

## **Aplicação de formulações conservantes por incorporação em produtos lácteos**

**Jonata Massao Ueda**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

### **Orientado por:**

Doutora Lillian Bouçada de Barros

Doutora Sandrina Alves Heleno

Doutor Rafael Porto Ineu

**Bragança**

**2020**

Este trabalho é financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal pelo apoio financeiro através do projeto: 0377\_Iberphenol\_6\_E



## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente gostaria de agradecer aos responsáveis pela realização de um sonho, meus pais **Fernando Mituru Ueda** e **Simone Emiko Iiesaki**, que nunca mediram esforços e sempre estiveram presentes em todos os momentos, dando todo o suporte necessário e mostrando o melhor lado da vida.

Aos meus orientadores do IPB, **Lillian Barros** e **Sandrina Heleno**, e da UTFPR, **Rafael Porto Ineu**, pela confiança e paciência que tiveram ao longo dessa jornada, além de todos os ensinamentos compartilhados.

A todos os investigadores do CIMO, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, em especial **Márcio Carochó**, **Mariana Correia**, **Filipa Fernandes**, **Custódio Roriz**, **Inês Dias** e **Ângela Fernandes**, que desde o início estiveram presentes e colaboraram de alguma forma.

A todos os **professores** da UTFPR, que me ensinaram tanto durante o curso e apoiaram meus estudos no exterior, principalmente o orientador de iniciação científica e também professor **Evandro Bona**, que me garantiu ensinamentos indispensáveis desde o início da vida acadêmica.

Aos **meus familiares**, que apoiaram e acreditaram no meu potencial, incentivando ao máximo em todas as minhas decisões.

Aos **meus amigos** que estiveram comigo em toda a jornada e me garantiram forças para continuar independente dos motivos, em especial **Gabriel Ramos**, que esteve presente em toda a minha trajetória acadêmica e mesmo antes, proporcionando os melhores momentos.

Ao **Instituto Politécnico de Bragança** e a **Universidade Tecnológica Federal do Paraná** por terem dado as melhores condições para um aluno, além da oportunidade única da Dupla Diplomação, oferecendo experiências únicas, não apenas técnicas, mas também culturais.

E a **todos** que de alguma forma puderam contribuir para a realização desse projeto, tanto profissionais como pessoais.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	I
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	III
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	V
<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Conservação de alimentos .....	1
1.1.1. Necessidade de conservação de alimentos .....	1
1.1.2. Problemática da conservação de alimentos .....	6
1.2. Matrizes naturais como conservantes .....	7
1.2.1. Utilização de conservantes naturais em alimentos .....	8
1.2.2. Caso particular da família Lamiaceae .....	11
1.2.3. Caracterização botânica do alecrim, manjeriço e sálvia .....	12
1.3. Propriedades bioativas.....	14
1.3.1. Métodos de extração.....	19
1.4. Aplicação de conservantes naturais nas indústrias de laticínios.....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
3.1. Plantas utilizadas .....	28
3.2. Preparação dos extratos .....	28
3.3. Análise de triagem da extração por UAE .....	30
3.3.1. Delineamento fatorial fracionado .....	30

3.3.2. Delineamento multinível unifatorial.....	30
3.3.3. Perfil e quantificação dos compostos fenólicos.....	31
3.4. Propriedades bioativas dos extratos obtidos e toxicidade .....	31
3.4.1. Atividade antioxidante.....	31
3.4.2. Atividade antimicrobiana .....	32
3.4.3. Citotoxicidade.....	33
3.5. Incorporação dos extratos em iogurtes .....	33
3.6. Avaliação dos parâmetros físico-químicos.....	37
3.7. Avaliação da textura .....	39
3.8. Perfil nutricional .....	40
3.8.1. Composição centesimal .....	40
3.8.2. Ácidos gordos individuais .....	43
3.8.3. Ácidos orgânicos .....	44
3.8.4. Açúcares solúveis .....	45
3.9. Análise microbiológica.....	47
3.9.1. Preparação das amostras.....	47
3.9.2. Contagem de microrganismos .....	47
3.10. Análise estatística .....	50
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
4.1. Teste de rastreio.....	52
4.1.1. Desenho fatorial fracionado aplicado em <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	52
4.1.2. Delineamento multinível (tempo).....	53
4.1.3. Delineamento multinível (temperatura).....	57
4.1.4. Condições ótimas de extração .....	59

