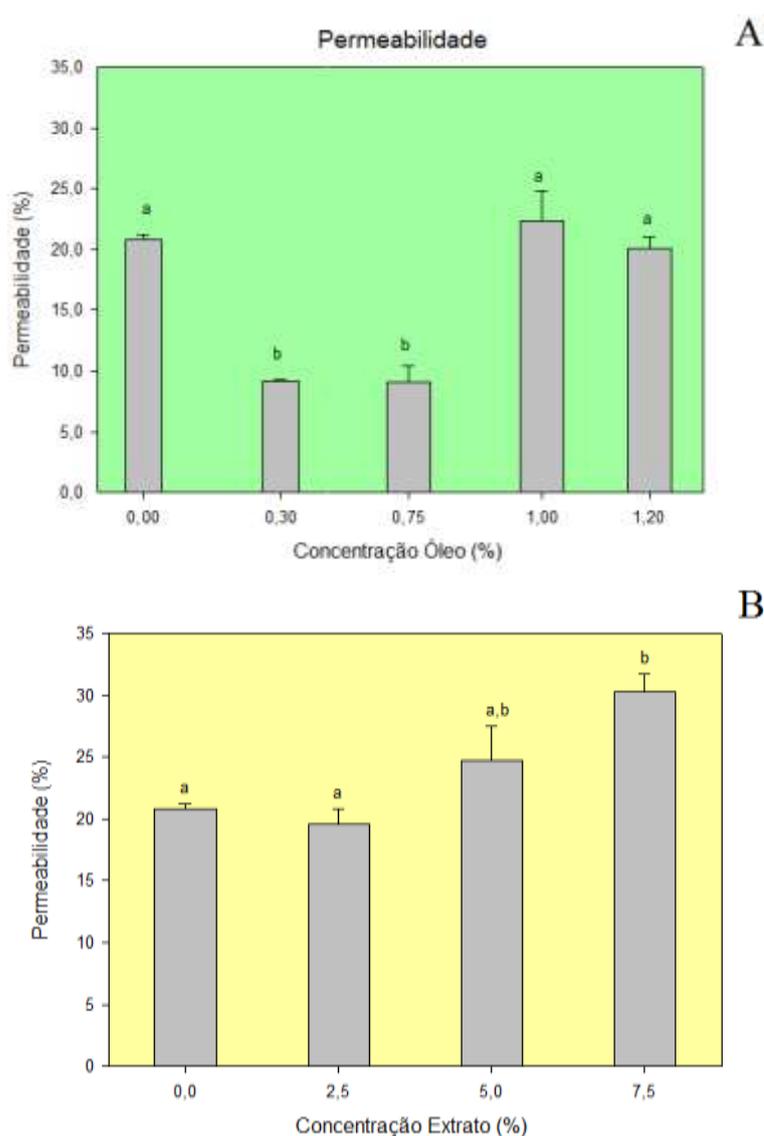


Figura 14: Permeabilidade ao vapor de água dos biofilmes com OE (A) e EXTAq (B). Diferentes letras (a-b) na parte superior das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.3 Aplicação da solução de biofilme incorporada com extrato e/ou óleos essencial de orégão em produtos cárneos e monitorização da sua capacidade de preservação

3.3.1 Escolha do revestimento edível de origem proteica

Neste tópico é importante realçar que embora o desenvolvimento inicial deste trabalho fosse para a aplicação de biofilmes (película sólida) em produtos cárneos, esta aplicação foi substituída pela formulação do biofilme no estado líquido, integrando o produto como uma camada uniforme na superfície (*coating*). Esta alternativa teve por base os principais motivos: 1) escassez de matéria-prima (CPS, EXTAq e OE) para a aplicação de uma película sólida pré-formada em toda a superfície das amostras; 2) a aplicação na forma de biofilme implicaria a sua produção em escala e otimização das películas sólidas aos produtos; 3) falta de condições físicas que permitissem em tempo útil a secagem de grande número de biofilmes; 4) Apesar desta variação, deve-se referir que alguns autores consideram que o revestimento em forma de solução de biofilme possui algumas propriedades semelhantes às dos biofilmes (Galus e Kadzinska, 2015) (Ugalde, 2014) e por isso a sua aplicação manteve a intenção de melhorar a conservação dos produtos cárneos. Por uma questão de simplificação, a terminologia biofilme será utilizada neste trabalho para designação dos biofilmes sólidos ou das suas soluções.

Com base nisto a comparação direta entre as características dos biofilmes obtidos na secção 3.2.3 e os biofilmes aplicados às alheiras e painhos não foi possível de se efetuar. Contudo, as propriedades verificadas anteriormente com os biofilmes permitem ter a noção da sua interação ao vapor de água, solubilidade, efeito barreira, bem como a de indução na alteração de cor do produto. Na prática, a quantidade adicionada parece não ter influência no alimento da mesma forma que se constatou nos ensaios físico-químicos, no entanto o primordial foi servir de matriz para os OE/EXTAq.

3.3.2 Escolha da percentagem de OE e EXTAq a adicionar na formulação da solução de biofilme

A percentagem de OE (*Oreganum virens*) ou EXTAq (*Oreganum vulgare*) escolhida para a formulação dos biofilme a aplicar nos produtos cárneos foi escolhida tendo em consideração os dados bibliográficos descritos e outros fatores abaixo mencionados. De facto, apesar de terem sido efetuadas várias tentativas no sentido de se perceber de que forma a

incorporação de OE/EXTAq no biofilme afetava as propriedades antimicrobianas dos mesmos contras as estirpes patogénicas (*S.typhymurium*, *S.aureus* e *L.monocytogenes*), esta questão não foi elucidada em tempo útil, tendo-se assim recorrido a dados bibliográficos publicados com biofilmes enriquecidos em OE/ EXTAq (de várias espécies) e com efeitos efetivos na proteção de crescimento bacteriano.

Os OEs foram descritos com incorporações na solução de biofilme numa gama de percentagens de 1% (Oussalah et al., 2004), 1% a 4% (Seydim e Sarikus, 2006), 0,5% a 1,5% (Zinoviadou, Koutsoumanis e Biliaderis 2009), 0,5% e 1% (Galus e Kadzinska, 2015) e 1%, 2,5% e 5% (Ugalde, 2014). Perante isto optou-se por seguir a bibliografia e utilizar uma concentração de óleo essencial neste intervalo de valores 0,5% - 4%. Contudo, foi também tomada em consideração as fortes características sensoriais do próprio OE, uma vez que não se pretendia alterar as propriedades organoléticas dos produtos cárneos em consequência da aplicação do BO.

Naturalmente o aroma do alimento é um ponto que condiciona muito as opções do consumidor e que por isso, é muito importante preservar ou pelo menos não alterar de forma negativa. A opção por aplicação do OE em biofilme em alternativa à sua aplicação direta como ingrediente do produto cárneo poderá ser vantajosa, uma vez que o biofilme apenas terá a sua ação central na superfície do produto. Neste caso, embora exista migração de biofilme e óleo para o interior do produto, não causará tanto impacto organolético e por essa razão é provável que o OE possa ser utilizado em maior percentagem sem que o produto sofra alterações sensoriais indesejadas (Burt, 2004). Para além disso como a aplicação é à superfície, o biofilme poderá ser removido antes do consumo (reduzindo ainda mais possíveis efeitos organolépticos). Considerando todos estes fatores, a percentagem de OE *Oreganum virens* escolhida para utilização nos biofilmes para revestimento dos produtos foi de 1%.

A escolha da percentagem de extrato a utilizar no biofilme foi efetuada tendo por base os mesmos princípios, embora o tema dos estudos bibliográficos de biofilmes com EXTRAq fosse mais direcionado para atividade antioxidante e não antimicrobiana. Assim, atendendo à incorporação de extratos de várias espécies de plantas em biofilme e soluções de biofilmes, foram descritos valores entre 0,5% e 20% (Betz e Kulozik, 2011) (Betz et al., 2012) (Cruz, et al., 2013). Relativamente à possível influência organoléptica, comparativamente com o OE (para uma mesma concentração) a influência organoléptica do EXTAq prevê-se que seja

menor. O mesmo se verifica para a capacidade antimicrobiana, em comparação com o OE. Com base nisso, a percentagem escolhida teria de ser superior em relação à do OE. Assim, optou-se pela utilização de uma percentagem de 7,5% de extrato de *Oreganum vulgare* na matriz do biofilme.

3.3.3 Resultado da aplicação da solução de biofilme

O resultado final da aplicação do biofilme pode ser observado em duas perspetivas: 1) visualização da superfície do produto, exemplificado pela alheira (Figura 15); 2) visualização do produto (alheira e painho) após o embalamento (Figura 16).

Na perspetiva I (Figura 15) foi possível constatar um aspeto mais vivo e brilhante dos produtos. Adicionalmente a cor branca da solução de biofilme com OE e a cor castanha da solução do biofilme com EXTAq pareceu não ter uma ação direta na alteração da cor natural das amostras. Note-se que na Figura 15 apenas está exemplificado um tipo de biofilme (BO). Após o embalamento não se registaram diferenças significativas na distinção entre amostras controlo e com as soluções de BO e BE. Na Figura 16 encontram-se exemplificados as amostras controlo e com biofilme (BO) embaladas para ambos os enchidos.

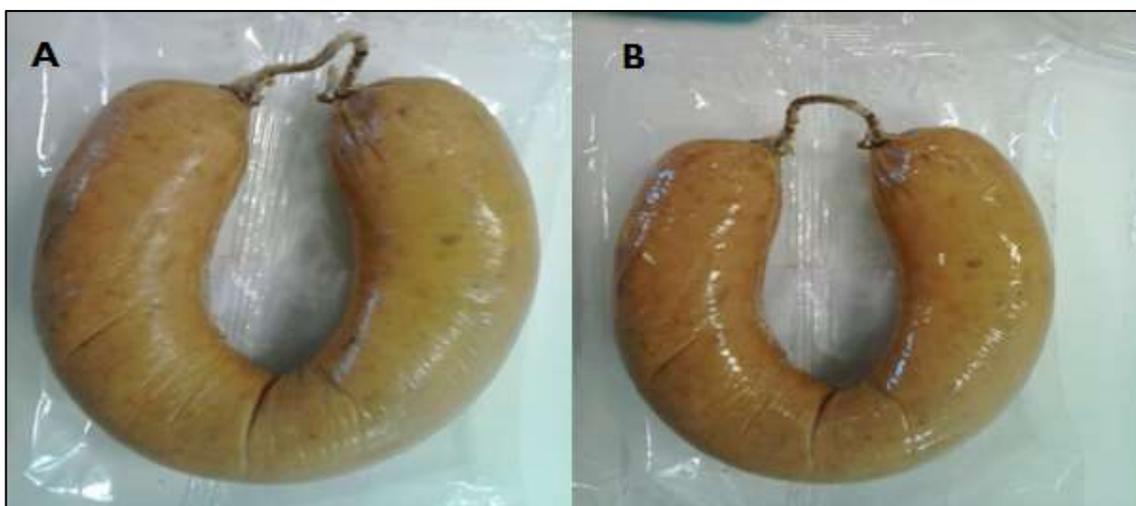


Figura 15: Exemplificação da aplicação do biofilme (BO) na alheira. (A) - Alheira sem biofilme; (B) - Alheira com biofilme.



Figura 16: Exemplificação do embalamento dos enchidos sem e com aplicação dos biofilme. (A e B) correspondem a amostras sem biofilme; (C e D) correspondem a amostras com biofilme. Nota: as manchas brancas no painho indicam gordura e não biofilme.

3.3.4 Análises microbiológicas

3.3.4.1 Resultados das análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram efetuadas com o intuito de registar as capacidades inibitórias dos biofilmes na evolução do crescimento bacteriano. Tal foi efetuado tendo por base a segurança alimentar dos produtos cárneos, isto é: 1) a pesquisa e contagem de bactérias patogénicas (*Salmonella spp.*, *S.aureus*, *E.coli* e *L.monocytogenes*), que, apesar de não terem uma influência acentuada na deterioração dos alimentos, podem causar graves problemas derivados da sua ingestão; 2) a pesquisa de microrganismos totais 30°C (MCT 30°C), cujo valor é indicativo de possíveis perdas da qualidade do produto, correspondendo

à degradação das características organolépticas dos produtos, principalmente quando o desenvolvimento destas bactérias ultrapassa os limites legais estabelecidos no regulamento (CE) nº 1441/2007, 5 de Dezembro, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Este regulamento estabelece o seguinte relativamente ao limite máximo legal dos MCT 30°C por unidades formadoras de colónias em cada grama de alimento: 9×10^6 UFC/g ou 6,95 log (UFC/g).

Os respetivos resultados estão representados nas Figuras 17 (alheiras) e Figura 18 (painhos). Como expectável, os registos de *Salmonella spp*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* das alheiras e painhos controlo (sem aplicação de biofilme) efetuados nestes produtos durante o período de validade indicado na sua embalagem (60 dias e 90 dias para alheiras e painhos, respetivamente) estavam dentro dos limites legais ditados pelo regulamento (CE) nº 1441/2007, que estabelece o seguinte relativamente ao limite máximo legal das bactérias por unidades formadoras de colónias em cada grama de alimento: *E. coli* 5×10^3 UFC/g ou 3,70 log (UFC/g); *S. aureus*: 1×10^2 UFC/g ou 2 log (UFC/g); *L. monocytogenes*: 1×10^2 UFC/g ou 2 log (UFC/g e ausência de *Salmonella spp*. em 25 g de carne. Estes resultados comprovaram o eficiente padrão de segurança alimentar por parte da empresa produtora.