4.2. Propriedades bioativas dos extratos obtidos e toxicidade .....	61
4.2.1. Atividade antioxidante.....	61
4.2.2. Atividade antimicrobiana .....	63
4.2.3. Citotoxicidade.....	67
4.3. Avaliação dos parâmetros físico-químicos.....	68
4.4. Avaliação da textura .....	70
4.5. Perfil nutricional .....	71
4.5.1. Composição centesimal .....	71
4.5.2. Ácidos gordos individuais .....	73
4.5.3. Ácidos orgânicos .....	76
4.5.4. Açúcares solúveis .....	77
4.6. Análise microbiológica.....	79
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Classificação de microrganismos por temperatura de crescimento.....	4
Tabela 2. Relação entre microrganismos e atividade de água.....	5
Tabela 3. Macronutrientes de diversos tipos de iogurtes (por 100 g).....	22
Tabela 4. Suprimento diário de nutrientes provindo de produtos lácteos .....	24
Tabela 5. Tabela nutricional e lista de ingredientes do leite meio gordo .....	35
Tabela 6. Tabela nutricional e lista de ingredientes do iogurte natural.....	35
Tabela 7. Tabela nutricional e lista de ingredientes da polpa de frutas.....	35
Tabela 8. Amostras de iogurte.....	36
Tabela 9. Calibração do colorímetro .....	38
Tabela 10. Análises microbiológicas realizadas.....	47
Tabela 11. Ordem de ensaio do delineamento fracionado e resultados.....	52
Tabela 12. Tentativa de identificação do perfil fenólico dos extratos vegetais.....	56
Tabela 13. Composição fenólica dos extratos vegetais .....	59
Tabela 14. Atividade antihemolítica dos extratos vegetais ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	62
Tabela 15. Atividade antibacteriana dos extratos vegetais ( $\text{mg/mL}$ ) .....	64
Tabela 16. Atividade antifúngica dos extratos vegetais ( $\text{mg/mL}$ ).....	65
Tabela 17. Hepatotoxicidade em valores $\text{GI}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) em células PLP2 .....	67
Tabela 18. Parâmetros de cor, atividade de água e pH.....	68
Tabela 19. Textura dos diferentes iogurtes após realização de um teste de extrusão invertida.....	70
Tabela 20. Parâmetros nutricionais em g/100 g de peso fresco .....	72
Tabela 21. Perfil em ácidos gordos individuais, bem como ácidos gordos saturados totais (SFA) e ácidos gordos monoinsaturados totais (MUFA) .....	74

Tabela 22. Perfil em ácidos orgânicos dos iogurtes apresentados em g/100 g de peso fresco ..... 76

Tabela 23. Perfil em açúcares solúveis dos iogurtes apresentados em g/100 g de peso fresco ..... 78

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Ação do radical livre sobre as moléculas .....	2
Figura 2. Limites de temperatura para crescimento de microrganismos .....	4
Figura 3. Relação entre o metabolismo primário e secundário de plantas .....	10
Figura 4. Folhas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	12
Figura 5. Folhas de <i>Ocimum basilicum</i> L.....	13
Figura 6. Folhas de <i>Salvia officinalis</i> L.....	14
Figura 7. Estrutura química do ácido carnósico (a) e rosmarínico (b) .....	17
Figura 8. Processo de cavitação e liberação dos compostos bioativos .....	20
Figura 9. Sálvia triturada .....	28
Figura 10. Equipamento de extração assistida por ultrassons .....	29
Figura 11. Evaporador rotativo.....	29
Figura 12. Incorporação dos extratos e polpa de frutas no iogurte.....	34
Figura 13. Diferença entre o iogurte in natura e o incorporado com a polpa.....	34
Figura 14. Amostras de iogurte .....	37
Figura 15. Colorímetro .....	37
Figura 16. Titulador e potenciômetro .....	38
Figura 17. Medidor de atividade de água .....	39
Figura 18. Texturómetro.....	40
Figura 19. Extrator de Soxhlet.....	41
Figura 20. Digestor para proteínas .....	41
Figura 21. Destilador Kjeldahl .....	42
Figura 22. Medidor de humidade .....	42