Os critérios microbiológicos legais foram igualmente cumpridos para os produtos cárneos com aplicação de biofilme com OE a 1% (BO), demonstrando-se desta forma que o BO é uma opção segura, uma vez que não transporta estirpes patogénicas. Ao contrário, a aplicação de biofilme com EXTAq (BE) nas alheiras/painhos resultou na presença de colónias de *E. coli* nas contagens durante os três primeiros ensaios. Obteve-se mesmo contagens contáveis, i.e, UFC entre 30-300, para as amostras de alheira BE (Figura 17A). Esta situação, aliada a uma maior carga microbiana total a 30°C em relação ao controlo (registando-se contagens não contáveis (> 300 UFC/placa) para os primeiros ensaios) permitiu sugerir, que provavelmente, este acontecimento se devia à contaminação do próprio extrato. Assim, no futuro será importante que os procedimentos de preparação de extrato e/ou liofilização sejam controlados de forma a garantir a ausência de microrganismos no extrato final a aplicar nos biofilmes. Atendendo aos resultados desfavoráveis observados nas alheiras/painhos com BE em relação ao controlo, a monitorização de crescimento microbiano para esta condição foi abandonada após os 3 primeiros ensaios.

Uma vez que não se registaram crescimentos destas estirpes patogénicas (Figura 17A e 18A) nas amostras controlo, não foi possível obter informação sobre a capacidade do BO na

inibição do crescimento destas bactérias. Os únicos valores possíveis de obter foram os resultados de CMI e CML dos óleos livres de qualquer matriz polimérica, apresentados no ponto 3.1.3 (Tabela 8).

Por outro lado, é de salientar que em todas as placas de petri com meio de cultura Baird-parker (utilizado para crescimento seletivo de *S. aureus*) se verificou o crescimento de colónias que não correspondiam a *S. aureus*, mas sim a *Bacillus subtilis* (uma estirpe ubíqua). Apesar de não ser um teste requisitado oficialmente, optou-se por registar as colónias formadas, servindo os resultados de complementaridade aos das contagens de MCT 30°C (Figuras 17B e 18B).

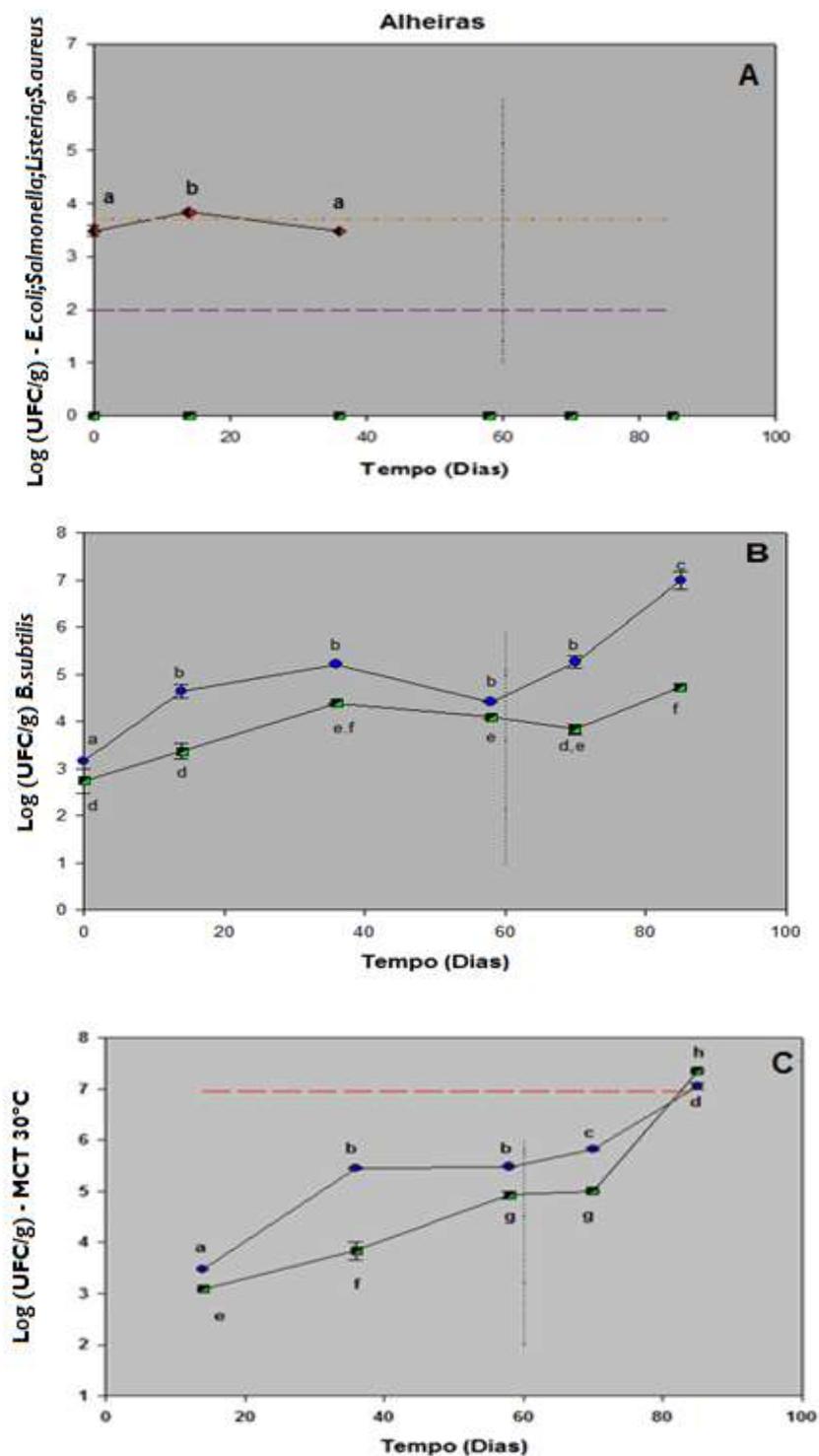


Figura 17: Contagens microbiológicas das estirpes *E. coli*, *Salmonella spp.*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* (A), *B. subtilis* (B) e MTC 30°C (C) nas amostras de alheira. Os dados a verde correspondem às amostras BO, a azul às amostras controlo e a vermelho às amostras BE. As barras horizontais a tracejado indicam os limites legais dos respetivos microrganismos. A barra vertical a tracejado indica o prazo de validade. No gráfico A a barra roxa é o limite para a *S. aureus* e *L. monocytogenes* enquanto a laranja indica o limite da *E. coli*. Diferentes letras (a-h) na parte superior e inferior dos gráficos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Numa análise detalhada à microbiologia das alheiras (Figura 17), verifica-se, para os MCT 30°C, o cumprimento dos valores máximos permitidos durante o prazo de validade do produto, tanto para a alheira controlo como para a alheira BO. Importante ainda referir que em relação à alheira controlo, os valores da carga microbiológica MCT 30°C nas alheiras BO foram inferiores ao longo de 70 dias de ensaio. Este resultado mostra o efeito do BO na inibição do crescimento destes microrganismos. Contudo, após 15 dias, ambas as amostras passaram o limite legal.

A carga microbiana total permite ter uma noção da qualidade do produto (Mendes, 2013), e de certa forma fornece dados para a determinação do prazo de validade, uma vez que quanto maior a carga microbiana, maior será a deterioração do alimento. Dentro desta análise é possível sugerir que a aplicação do BO poderá promover um prolongamento do prazo de validade da alheira BO. Contudo tal conclusão só seria possível de se tirar após obtenção de maior número de ensaios entre os 60 - 85 dias, de maneira a perceber com mais exatidão a evolução microbiana nesta faixa temporal. De forma a melhorar a visualização da evolução microbiana total, o ensaio no tempo 0 dias deveria ser repetido. Tal não foi possível por motivos de contaminação das placas de petri com fungos. No que respeita à Figura 17B, constata-se mais uma vez que a evolução do número de colónias de bacilos formada nas alheiras controlo foi superior às colónias das alheiras BO.

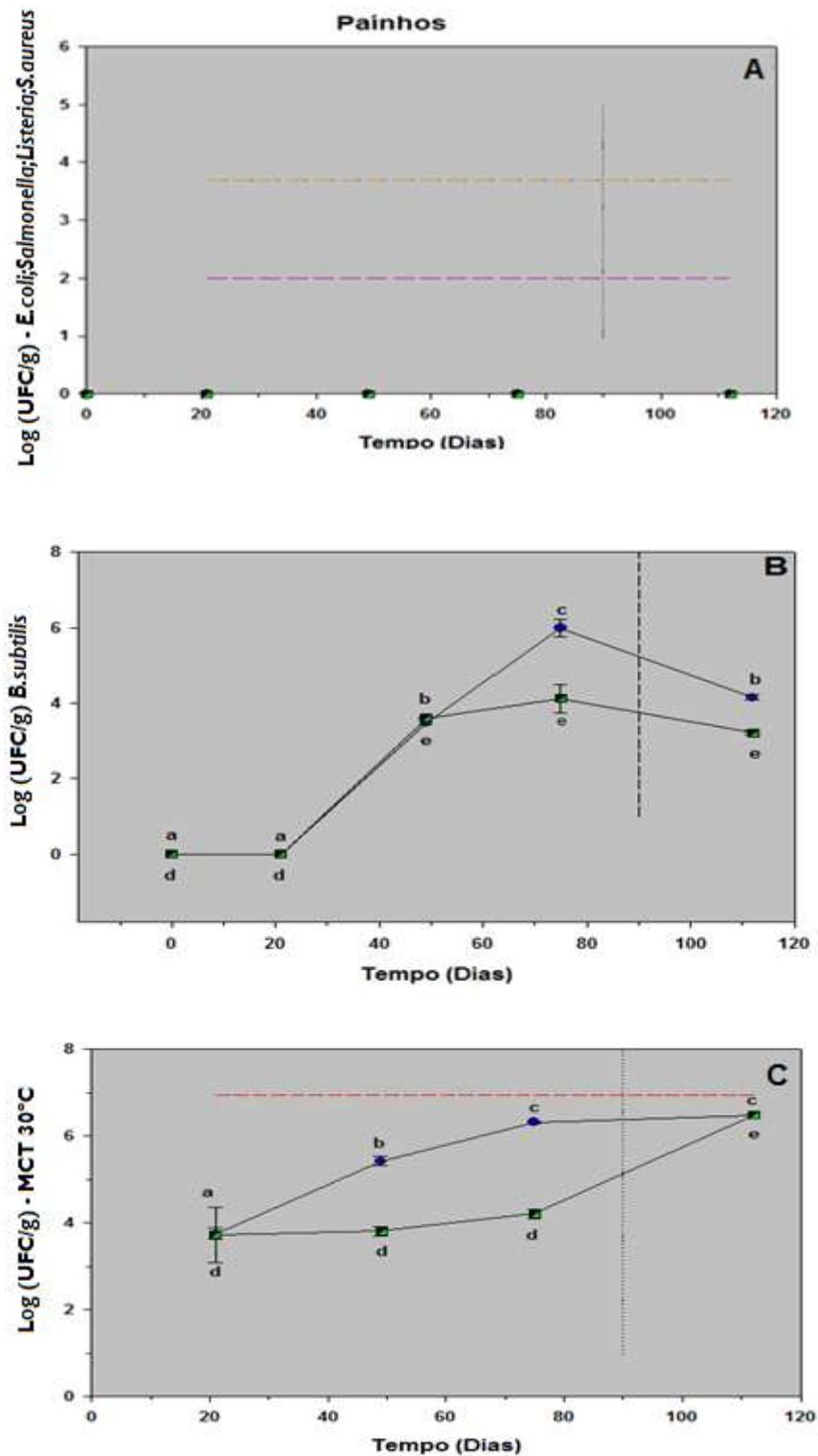


Figura 18: Contagens microbiológicas das estirpes *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* e *L. monocytogenes* (A), *B. subtilis* (B) e MTC 30°C (C) nas amostras de painhos. Os dados a verde correspondem às amostras BO e a azul às amostras controlo. As barras horizontais a tracejado indicam os limites legais dos respetivos microrganismos. A barra vertical a tracejado indica o prazo de validade. No gráfico A a barra roxa é o limite para a *L. monocytogenes* e *S. aureus* enquanto a laranja indica o limite da *E. coli*. Diferentes letras (a-e) na parte superior e inferior dos gráficos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

A evolução da carga microbiana total nos painhos apresentou a mesma tendência da apresentada nas alheiras. Contudo, também neste caso o ensaio após o prazo de validade foi efetuado com uma gama de tempo demasiado larga, o que não permitiu verificar tendência de uma evolução maior ou menor em relação ao controlo. Assim, à semelhança ao que foi justificado nas alheiras, estes ensaios terão de ser complementados com ensaios adicionais, de forma a ser possível tirar conclusões mais sólidas sobre o possível prolongamento do tempo de vida do produto pela aplicação de BO no painho. Note-se que apesar de uma resistência nos primeiros 3 ensaios, a evolução do número de colónias de bacilos formada nos painhos controlo foi superior às colónias das alheiras BO (Gráfico B da Figura 18).