Figura 23. Mufla.....	43
Figura 24. CG-FID .....	44
Figura 25. HPLC-DAD .....	45
Figura 26. HPLC-RI.....	46
Figura 27. Meio de cultura PCA.....	48
Figura 28. Meio de cultura VRBLA.....	49
Figura 29. Meio de cultura DRBC .....	49
Figura 30. Meio de cultura MRS.....	50
Figura 31. Diagrama de Pareto da magnitude dos efeitos .....	53
Figura 32. Concentração dos compostos fenólicos para (a) alecrim; (b) manjerição e (c) sálvia para diferentes tempos.....	54
Figura 33. Rendimento médio e comparação entre os três extratos analisados .....	55
Figura 34. Efeito da temperatura no rendimento de ácido rosmarínico nas plantas avaliadas .....	58
Figura 35. Perfil fenólico do extrato de alecrim a 280 nm (cima) e 370 nm (baixo). Os números apresentados correspondem aos compostos descritos na Tabela 13.....	60
Figura 36. Perfil fenólico do extrato de manjerição a 280 nm. Os números apresentados correspondem aos compostos descritos na Tabela 13 .....	61
Figura 37. Perfil fenólico do extrato de sálvia a 280 nm (cima) e 370 nm (baixo). Os números apresentados correspondem aos compostos descritos na Tabela 13.....	61
Figura 38. Representação da cor dos diferentes iogurtes ao longo dos 14 dias com dados recolhidos do colorímetro.....	69
Figura 39. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos ao longo de 14 dias.....	79
Figura 40. Contagem de bactérias lácticas psicrotófilas ao longo de 14 dias .....	80

**LISTA DE ABREVIATURAS**

°C	Graus Celsius
a*	Coordenada de cor vermelho/verde
AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorido
ANOVA	Análise de variância
ATCC	Coleção Americana de Culturas de Tipo
ATP	Trifosfato de adenosina
a <sub>w</sub>	Atividade de água
b*	Coordenada de cor amarelo/azul
CFU	Unidades formadoras de colónias
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CFI	Concentração mínima inibitória
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
D65	Iluminante padrão (luz natural do dia)
DAD	Detetor de arranjo de diodos
DMEM	Meio Dulbecco's MEM ( <i>Modified Eagle Medium</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRBC	Meio <i>Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol</i>
E211	Aditivo conservante benzoato de sódio
E244	Aditivo conservante metabissulfito de potássio
E300	Ácido ascórbico
E392	Aditivo conservante extrato de alecrim
EAU	Extração assistida por ultrassom
EAU	Extração assistida por ultrassons
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos
Eh	Potencial de oxirredução
ESI	Ionização por electrospray
Et/H <sub>2</sub> O	Solução com etanol e água
FDA	Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos
FID	Detetor de ionização de chama
fw	Peso fresco
GI <sub>50</sub>	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
H <sub>2</sub> O	Água
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSD	Teste de Tukey
Ht <sub>50</sub>	Tempo para ocorrer 50% da hemólise
i.e.	Isto é
IA	Iogurte com extrato de alecrim
IAM	Instituto de Microbiologia Aplicada

IC	Iogurte controlo
IC <sub>50</sub>	Concentração necessária para inibir 50% da hemólise oxidativa
IM	Iogurte com extrato de manjeriço
IS	Iogurte com extrato de sálvia
IS	Padrão internacional
ISO	Organização Internacional de Normalização
ISP	Iogurte com sorbato de potássio
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de potássio
L*	Grau de luminosidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOQ	Limite de quantificação
LSD	Diferença mínima significativa
m/z	Razão massa/carga
Me/H <sub>2</sub> O	Solução com metanol e água
MME	Médias marginais estimadas
MRSagar	Meio De Man, Rogosa e Sharpe
MS	Espectrómetro de massa
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
NCTC	Coleção Nacional de Culturas de Tipo
NH <sub>2</sub>	Grupo amino
OH	Grupo hidroxilo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OxHLIA	Inibição da hemólise oxidativa
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCA	Meio <i>Plate Count Agar</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PLP2	Células de fígado de porco
ppm	Partes por milhão
PUFA	Ácidos gordos poliinsaturados
RI	Refratômetro diferencial
RNA	Ácido ribonucleico
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta
SFA	Ácidos gordos saturados
SFB	Soro fetal bovino
SPME	Micro-extração em fase sólida
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	Tipos de conservante
TP	Tempo de prateleira
U	Unidade
UE	União Europeia
UHT	Ultrapasteurização
UPLC	Cromatógrafo líquido de ultra performance
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
v/v	Porcentagem volume/volume
VRBLA	Meio <i>Violet Red Bile Lactose Agar</i>
Δt	Intervalo de tempo
λ <sub>max</sub>	Comprimento de onda máximo