Apesar das análises após os prazos de validade não serem as mais favoráveis, é possível afirmar que os BO podem ter uma influência positiva na inibição do desenvolvimento de microrganismos, como tal retardar deterioração dos produtos.

Numa análise à carga microbiológica MCT 30°C entre enchidos dever-se-ia constatar uma diferença significativa, isto porque são produtos diferentes e com prazos de validade diferentes, o que deveria implicar um desenvolvimento diferente dos microrganismos. Por isso, e uma vez que também os tempos de análise ocorreram em dias diferentes assume-se que esta avaliação é relativa. Neste contexto, faria sentido pensar que os painhos apresentassem MCT 30°C inferiores às alheiras, uma vez que o prazo de validade dos painhos (90 dias) é superior às alheiras (60 dias). No entanto esta análise não foi perceptível nos resultados obtidos. Todavia, uma vez que os painhos foram mais manipulados na altura do embalamento i.e, ao contrário das alheiras estes foram cortados em pedaços mais pequenos, o que aumentou a superfície de contacto dos microrganismos (também por diminuição da proteção da tripa envolvente nas extremidades), poderá ter influenciado o normal desenvolvimento de MCT 30°C que seriam característicos nos painhos não manipulados.

3.3.5 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram efetuadas em paralelo com os ensaios microbiológicos, com o intuito de verificar possíveis alterações nestes parâmetros derivado do uso do BO e também BE, com exclusão do teor proteico, cuja análise foi apenas efetuada no tempo zero com o intuito de se perceber se a aplicação de BO e BE afetariam este parâmetro.

3.3.5.1 Teor proteico de amostras cárneas

A determinação da percentagem de proteínas presentes nas amostras foi calculado tendo por base os compostos azotados totais. Estes compostos são divididos em compostos azotados não proteicos e pela percentagem proteica que se pretendeu determinar (NP 1612).

Na Tabela 13 é possível observar os valores obtidos nesta análise. Neste contexto é possível afirmar que de um modo geral a quantidade de biofilme adicionada nas amostras (≈ 1 mL) não influenciou significativamente a percentagem de proteína nas amostras.

Numa análise aos enchidos (alheira e painho) constatou-se que os painhos são os produtos mais ricos em proteína.

Comparativamente a valores descritos na literatura, destacou-se para as alheiras valores na mesma ordem de grandeza: 13.0 ± 0.52 % (Campos et al., 2013) e $11,4 \pm 2,8$ (Ferreira et al., 2006). Nos painhos o valor situou-se entre $13.3 \pm 0,2\%$ e $20,8 \pm 0,9$ % (para amostras de paio alentejano) (Elias e Carrascosa, 2010), que corresponderam a valores inferiores ao dos registados neste trabalho.

Tabela 13: Resultados da determinação do valor de proteína nas amostras (Painhos e Alheiras) controlo, BO e BE no tempo zero (T0) de análise.

Painhos	%Proteinas	Alheiras	%Proteinas
BO	$(33,43 \pm 0,8)^a$	BO	$(12,89 \pm 1,5)^a$
BE	$(33,58 \pm 0,2)^a$	BE	$(13,45 \pm 0,6)^a$
Controlo	$(33,03 \pm 1,0)^a$	Controlo	$(13,01 \pm 0,3)^a$

Letras iguais (a) *superscript* na mesma coluna indicam inexistência de diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.3.5.2 Análise de teor de humidade

Na Figura 19 estão representados os resultados da variação da humidade ao longo do tempo de estudo para as amostras controlo e BO dos enchidos. Desta análise não se verificaram alterações significativas no início do tempo de leitura (tempo zero) nem ao longo do tempo de análise.

Relativamente à análise efetuada à percentagem de humidade dos biofilmes sólidos (3.2.3.4), registou-se aproximadamente 7,5% de humidade nesses biofilmes homólogos de 1% de OE.

Este facto sugeria que o biofilme fomentaria maiores valores de humidade nos enchidos, para além de que, acrescia o facto de ter sido adicionado em solução. No entanto, com base na Figura 19 constatou-se que a quantidade de biofilme utilizada não influenciou a percentagem de humidade nas amostras. Entre os enchidos, os painhos registaram valores de humidade mais elevados.

Em relação aos valores bibliográficos, foram descritos para as alheiras os seguintes teores de humidade: $56,4 \pm 1,64$ % (Campos et al., 2013) e $52,3 \pm 4,31$ % (Ferreira et al., 2006). Já para os painhos foram descritos valores no seguinte intervalo: 27.2 ± 3.3 % e 59.3 ± 7.6 % (para amostras de paio alentejano) (Elias e Carrascosa, 2010).

Com base nestes valores foi possível verificar-se que a percentagem de humidade das alheiras (≈ 45 %) ficou um pouco aquém dos valores descritos. Enquanto os valores da humidade dos painhos (≈ 60 %) foi considerado dentro do intervalo de valores descritos.

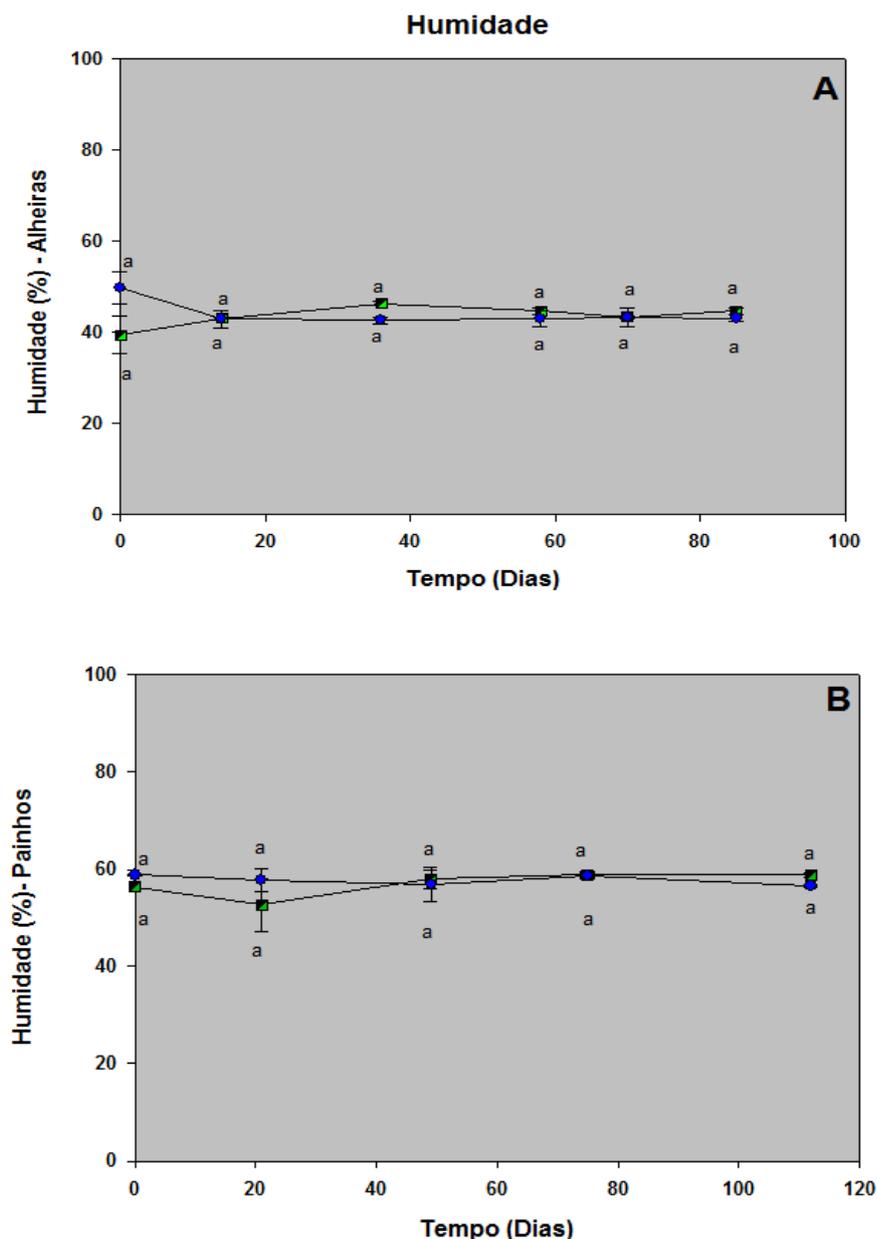


Figura 19: Evolução da humidade nas alheiras (A) e painhos (B). Os gráficos verdes correspondem às amostras BO e o gráfico azul às amostras controlo. Letras (a) iguais na parte superior e inferior dos gráficos indicam inexistência de diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.3.5.3 Análise do pH e acidez titulável

Os enchidos enquanto produtos fermentados possuem bactérias lácticas como parte integrante. Associados ao crescimento e desenvolvimento destas bactérias lácticas refere-se a produção de ácidos orgânicos, i.e., ácido láctico, que altera a acidez dos produtos (Ho, Zhao e Fleet, 2015). Neste contexto a determinação da acidez titulável nas amostras (Figura

20) foi realizada com o intuito de obter uma referência na evolução destas bactérias. Em simultâneo foi realizada a medição do pH das amostras, demonstrado na Figura 21.

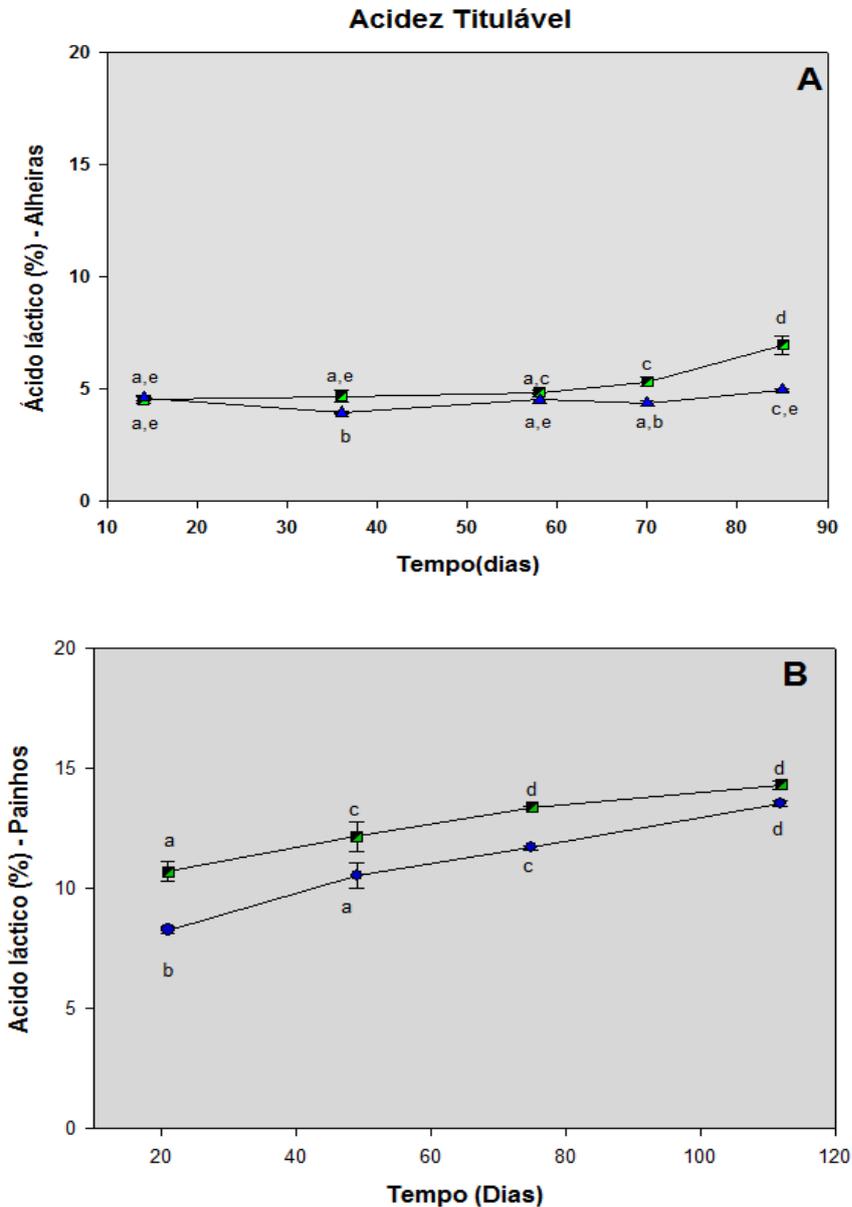


Figura 20: Evolução da acidez titulável (% ácido láctico) nas alheiras (A) e painhos (B). Os gráficos verdes correspondem às amostras com BO e o gráfico azul às amostras controlo. Diferentes letras (a-d) nas parte superior e inferior dos gráficos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

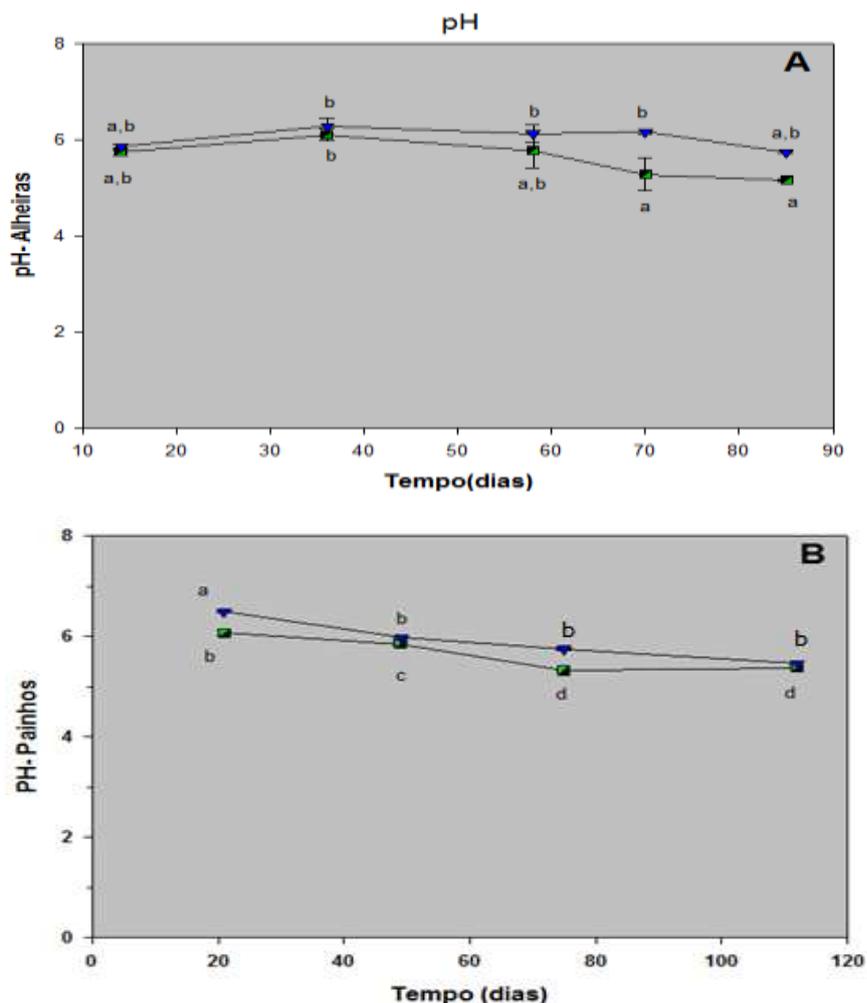


Figura 21: Evolução do pH nas alheiras (A) e painhos (B). Os gráficos verdes correspondem às amostras com BO e o gráfico azul às amostras controlo. Diferentes letras (a-d) na parte superior e inferior dos gráficos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

O pH é um aspeto fundamental a ter em consideração quando se pretende executar/alterar um produto com base no produto original, uma vez que o abaixamento do pH constitui um mecanismo de preservação do desenvolvimento de bactérias indesejáveis no produto. Este processo é efetuado através da fermentação, na fase da maturação dos enchidos, onde a matéria-prima e microflora instável se transforma num produto estável e inócuo do ponto de vista microbiológico (Mendes, 2013). Com base nisto, não seria de esperar que os produtos (controlo) sofressem grandes alterações neste parâmetro ao longo do tempo, o que se veio a confirmar com a análise de pH e acidez titulável. Adicionalmente o BO induziu uma acidificação dos produtos, embora de forma não muito acentuada. Essa acidificação, tal como todo o registo do pH, acompanhou as “linhas” obtidas para a % de ácido láctico. Ou seja, uma maior % de ácido láctico correspondem a menores valores de pH. Em maior detalhe registou-se para as alheiras valores uniformes ao longo tempo, com tendência para a

sua diminuição nos últimos dois ensaios. Por outro lado, nos painhos foi notória uma diminuição gradual do pH, em semelhança ao aumento gradual do ácido láctico.

A acidificação das amostras BO sugere a presença de mais bactérias lácticas, o que provavelmente se deve à presença do biofilme. No entanto essa percentagem não aparenta grandes diferenças entre o controlo ao longo do tempo. Já a comparação entre as alheiras e painhos permitiu verificar que os últimos possuem maiores valores de acidez, sendo o alimento mais propício para o desenvolvimento das bactérias lácticas. O facto de a alheira ter sido menos manipulada e possuir a tripa por toda a alheira, parece conferir uma barreira para o desenvolvimento destas bactérias como foi, embora menos perceptível, no caso dos MCT 30°C.

Comparativamente com os valores de pH descritos na literatura foi possível identificar para as alheiras o seguinte valor: $5,1 \pm 0,50$ (Ferreira et al., 2006). Já para os painhos foram descritos valores no seguinte intervalo: $5,4 \pm 0,40$ e $6,0 \pm 0,20$ (para amostras de paio alentejano) (Elias e Carrascosa, 2010). Para esta análise, uma vez que existiram variações significativas ao longo do tempo de análise do pH e os valores descritos não se referirem a estas variações temporais, considerou-se o valor de pH inicial de cada amostra de enchido. Assim, relativamente aos valores descritos, foi possível verificar (à excepção do painho BO ($6,0 \pm 0,04$)) que o painho controlo ($6,7 \pm 0,01$), alheira controlo ($5,8 \pm 0,05$) e alheira BO ($5,7 \pm 0,07$) eram ligeiramente mais básicos.

3.3.5.4 Análise da cor

A aparência do produto é outro fator a ter em consideração. Possuir um produto com melhores qualidade microbiológicas mas que comparado com o original possui uma cor diferente e menos atraente, poderá tornar o produto menos apelativo. Assim, tornou-se essencial seguir a evolução da cor ao longo dos ensaios. Os resultados podem ser consultados na Figura 22.

Compreensivelmente ambos os enchidos mostraram uma evolução uniforme, sem variações significativas, entre as respetivas amostras controlo e BO. A quantidade de biofilme (1 mL) adicionado parece não influenciar uma mudança de cor nas amostras. Ainda, a cor das alheiras manteve-se constante até aos 70 dias, tendo apenas sofrido uma diminuição significativa na última leitura (85 dias). Em sentido oposto, nos painhos foi notória uma diminuição de cor ao longo do tempo de análise. Uma vez que a evolução da cor foi

semelhante para ambos os enchidos (controlo e BO), considera-se que a perda de cor é um facto independente da aplicação de BO e intrínseco destes produtos.

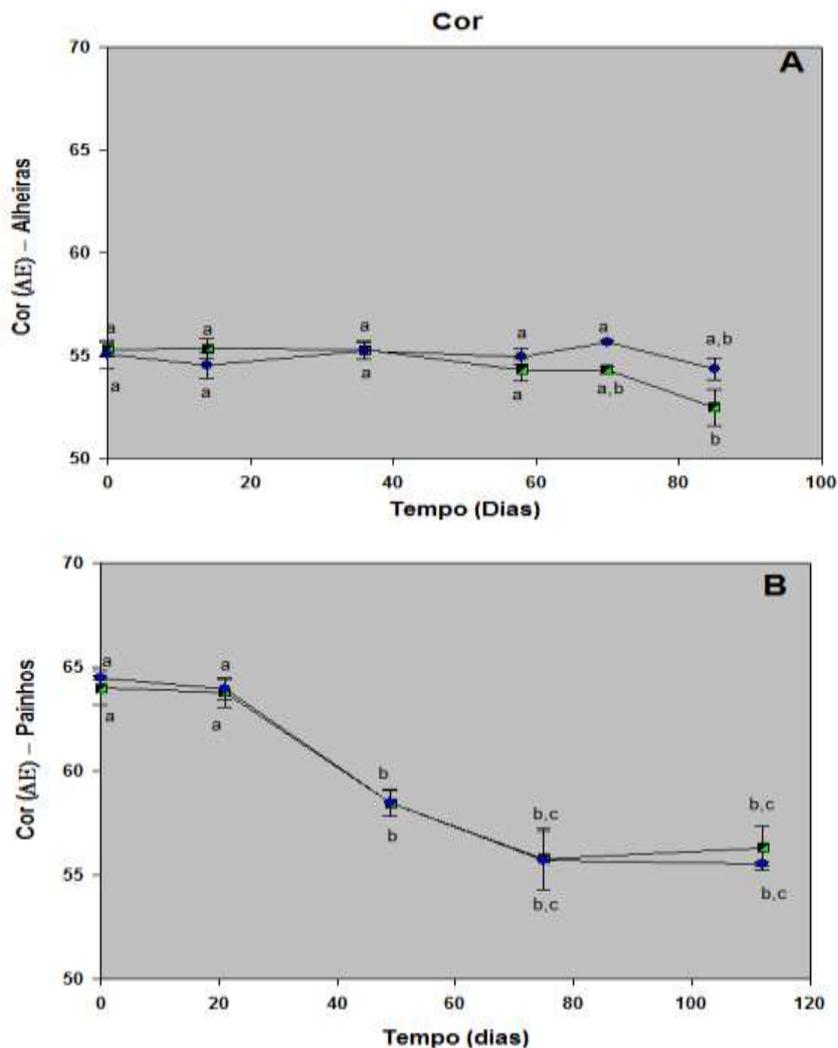


Figura 22: Evolução da cor nas alheiras (A) e painhos (B). Os gráficos verdes correspondem às amostras com BO e o gráfico azul às amostras controlo. Diferentes letras (a-c) na parte superior e inferior dos gráficos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.3.5.5 Análise de perfil da textura

A análise de perfil da textura das amostras controlo e BO vem no seguimento dos objetivos definidos nesta análise físico-química i.e., verificar se as amostras de BO sofrem alterações significativas em relação ao produto controlo. Estas análises encontram-se descritas na Tabela 14. Note-se que esta avaliação foi efetuada ao longo do tempo de análise. No entanto devido à não existência de variações significativas entre amostras controlo e BO nos respetivos pontos de análise, optou-se por apresentar a média desta evolução (Tabela 14),

para uma análise mais simplificada. Em anexo (Anexo i), segue a Tabela detalhada com os resultados ao longo do tempo de análise.

A análise da Tabela 14 permite concluir que existem valores distintos entre os dois tipos de enchidos, que eram expectáveis devido à sua diferente natureza. Contudo não houve alterações significativas entres as amostras controlo e BO, concluindo-se assim que a quantidade de biofilme BO adicionado não influenciou a textura dos produtos.

Tabela 14: Resultados da análise de perfil da textura dos enchidos (controlo e BO).

Parâmetros	Painhos		Alheiras	
	Controlo	Óleo	Controlo	Óleo
Dureza (g)	2448,5±352,5 ^a	2573,9±463,9 ^a	612,2±80,8 ^f	617,5±67,1 ^f
Aderência (g.s)	-4992,4±1090,3 ^b	-4803,2±1057,7 ^b	-122,2±27,9 ^g	-157,4±42,5 ^g
Elasticidade (mm)	1,00±0,1 ^c	0,97±0,1 ^c	1,18±0,4 ^c	1,14±0,3 ^c
Mastigabilidade (g)	1118,6±244,0 ^d	1054,8±269,1 ^d	244,7±103,2 ^h	258,7±116,6 ^h
Coesão	0,49±0,1 ^e	0,46±0,1 ^e	0,35±0,1 ^e	0,35±0,1 ^e

Letras (a-e) iguais *superscript* na mesma linha, indicam ausência de diferenças significativas (P<0,05).

3.3.5.6 Análise da peroxidação lipídica

A análise da peroxidação lipídica foi efetuada com base na determinação do teor de MDA, i.e., cuja quantidade é proporcional à oxidação. Como se pode observar na Figura 23, existiu uma diferença clara entre os níveis de MDA dos dois enchidos, sendo os níveis nas alheiras (Figura 23A) sempre superiores a 1 mg MDA /kg amostra e substancialmente mais elevados do que os registados nos painhos (<0,6 mg MDA/kg amostra) (Figura 23B). Além de registarem valores mais elevados de oxidação, salienta-se também que a variação de MDA ao longo do tempo de análise foi também superior ao registado nos painhos. Este facto indica que as alheiras foram mais suscetíveis a processos de oxidação do que os painhos, o que teoricamente se associou a um maior teor em gordura.

No entanto, dados bibliográficos sugerem o contrário. Segundo Campos et al. (2013), a percentagem de gordura nas alheiras correspondeu a 15,6±1,24%, Roseiro et al. (2012) registou 16% e Ferreira et al. (2006) 18,4 ± 4,7%. Nos painhos, segundo Elias e Carrascosa (2010), esse valor encontrou-se numa gama de 20,8 ± 8,0% a 48,4 ± 4,4% (adaptado de

amostras de paios alentejanos), enquanto Roseiro et al. (2012) fixou o valor em 24,2%. Contudo existem vários tipos de amostras de alheiras, e as alheiras deste trabalho apresentavam um líquido viscoso (umas mais que outras) em volta da mesma, que indicava ser “excesso” de gordura. Note-se que algumas marcas não possuem esta característica visível, o que pressupõem possuírem menos teor de gordura. Consequentemente em futuro trabalho dever-se-à ter em conta a análise da gordura das amostras, para uma correlação mais fidedigna entre enchidos.

A comparação de amostras de alheira controlo e BO (Figura 23A) permitiu verificar menores valores de MDA, assim como uma evolução significativamente mais lenta na oxidação dos lípidos, nas alheiras BO. Neste gráfico foi notória a influência do biofilme na retardação da oxidação das gorduras. Nos painhos (Figura 23B) a influência do biofilme não foi evidente em todos os pontos de análise. No início dos testes as amostras BO apresentaram maiores valores de oxidação, que podem estar relacionados com uma maior manipulação casual dos produtos. No entanto e apesar de uma menor variação nos resultados em ambas as amostras, no último ensaio o valor de MDA foi significativamente inferior ao do controlo.

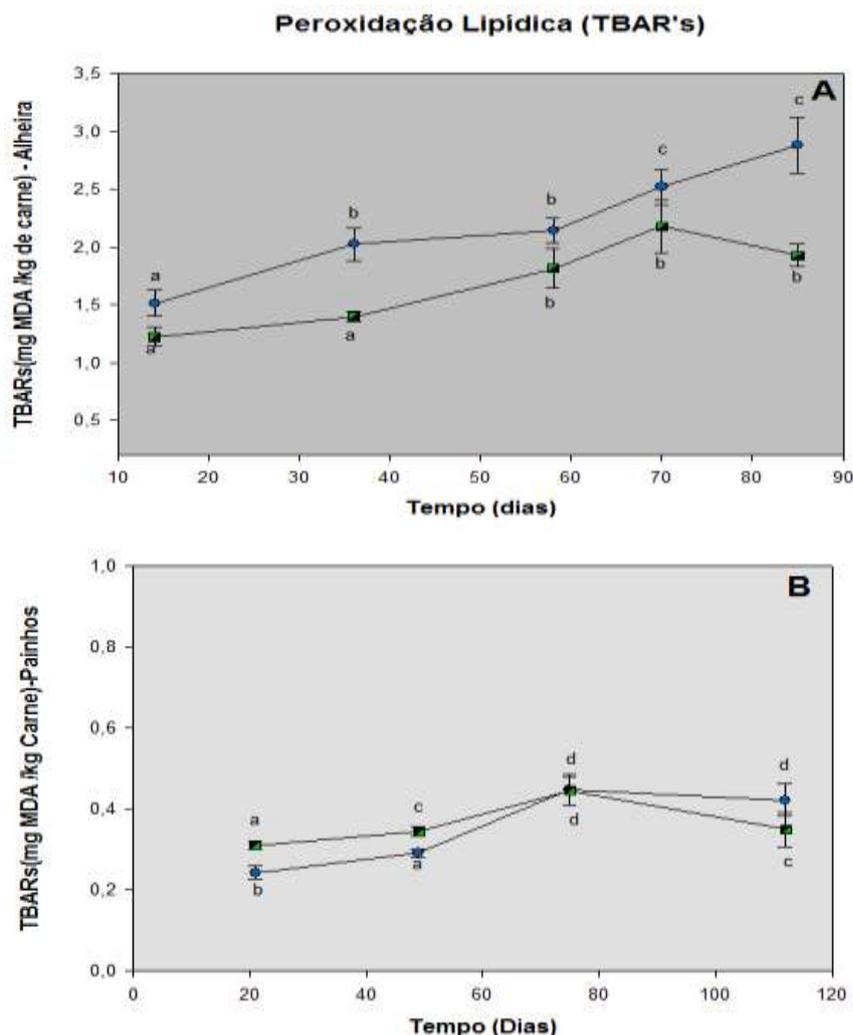


Figura 23: Evolução da peroxidação lipídica (TBARS) nas alheiras (A) e painhos (B). Os gráficos verdes correspondem às amostras BO e o gráfico azul às amostras controlo. Diferentes letras (a-d) na parte superior e inferior dos gráficos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.3.6 Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial encontram-se registados na Figura 24. Estes resultados apesar de serem efetuados por um grupo de colaboradores não treinados para este tipo de produtos, permitiram retirar algumas conclusões. Para todas as características analisadas apenas o aroma foi significativamente diferente entre as amostras controlo e BO, nos dois enchidos. Era uma característica previsível devido às propriedades aromáticas do óleo essencial, no entanto nas alheiras após confeção (Figura 25) essas propriedades aromáticas não foram registadas.

Estranhamente, nos painhos cortados aos pedaços, os provadores também não registam diferenças olfativas significativas da amostra BO em relação à amostra controlo. O sabor nos

enchidos com BO teve uma preferência ligeira, no entanto não foi uma preferência significativa para afirmar que é um produto superior ao controlo. De qualquer forma, este é um resultado que se considera positivo.

A análise da cor e textura veio de certa forma confirmar os resultados obtidos no colorímetro e texturómetro, respetivamente, uma vez que não se registaram diferenças significativas entre as amostras. Mesmo após a confecção (embora não tenha sido registado/analísado este parâmetro) foi possível perceber que o BO não teve influência na cor das alheiras (Figura 25). Numa análise visual ao aspeto dos produtos na embalagem, apenas nos painhos foi registada uma diferença significativa em favor das amostras com BO. O biofilme adicionado nos painhos beneficiou a avaliação dos provadores, tornando o produto um pouco mais brilhante e apelativo, segundo afirmaram alguns provadores. Nas alheiras o biofilme não alterou a aparência do produto. Este facto poderá ser justificado pelas características naturais das alheiras, que apresentava um líquido viscoso em volta da alheira. Nestas condições o biofilme parece ficar mascarado e por essa razão não se obteve resultados significativamente diferentes.

Em conclusão, segundo a aceitação global, para ambos os produtos, pode-se afirmar que as diferenças registadas não foram significativas para que os provadores atribuíssem uma preferência entre as amostras.

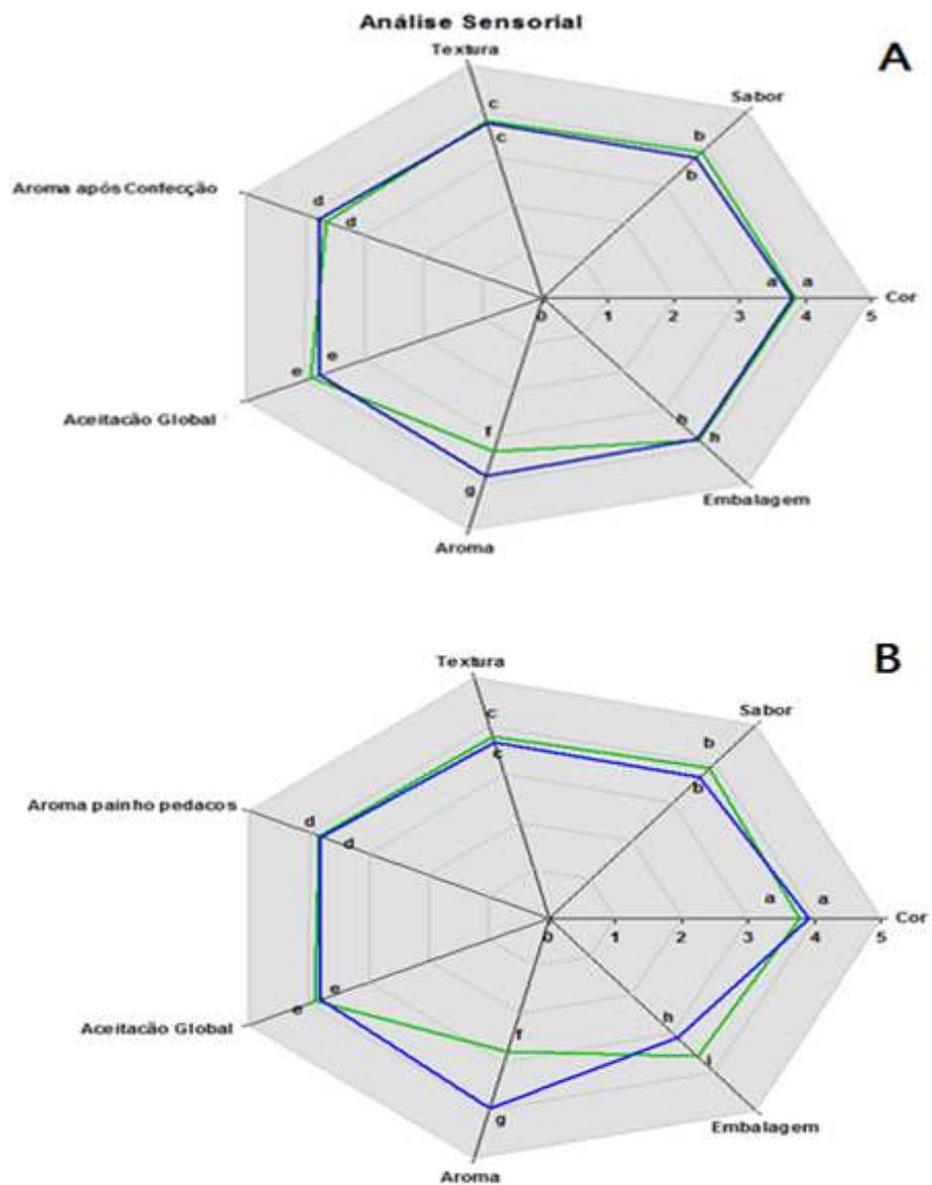


Figura 24: Resultados da análise sensorial nas alheiras (A) e painhos (B). Os gráficos verdes correspondem às amostras com BO e o gráfico azul às amostras controlo. Diferentes letras (a-i), nas varias categorias de análise indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).



Figura 25: Alheiras após confeção para os testes sensoriais. Nota: Alheiras com BO lado esquerdo e alheiras controlo do lado direito.

4. CONCLUSÃO

Na pesquisa de EXTAqs e OEs de plantas aromáticas com propriedades antioxidantes e antimicrobianas constatou-se a existência de um leque alargado de possibilidades, que dificultaram a escolha do EXTAq e OE mais promissores para este trabalho. Isto indica a diversidade e possibilidades de usos e adaptações que se podem efetuar consoante as características das plantas e do respetivo trabalho. No entanto, foi possível eleger o OE de *Oreganum virens* e EXTAq de *Oreganum vulgare* para as aplicações futuras nos produtos cárneos.

A segunda etapa do trabalho (otimização e caracterização dos biofilmes) foi efetuada a otimização de formulações capazes de formar biofilmes uniformes, com ou sem incorporação de OE de *Oreganum virens* e EXTAq de *Oreganum vulgare* selecionados. Com base nisso foi possível caracterizar as propriedades físico-químicas dos biofilmes controlo e aqueles contendo várias concentrações de OE e EXTAq. Os resultados indicaram diferenças entre BO e BE ao nível da cor, transparência e permeabilidade ao vapor de água, e semelhanças ao nível da espessura, humidade e solubilidade.

Na terceira etapa do trabalho, testou-se a aplicação das formulações de biofilme contendo OE *Oreganum virens* e EXTAq de *Oreganum vulgare* (a 1% (m:m) e 7,5% (m:m), respetivamente) em dois enchidos tradicionais i.e., a alheira e o painho, tendo-se avaliado parâmetros microbiológicos e físico-químicos ao longo de 85 dias e 112 dias, respetivamente.

Numa primeira análise foi notório que a aplicação de formulações contendo EXTAq não corresponderam às espetativas, e não se registou melhorias na inibição microbiológica. Relativamente aos biofilmes BO, estes registaram melhorias significativas na inibição do crescimento microbiológico, em ambos os produtos (alheira e painho), e também provaram serem eficientes na prevenção da oxidação das gorduras nas alheiras. Adicionalmente, os testes físico-químicos indicaram que as amostras com biofilme BO não têm influência significativa nos parâmetros testados, podendo-se assim concluir que as características originais dos produtos não foram alteradas.

Relativamente aos ensaios sensoriais, ambas as amostras mantiveram os parâmetros de análise sem diferenças significativas à exceção do aroma dos produtos, que não teve aceitação pela maioria dos analisadores. Apesar disso, outros parâmetros indicaram

interesse dos analisadores pelos produtos com BO, mas apenas o parâmetro “embalagem” no painho BO se destacou quer favoravelmente quer significativamente. Assim, e com base nos resultados da aceitação global dos produtos, os resultados indicaram uma vez mais que não existiram grandes alterações em relação ao produto original, e que as diferenças registadas não contribuíram para uma preferência entre amostras.

Resumidamente, com bases nestes resultados, é possível constatar que o revestimento com a solução de biofilme com óleo essencial de *Oreganum Virens* tem potencial para melhorar a conservação dos produtos cárneos. Contudo, serão necessários trabalhos de consolidação de resultados, de forma a avaliar o valor efetivo e a aplicabilidade destes biofilmes ao nível industrial.

4.1 Trabalhos futuros

Na tentativa de melhorar a ação conservante do biofilme com OE e EXTAq nos produtos cárneos, em trabalhos futuros dever-se-à realizar ensaios da ação inibitória e letal (CMI e CML) das soluções de biofilmes, com o OE de *Oreganum Virens* e EXTAq *Oreganum vulgare*, em culturas microbiológicas patogénicas: *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*. Será também útil realizar ensaios microbiológicos aos produtos cárneos para outras estirpes microbianas, incluindo as bactérias lácticas e bolores. Nesses novos ensaios reduzir a manipulação dos painhos deverá ser uma opção.

Por outro lado, poder-se-ão testar novas percentagens de OE de *Oreganum Virens* e também óleos de outras plantas, na tentativa de reduzir o impacto aromático.

Para além disso as condições de produção dos extratos deverão ser otimizadas a fim de evitar contaminações microbiológicas como as ocorridas neste trabalho.

A aplicação de uma película sólida de biofilme nos produtos cárneos seria outro parâmetro interessante de se avaliar e posteriormente confrontar com os resultados da aplicação da formulação em fase líquida.

Nas análises físico-químicas das amostras dever-se-à determinar a percentagem de gordura nas amostras para uma análise mais fidedigna da inibição da peroxidação lipídica.

Por fim, a análise sensorial deverá não só ser avaliada por um painel de provadores não treinado, como ainda por um painel de provadores treinados.

5. BIBLIOGRAFIA

ALBANO, S.M. e MIGUEL, M. G. (2011) - Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. "Industrial Crops and Products" 33 (2011) 338–343.

ALEKSIC, V. e KNEZEVIC, P. (2013) - Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L." Microbiological Research" xxx (2013) xxx–xxx.

Anónimo. *Segurança Alimentar de Produtos Cárneos Tradicionais – Enchidos e Produtos Curados*. [Acedido a 27 julho de 2015]. Disponível na Internet: http://www.crcvirtual.org/vfs/old_crcv/biblioteca/manual_enchidos/Manual%20Enchidos.pdf

Associação Oficial de Química Analítica (AOAC) (1998) - **Official methods of analysis**. (16th ed.) Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, (1998).

Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) – **Perigos de Origem Alimentar**. Ministério da Economia, Lisboa: ASAE, 2015. [Acedido a 27 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.asae.pt/>

BADAWY, M.E.I. e ABDELGALEIL S.A.M. (2014) - Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. "Industrial Crops and Products" 52 (2014) 776–782.

BAJPAI, V. K., RAHMAN, A. e KANG, S. C. (2008) - Chemical Composition and Inhibitory Parameters of Essential Oil and Extracts of *Nandina domestica* Thunb. to Control Food-Borne Pathogenic and Spoilage Bacteria. "International Journal of Food Microbiology" (2008) 125.

BAKKALI, F. [et al.] 2008 - Biological effects of essential oils – A review. "Food and Chemical Toxicology" 46 (2008) 446–475.

BEARTH, A., COUSIN, M.-E. e SIERGRIST, M. (2014) - The Consumer's Perception of Artificial Food Additives: Influences on Acceptance, Risk and Benefit Perceptions. "Food Quality and Preference" (2014) 38, 14–23.

BERLIN JR, C.M. e ANKER, J.N (2013) - Safety during breastfeeding: Drugs, foods, environmental chemicals, and maternal infections. "Seminars in Fetal & Neonatal Medicine" 18 (2013) 13-18.

BETZ, M e KULOZIK, U. (2011) - Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. "International Dairy Journal" 21 (2011) 703e710.

BETZ, M. [et al.] (2012) - Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. "Food Research International" 47 (2012) 51–57.

BIEBERSTEIN, A. e ROOSEN, J. (2015) - Gender differences in the meanings associated with food hazards: A means-end chain analysis. "Food Quality and Preference" 42 (2015) 165–176.

BOLZAN, R. P. (2008). *Biofilmes comestíveis para conservação pós colheita de tomate*. Tese de pós graduação em Agronomia. Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciência Agrárias - Universidade Federal do Paraná, Curitiba (2008).

BOROSKI, M. [et al.] (2012) - Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. "LWT - Food Science and Technology" 47 (2012) 167e174.

BURT, S. (2004) - Essential oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—a Review. "International Journal of Food Microbiology" (2004) 94, 223– 253.

BUTLER, A. (2015) - Nitrites and nitrates in the human diet: Carcinogens or beneficial hypotensive agents?. "Journal of Ethnopharmacology" 167 (2015) 105–107

CAMPOS, C.A., GERSCHENSON, L.N. e FLORES, S.K. (2011) - Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. "Food Bioprocess Technol" (2011) 4, 849–875.

CAMPOS, S.D. [et al.] (2013) - Nutritional value and influence of the thermal processing on a traditional Portuguese fermented sausage (alheira). "Meat Science" 93 (2013) 914–918.

CAROCHO, M. e FERREIRA, I.C.F.R. (2013) - A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. "Food and Chemical Toxicology" 51 (2013) 15–25.

CAROCHO, M., MORALES e P., FERREIRA, I.C.F.R. (2015) - Natural food additives: Quo vadis?. "Trends in Food Science & Technology" (2015) 00150-8.

CELIK TAS, O.Y. [et al.] (2007) - Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. "Food Chemistry" 100 (2007) 553–559.

Centro de Controlo de Doenças e Prevenção (CDC) (2011) - **Estimates of Foodborne Illness in the United States**. Estados Unidos da América. [Acedido a 27 de julho de 2015]. Disponível na Internet: http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/FACTSHEET_A_FINDINGS_updated4-13.pdf

CEZAR, F.R. (2012) – Whey Protein: Proteína do soro do leite."EFDeportes.com, Revista Digital. Buenos Aires, 17 (2012) 167. [acedido a 28 de Julho de 2015] Disponível na Internet: <http://www.efdeportes.com/efd167/whey-protein-proteina-do-soro-do-leite.htm>

Codex Alimentarius (2015) - **About Codex**. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Itália. [Acedido a 27 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.codexalimentarius.org/contacts/en/>

COELHO, M.G. (2009) - *Óleos essenciais para aromoterapia*. Tese de Mestrado em Biotecnologia e Bio-Empreendedorismo em Plantas aromáticas e medicinais. Escola de ciências – Universidade do Minho, Braga, 107pps.

COSTA, D.C. [et al.] 2015 - Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. "Trends in Food Science & Technology" xxx (2015) 1–19.

CRUZ, M.R.S. [et al.] (2013) - Controlled release and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein, and pectin. "LWT - Food Science and Technology" 50 (2013) 554–561.

DUSSAULT, D., VU K. D. e LACROIX, M. (2014) - In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. "Meat Science" 96 (2014) 514–520.

ELÍAS, M. e CARRASCOSA, A.V. (2010) - Characterisation of the Paio do Alentejo, a traditional Portuguese Iberian sausage, in respect to its safety. "Food Control" 21 (2010) 97–102.

EMBUSCADO, M.E. (2015) - Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. "Journal of Functional Foods" (2015).

FERREIRA, V. [et al.] (2006) - Chemical and microbiological characterization of alheira: A typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors relating to food safety. "Meat Science" 73 (2006) 570–575.

FHOGARTAIGH, C.N e DANCE D. (2013) - Bacterial gastroenteritis. "Gastrointestinal Infections - Medicine" (2013) 41:12, 693–699.

GADIYARAM, K.M. e KANNAN, G. (2004) - Comparison of textural properties of low-fat chevon, beef, pork, and mixed-meat sausages. "South African Journal of Animal Science" (2004) 34.

GALUS, S. e KADZINSKA, J. (2015a) - Whey protein edible films modified with almond and walnut oil. "Food Hydrocolloids" 52 (2016) 78–86.

GALUS, S. e KADZINSKA, J. (2015b) - Food applications of emulsion-based edible films and coatings. "Trends in Food Science & Technology" 45 (2015), 273–283.

GAMBLE, H.R. (2015) - Trends in food production practices relative to foodborne parasites. "Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition" (2015) 11–22.

GARCÍA-CELA, E., RAMOS, A.J. e MARIN, S. (2012) - Emerging risk management metrics in food safety: FSO, PO. How do they apply to the mycotoxin hazard. "Food Control" 25 (2012) 797–808.

GAVARIC, N. [et al.] (2015) - Postdistillation waste material of thyme (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) as a potential source of biologically active compound." *Industrial Crops and Products*" 74 (2015) 457–464.

GRABOWSKI, T. [et al.] (2012) - Qualitative structure residue relationship analysis in the determination of the maximum residue limit of veterinary drugs. "Chemosphere" 87 (2012) 312–318.

GRAM L. [et al.] (2002) - Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. "International Journal of Food Microbiology" 78 (2002) 79–97.

GUPTA, S. e ABU-GHANNAM, N. (2011) - Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. "Innovative Food Science and Emerging Technologies" (2011) 12, 600–609.

HANNING, I.B. [et al.] (2012) - Food Safety and Food Security. "Nature Education Knowledge" (2012) 3(10):9.

HELDT, H.W. e PIECHULLA, B. (2011) - Secondary metabolites fulfill specific ecological functions in plants. "Plant Biochemistry" (2011) 399–408.

HERRERO [et al.] (2008) - Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. "Meat Science" 80 (2008) 690–696.

HILÁRIO, S.E.A. (2011) - *Segurança Alimentar em Cantinas Escolares*. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 74pps.

HINNEBURG, I., DORMAN, H.J.D. e HILTUNEN, R. (2006) - Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. "Food Chemistry" 97 (2006) 122–129.

HO, V.T.T., ZHAO, J. e FLEET, G. (2015) - The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. "International Journal of Food Microbiology" 205 (2015) 54–67.

Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (IPCL) (2012) - **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9, Vol. 32 -2.

ITURRIAGA, L., OLABARRIETA, I. e MARANON, I.M. (2012) - Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. "International Journal of Food Microbiology" 158 (2012) 58–64.

JAYASENA, D. e JO, C. (2013) - Potential Application of Essential Oils as Natural Antioxidants in Meat and Meat Products: A Review. "Food Reviews International" (2013) 30:1, 71–90.

JEVNIK, M., HLEBEC, V. e RASPOR, P. (2008) - Food safety knowledge and practices among food handlers in Slovenia. *Food Control* 19 (2008) 1107–1118.

JORDAN, M.J., [et al.] (2013) - Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. "Industrial Crops and Products" 48 (2013) 144–152.

KANATT, S.R., CHAWLA, S.P. e SHARMA, A. (2014) - Antioxidant and radio-protective activities of lemon grass and star anise extract. "Food Bioscience" 6 (2014) 24–30.

KARRE, L., LOPEZ, K. e GETTY, K.J.K. (2012) - Natural Antioxidants in Meat and Poultry Products. "Meat Science" (2013) 94, 220–227.

KHAN, M. I. [et al.] (2011) - Meat as a functional food with special reference to probiotic sausage. "Food Research International" 44 (2011) 3125–3133.

KILCAST, D. e SUBRAMANIAM, P. - **The Stability and Shelf-Life of Food**. Abington, England: Wood Publishing Limited, 2000. ISBN 1 85573 500 8.

- KIREZIEVA, K. [et al.] (2015) - Factors affecting the status of food safety management systems in the global fresh produce chain. "Food Control" 52 (2015) 85–97.
- LARANJO, M. [et al.] (2015) - Effects of genotype, salt content and calibre on quality of traditional dry-fermented sausages. "Food Control" 56 (2015) 119–127.
- LICINA, B.Z. [et al.] (2013) - Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. "Food Control" 33 (2013) 498–504.
- LOKESH, K.N., CHANNARAYAPPA e VENKATARANGANA, M. (2015) - Exemplified screening standardization of potent antioxidant nutraceuticals by principles of design of experiments. "Journal of Functional Foods" (2015) 17, 260–270.
- Luxo, C. (2014) - **Vírus como Agentes de Doenças de Origem Alimentar**. Aula de Mestrado em Segurança Alimentar: Microbiologia Alimentar, Faculdade de Farmácia-Universidade de Coimbra (2014).
- MACHADO, E.M.A. (2011) - *A Percepção da Segurança Alimentar no Contexto da Restauração*. Tese de Mestrado em Inovação Alimentar. Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, Porto, 59 pps.
- MACLACHLAN D.J. e MUELLER U. (2012) - A refined approach to estimate exposure for use in calculating the Maximum Residue Limit of veterinary drug. "Regulatory Toxicology and Pharmacology" 62 (2012) 99–10.
- MARQUEZ, D.B.M. [et al.] (2013) - Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. "Ultrasonics Sonochemistry" 20 (2013) 1149–1154.
- MARJANO, G. e MONTEIRO, M. - Aditivos alimentares em produtos à base de carne. Riscos e Alimentos nº9-ASAE. (2015) 21–24.
- MARTINS, N. [et al.] (2014) - Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. "Food Chemistry" 158 (2014) 73–80.
- MATA, A.T. [et al.] (2007) - Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices." Food Chemistry" 103 (2007) 778–786.
- McCARTHY, T.L. [et al.] (2001) - Evaluation of the Antioxidant Potential of Natural Food/Plant Extracts as Compared with Synthetic Antioxidants and Vitamin E in Raw and Cooked Pork Patties. "Meat Science" (2001) 57, 45–52.
- MENDES, J.I.S. (2013) - *Qualidade Nutricional e Microbiológica de Enchidos*. Tese de Mestrado em Tecnologias da Ciência Animal. Instituto Politécnico de Bragança-Escola Superior Agrária, Bragança, 82 pps.
- MOHAREB, F. [et al.] (2015) - Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling. "Food Control" 57 (2015) 152–160
- MOREIRA, C.P.M. (2011) - *Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Queijos, Estudo de Caso: Queijos da Beira Interior*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia

Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 71pp.

MOTARJEMI, Y., [et al.] (1995) - Food technologies and public health. Genebra : Organização Mundial da Saúde, 1995. [Acedido a 27 maio 2015]. Disponível na Internet: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/63010>

NEGI, P. S. (2012) - Plant Extracts for the Control of Bacterial Growth: Efficacy, Stability and Safety Issues for Food Application. “International Journal of Food Microbiology” (2012) 156, 7–17.

Norma Portuguesa (NP) 1612 (1979) - *Carnes, Derivados e Produtos Cárneos – Determinação do Teor de Azoto Total: Documentos impressos*. Direcção Geral da Qualidade, Lisboa (1979).

NOVA, R. e GONZÁLEZ-SCHNAKE, F. (2014) - Potential Chemical Hazards associated with meat. “Encyclopedia of Meat Science-Second edition” (2014) 64–69.

ORAK, H. H. [et al.] (2011) - Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Potential of Strawberry Tree (*Arbutus Unedo L.*) Leaf. “Food Sci. Biotechnol” (2011) 20(5): 1249–1256.

Organização Mundial da Saúde (OMS) (2008) - **Who initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases**. Genebra: OMS, 2008. ISBN 978 92 4 159849 1

Organização Mundial da Saúde (OMS) (2015a) - **Campanha OMS, World Health Day 2015: Food safety**. [Acedido a 27 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/event/en/>

Organização Mundial da Saúde (OMS) (2015b) - **Public Health Round-Up**. Bull World Health Organ (2015) 93: 288–289. [Acedido a 27 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/bulletin/volumes/93/5/15-010515.pdf>

OUSSALAH, M. [et al.] (2004) - Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle. “J. Agric. Food Chem.” (2004) 52, 5598–5605.

OZDEMIR, M. e FLOROS, J.D. (2001) - Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. “Journal of Food Engineering” (2001) 47, 149–155.

PALMER, A.S., STEWART, J. e FYFE, L. (1998) - Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. “Letters in Applied Microbiology” (1998), 26, 118–122.

PAVELA, R. (2015) - Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. “Industrial Crops and Products” 76 (2015) 174–187.

PEREIRA, L.B. [et al.] (2014) - Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. “Innovative Food Science and Emerging Technologies” 26 (2014) 310–318.

RAMOS, C. [et al.] (2012) - Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oil and Extracts of Bay Laurel *Laurus nobilis Linnaeus* (Lauraceae) from Portugal. “Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters” (2012) 26:6, 518–529.

RAMOS, H. (2009). *Avaliação das propriedades de biofilmes comestíveis à base de proteínas de soro*. Tese de mestrado em Engenharia Alimentar. Escola Superior Agrária de Coimbra. Coimbra.

RASMUSSEN, F.B. (1996) - Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. "The Science of the Total Environment" 188 Suppl. I (1996) S45–S60.

REALINI, C.E. e MARCOS, B. (2014) - Active and intelligent packaging systems for a modern society. "Meat Science" 98 (2014) 404–419.

Regulamento (CE) n° 178/2002 de 28 de Janeiro. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 31, 1 de Fevereiro de 2002. União Europeia. [Acedida a 27 maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2002:031:TOC>

Regulamento (CE) n° 396/2005 de 23 Fevereiro de 2005. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 70, 18 de Março de 2005. União Europeia. [acedido a 27 março de 2015] Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2005:070:TOC>

Regulamento (CE) n° 450/2009 de 29 de Maio. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 135, 30 de Maio de 2009. União Europeia. [Acedido a 27 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2009:135:TOC>

Regulamento (CE) n° 852/2004 de 29 de Abril. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139, 30 de Abril de 2004. União Europeia. [Acedida a 27 maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2004:139:TOC>

Regulamento (CE) n° 853/2004 de 29 de Abril. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139, 30 de Abril de 2004. União Europeia. [Acedida a 27 maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2004:139:TOC>

Regulamento (CE) n° 854/2004 de 29 de Abril. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139, 30 de Abril de 2004. União Europeia. [Acedida a 27 maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2004:139:TOC>

Regulamento (CE) n° 882/2004 de 29 de Abril. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139, 28 de Maio de 2004. União Europeia. [Acedida a 27 maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2004:139:TOC>

Regulamento (CE) n° 1129/2011 de 11 de Novembro. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 295, 11 de Novembro de 2011. União Europeia. [Acedida a 27 maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2011:295:TOC>

Regulamento (CE) n° 1333/2008 de 16 Dezembro de 2008. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 354, 31 de Dezembro de 2008. União Europeia. [acedido a 27 março de 2015] Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2008:354:TOC>

Regulamento (CE) n° 1441/2007 de 5 de Dezembro. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 135, 7 de Dezembro de 2007. União Europeia. [Acedido a 27 de maio de 2015]. Disponível na <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2007:322:TOC>

Regulamento (CE) n° 2073/2005 de 15 de Novembro. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 338, 22 de Dezembro de 2005. União Europeia. [acedido a 27 março de 2015] Disponível na Internet:: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2005:338:TOC>

RENNA, M., RINALDI, V.A. e GONNELLA, M. (2015) - The Mediterranean Diet between traditional foods and human health: The culinary example of Puglia (Southern Italy). "International Journal of Gastronomy and Food Science" 2 (2015) 63–71.

ROBY, M.H.H. [et al.] (2012) - Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). "Industrial Crops and Products" xxx (2012) xxx–xxx.

RORIZ, [et al.] (2015) - Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. "Food Chemistry" 185 (2015) 16–24.

ROSEIRO, L.C. [et al.] (2012) - Comparative survey of PAHs incidence in Portuguese traditional meat and blood sausages. "Food and Chemical Toxicology" 50 (2012) 1891–1896.

SAHIN, F. [et al.] (2014) - Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. "Food Control" 15 (2004) 549–557.

SANTOS, S.A.O. [et al.] (2010) - Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. "Industrial Crops and Products" 31 (2010) 521–526.

SANTOS, S.A.O. [et al.] (2013) - Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products. "Industrial Crops and Products" 47 (2013) 262–269.

SEOW, Y.X. [et al.] (2014) - Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. "Food Science and Nutrition" (2014) 54:5, 625–644.

SEYDIM, A.C e SARIKUS, G. (2006) - Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. "Food Research International" 39 (2006) 639–644.

SHAH, M.A., BOSCO, S.J.D. e MIR, S.M. (2014) - Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. "Meat Science" 98 (2014) 21–33.

SILVA, A.S. [et al.] (2014) - Trends in the Use of Natural Antioxidants in Active Food Packaging: a Review. "Food Additives & Contaminants: Part A" (2014) 31:3, 374–395.

SILVA, C.S.A. (2012) - *Avaliação Microbiológica de Enchidos de Ovino e Caprino*. Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Bragança-Escola Superior Agrária, Bragança, 40pps.

SILVA, E.M. (2011) - *Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão*. Trabalho de licenciatura em Engenharia Química. Escola de Engenharia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (2011) 37pps.

SILVEIRA, S.M., [et al.] (2014) - Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7. "LWT - Food Science and Technology" 59 (2014) 86–93.

SINDELAR J.J. e MILKOWSKI, A.L. (2012) - Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. "Nitric Oxide" 26 (2012) 259–266.

Sousa, M.C. (2014) - **Parasitas e Doenças de Origem Alimentar**. Aula de Mestrado em Segurança Alimentar: Microbiologia Alimentar, Faculdade de Farmácia- Universidade de Coimbra (2014).

Universidade do Nebraska-Lincoln (UNL) (2005) - **Physical Hazards-Food Safety**. Institute of Agriculture and Natural Resources, Lincoln (2005). [acesso a 27 julho 2015] Disponível na Internet: <http://www.foodsafety.unl.edu/haccp/start/physical.html>

UGALDE, M.L (2014) - *Biofilmes Ativos com Incorporação de Óleos Essenciais*. Tese de Douturamento em Engenharia Alimentar. Departamento de Ciências Agrárias – Universidade Regional Integrada, Erechim, Brasil (2014).

UPADHYAY, R. e MISHRA, H.N. (2014) - Antioxidant activity measurement of oleoresin from rosemary and sage. "Industrial Crops and Products" 61 (2014) 453–459.

VANDERROOST, M. [et al.] (2014) - Intelligent Food Packaging: The Next Generation. "Trends in Food Science & Technology" 39 (2014) 47–62.

VIUDA-MARTOS, M. [et al.] (2011) - In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. "Food Control" (2011) 22, 1715–1722.

WONGSA, P., CHAIWARIT, J. e ZAMALUDIEN, A. (2012) - In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. "Food Chemistry" 131 (2012) 964–971.

WRONA, M, BENTAYEB, K. e NERÍN, C. (2015) - A novel active packaging for extending the shelf-life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). "Food Control" (2015) 54, 200–207.

XU, Y. [et al.] (2010) - Physical and chemical changes of silver carp sausages during fermentation with *Pediococcus pentosaceus*. "Food Chemistry" 122 (2010) 633–637.

YOSHIDA, C.M.P. e ANTUNES, A.J. (2004) - Characterization of Whey Protein Emulsion Films. "Brazilian Journal of Chemical Engineering" 21 (2004) 247–252.

ZHENG, L. [et al.] (2013) - Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. "Food Control" 32 (2013) 665–672

ZINOVIADOU, K.G., KOUTSOUMANIS, K.P. e BILIADERIS, C.G. (2009) - Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. "Meat Science" 82 (2009) 338–345

6. ANEXOS

Anexo a: Principais agentes patogénicos responsáveis por hospitalizações associados a doenças transmitidas por alimentos nos EUA em 2011.

Agente patogénico	Nº Hospitalizações/Ano	%
<i>Salmonella spp</i>	19.336	35
<i>Norovirus</i>	14.663	26
<i>Campylobacter spp</i>	8.463	15
<i>Toxoplasma gondii</i>	4.428	8
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	2.138	4

Adaptado de CDC (2011).

Anexo b: Principais agentes patogénicos responsáveis por morte associados a doenças transmitidas por alimentos nos EUA em 2011.

Agente patogénico	Nº Mortes/Ano	%
<i>Salmonella spp</i>	378	28
<i>Toxoplasma gondii</i>	327	24
<i>Listeria monocytogenes</i>	255	19
<i>Norovirus</i>	149	11
<i>Campylobacter spp</i>	76	6

Adaptado de CDC (2011).

Anexo c: Bactérias responsáveis por doenças alimentares nos EUA em 2011.

Bactérias	Nº Casos/Ano
<i>Salmonella spp</i>	1 027 561
<i>Clostridium perfringens</i>	965 958
<i>Campylobacter spp</i>	845 024
<i>Staphylococcus aureus</i>	241 148
<i>Shigella spp.</i>	131 254
<i>Escherichia coli</i>	112 752
<i>Yersinia enterocolitica</i>	97 656

<i>Bacillus cereus</i>	63 400
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	63 153
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	34 664
<i>Vibrio spp.</i>	17 564
<i>E.coli spp.</i>	11 982
<i>Streptococcus spp.</i>	11 217
<i>Salmonella entérica serotipo typhimorium</i>	1821
<i>Listeria monocytogenes</i>	1591
<i>Brucella spp.</i>	839
<i>Vibrio vulnificus</i>	96
<i>Vibrio cholerae</i>	84
<i>Mycobacterium bovis</i>	60
<i>Clostridium botulinum</i>	55
Total	3.645.773

Adaptado de CDC (2011).

Anexo d: Vírus responsáveis por doenças alimentares nos EUA em 2011.

Vírus	Nº Casos/Ano
<i>Norovírus</i>	5.461.731
<i>Astrovírus</i>	15.433
<i>Rotavírus</i>	15.433
<i>Sapovírus</i>	15.433
<i>Vírus da hepatite A</i>	1.566
Total	5.509.597

Adaptado de CDC (2011).

Anexo e: Parasitas responsáveis por doenças alimentares nos EUA em 2011.

Parasitas	Nº Casos/Ano
<i>Toxoplasma gondii</i>	86.686
<i>Giardia intestinalis</i>	76.840
<i>Cryptosporidium spp.</i>	57.616
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	11.407
<i>Trichinella spp.</i>	156
Total	232.705

Adaptado de CDC (2011).

Anexo f: Principais espécies de fungos produtores de micotoxinas associadas a doenças alimentares.

Micotoxinas	Fungo produtor - Espécie
Ocratoxina-A	Aspergillus ochraceus; Penicillium viridicatum; P. cyclopium
Fumonisinás	Fusarium verticillioides; F. proliferatum
Aflotoxinas	Aspergillus flavus; A. parasiticus
Zearalenona	F. culmorum; F.graminearum; F. sporotrichioides
Desoxivalenol	

Adaptado de CDC (2011).

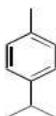
Anexo g: Estrutura química de componentes dos óleos essenciais (Bakkali et al., 2008).

1. Terpenes

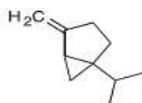
-Monoterpenes

Carbure monocyclic

Cymene ("γ") or p.cymene:



Sabinene



Carbure bicyclic

Alpha-pinene

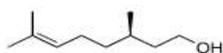


Betapinene

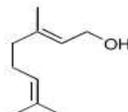


Alcohol acyclic

Citronellol

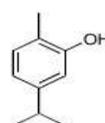


Geraniol

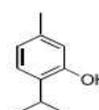


Phenol

Carvacrol



Thymol



-Sesquiterpenes

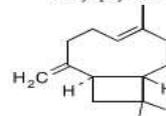
Carbure

Farnesol



Alcohol

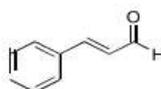
Caryophyllene



2. Aromatic compounds

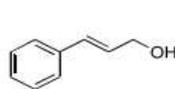
Aldehyde

Cinnamaldehyde



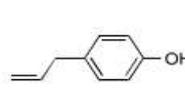
Alcohol

Cinnamyl alcohol



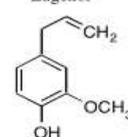
Phenol

Chavicol



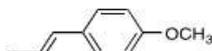
Phenol

Eugenol



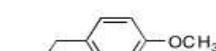
Methoxy derivative

Anethole



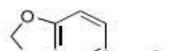
Methoxy derivative

Estragole



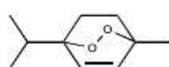
Methylene dioxy compound

Safrole

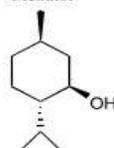


3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole

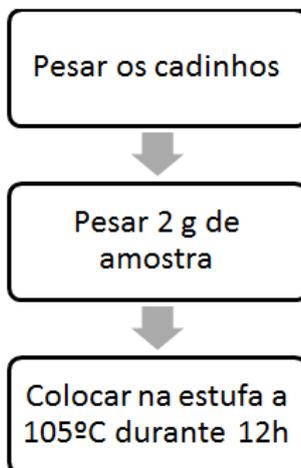


Menthol



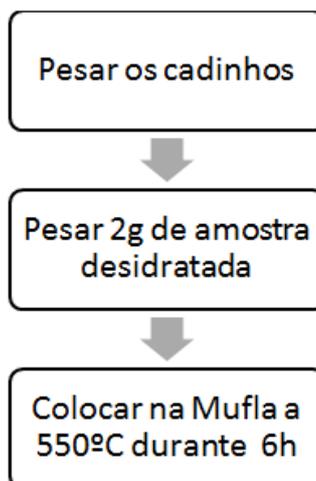
Anexo h: Determinação da composição e características químicas do CPS.

H.1 Determinação do extracto seco



$$\%ES = 100 - \frac{(m_i - m_d)}{(m_a)} \times 100$$

H.2 Determinação das cinzas



$$\%Cinzas = \frac{m_c - m_0}{(m_d)} \times 100$$

H.3 Determinação da acidez para o CPS

Determinação da acidez:

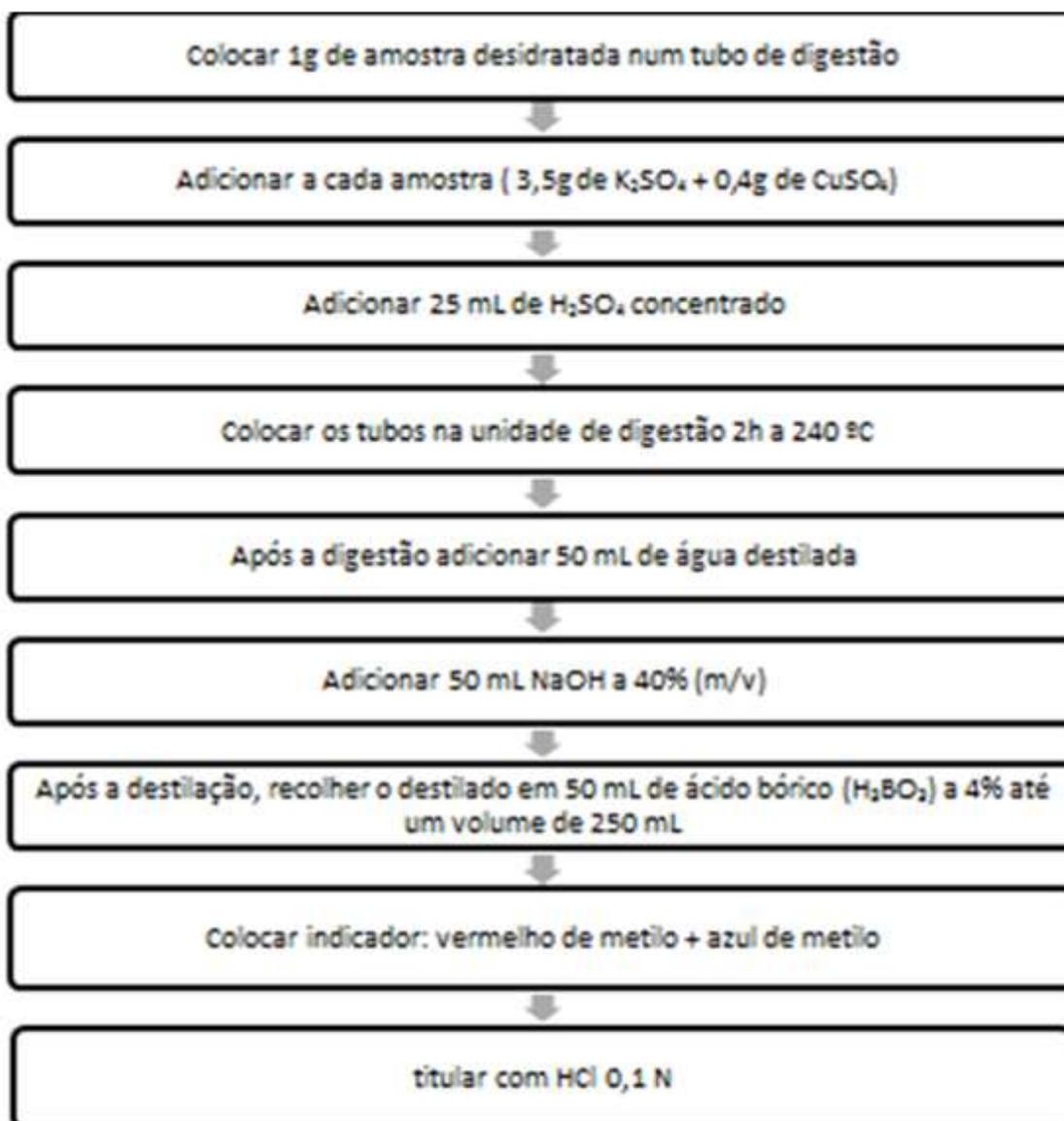


$$Acidez = \frac{10V}{m}$$

V – Volume de NaOH gasto na titulação mL

m - Massa da amostra em g

H.4 Determinação do teor de proteínas para CPS



$$(\%)TN = \frac{(14,007 \times N \times (V - V_0))}{m_a} \times 100$$

V - volume de HCl gasto na titulação da amostra (L)

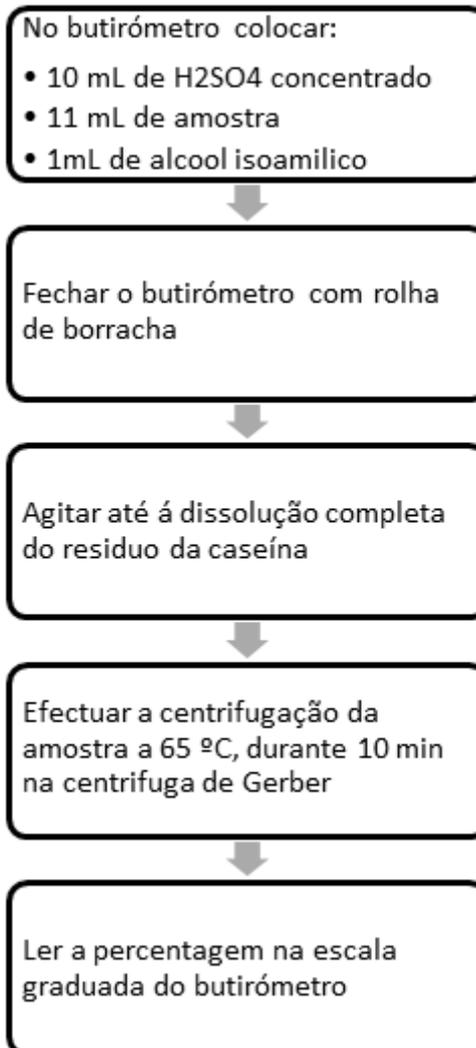
V₀ - volume de HCl gasto na titulação do branco (L)

N - normalidade da solução de HCl (N)

m_a - massa da amostra inicial (g)

O teor de proteína total obteve-se multiplicando a percentagem de azoto total (%TN) pelo factor 6,25.

H.5 Determinação do teor de gordura



Anexo i: Evolução da análise de perfil da textura ao longo do tempo de análise.

I.I: Análise do perfil da textura nos painhos

Painhos						
Parâmetros	Ensaio	I	II	III	IV	V
	Dias	0	21	49	75	112
Dureza (g)	Controlo	2907,5±46 1,4 ^a	3037,533±3 23,1 ^b	3036,633±5 37,8 ^c	2784,617±4 17,7 ^d	1641,8±1 99,8 ^e
	Óleo	2624,97±5 50,5 ^a	3913,82±53 7,4 ^b	3051,60±68 8,6 ^c	3445,63±81 7,9 ^d	1217,00± 49,9 ^e
Aderência (g.s)	Controlo	-3484,6 ^A	-4812,3 ^C	-5945,7 ^E	-6180,7 ^G	-5420,4 ^I
	Óleo	-3269,35 ^B	-6442,55 ^D	-5087,55 ^F	-5813,62 ^H	-4775,33 ^J
Elasticidade	Controlo	0,88±0,14 ^a	0,98±0,01 ^b	1,02±0,06 ^c	1,073333±0 ,12 ^d	1,075±0,1 2 ^e
	Óleo	0,94±0,15 ^a	0,99±0,03 ^b	0,96±0,09 ^c	1±0,17 ^d	1,095±0,1 5 ^e
Mastigabilidade	Controlo	1007,01±3 11 ^A	1138,18±17 0 ^B	1283,20±28 0 ^C	1362,53±40 4 ^D	1120,49± 161 ^E
	Óleo	782,53±37 3 ^A	1300,92±19 3 ^B	1172,47±30 2 ^C	1472,81±46 2 ^D	846,04±6 5,4 ^E
Coesão	Controlo	0,405±0,16 a	0,385±0,06 ^b	0,415±0,07 ^c	0,446667±0 ,05 ^d	0,64±0,07 e
	Óleo	0,303±0,07 a	0,338±0,02 ^b	0,407±0,07 ^c	0,427±0,04 ^d	0,642±0,0 5 ^e

Letras iguais (a-e) *superscript*, na mesma coluna e para o mesmo parâmetro de análise, indicam não haver diferenças significativas (P<0,05).

I.2: Análise do perfil da textura nas Alheiras

Alheiras							
Parâmetros	Ensaio	I	II	III	IV	V	VI
	Dias	0	14	36	58	70	85
Dureza (g)	Controlo	522,12±96,3 ^a	687±86,4 ^b	589,43±46,3 ^c	583,17±15,4 ^d	713,25±58,1 ^e	578,52±102,2 ^f
	Óleo	526,93±53,9 ^a	609,68±68,4 ^b	673,67±27,8 ^c	716,03±69,3 ^d	601,08±76,1 ^e	577,38±107,0 ^f
Aderência (g.s)	Controlo	- 50,7±14,1 ^A	- 148,9±21,9 ^B	- 166,9±15,4 ^C	- 211,3±30,1 ^D	- 137,8±59,0 ^E	- 206,7±26,4 ^F
	Óleo	- 50,5±18,5 ^A	- 121,2±42,2 ^B	- 186,3±63,7 ^C	- 204,3±54,1 ^D	- 171,8±43,3 ^E	- 210,4±33,1 ^F
Elasticidade	Controlo	0,97±0,04 ^a	1,27±0,68 ^b	0,97±0,04 ^c	1,25±0,62 ^d	1,43±0,80 ^e	0,98±0,03 ^f
	Óleo	1±0 ^a	0,96±0,10 ^b	1±0 ^c	1,39±0,63 ^d	1,30±0,59 ^e	1,18±0,50 ^f
Mastigabilidade	Controlo	96,67±30,8 ^A	285,64±188,6 ^B	189,1±19,7 ^C	337,18±164,0 ^D	329,27±183,3 ^E	230,28±32,8 ^F
	Óleo	81,51±11,4 ^A	179,57±58,5 ^B	250,9±58,7 ^C	436,84±266,6 ^D	279,665±150,7 ^E	323,90±153,8 ^F
Coesão	Controlo	0,20±0,08 ^a	0,32±0,06 ^b	0,33±0,04 ^c	0,47±0,08 ^d	0,35±0,10 ^e	0,41±0,06 ^f
	Óleo	0,16±0,03 ^a	0,30±0,06 ^b	0,38±0,09 ^c	0,42±0,08 ^d	0,35±0,05 ^e	0,48±0,08 ^f

Letras iguais (a-f) *superscript*, na mesma coluna e para o mesmo parâmetro de análise, indicam não haver diferenças significativas (P<0,05).