## RESUMO

Os alimentos são passíveis de diversas formas de degradação, seja pelo oxigênio presente na atmosfera, fatores microbiológicos, enzimáticos, físicos e entre outros, sendo fundamental o estudo de alternativas para conservá-los. A população está cada vez mais preocupada com os aditivos sintéticos utilizados em alimentos, seja pelos estudos referentes aos riscos à saúde, ou pelas opiniões públicas geradas na mídia.

Portanto, a procura e o estudo por alimentos naturais ou com o mínimo de aditivos artificiais está cada vez maior, garantindo uma maior segurança ao consumidor. Plantas são conhecidas por serem fontes ricas em compostos bioativos, visto que esses são considerados uma defesa à agentes externos como microrganismos, agentes oxidantes e radiação ultravioleta, e por isso seus extratos são investigados como uma fonte promissora de aditivos naturais.

Desse modo, os objetivos do presente trabalho envolvem a análise de três plantas: alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e sálvia (*Salvia officinalis* L.) referente às suas moléculas conservantes. Realizou-se a otimização da extração dos compostos bioativos com tecnologias sustentáveis e de baixo custo como a extração por ultrassom, utilizando solventes verdes (água e etanol); caracterização química dos extratos obtidos por HPLC-DAD-ESI/MS; avaliação da bioatividade dos extratos (atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica); incorporação dos extratos otimizados em iogurtes e avaliação da estabilidade dos ingredientes ao longo da vida de prateleira através de parâmetros físicos e químicos como textura, cor e pH; análise microbiológica, nutricional e monitoramento das moléculas conservantes. De acordo com os resultados obtidos, quanto a otimização, verificou-se que a percentagem de solvente é o fator mais relevante para a obtenção de um extrato rico em ácido rosmarínico, seguido pelo tempo de extração e potência do equipamento. Para a atividade antioxidante e antimicrobiana, o extrato de alecrim obteve o melhor resultado, seguido pela sálvia e por fim, o manjeriço. Nenhum dos três extratos vegetais avaliados apresentaram hepatotoxicidade, ultrapassando a concentração máxima testada.

Por fim, verificou-se que os extratos vegetais não apresentaram mudanças nas características físico-químicas e nutricionais dos iogurtes. Além disso, não interferiu no crescimento das bactérias lácticas, microrganismo fundamental para o processo de fabricação do iogurte.

## ABSTRACT

Foods are susceptible to various forms of degradation, either by oxygen present in the atmosphere, microbiological factors, enzymatic, physical, and others, and it is essential to study ways of preserving food. The population is increasingly concerned with the synthetic additives used in food, either by studies related to health risks, or by public opinions generated in the media.

The demands for non-processed foods or with a minimum of artificial additives is increasing due to an increased awareness of consumers towards whtier diets. Plants are known to be rich sources of bioactive compounds, since these are considered a defense mechanism against external agents such as microorganisms, oxidizing agents, and ultraviolet radiation, and for this reason their extracts are investigated as a promising source of natural additives for the food industry.

The objectives of this work involve the study of three plants: rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) regarding their preservative molecules. The extraction of bioactive compounds was optimized with sustainable and low-cost technologies such as ultrasound extraction (UAE), using green solvents (water and ethanol); chemical characterization of the extracts obtained by HPLC-DAD-ESI/MS; evaluation of the bioactivity of the extracts (antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity); incorporation of the optimized extracts in yogurts and evaluation of the stability of the ingredients over the shelf life by analysing physical and chemical parameters such as texture, color and pH; microbiological and nutritional analysis. According to the obtained results, as for optimization, it was found that the percentage of solvent is the most relevant factor for obtaining an extract rich in rosmarinic acid, followed by the extraction time and ultrasonic power. For the antioxidant and antimicrobial activity, rosemary extract showed the best result, followed by sage and finally, basil. None of the three plant extracts showed hepatotoxicity, exceeding the maximum concentration tested.

Finally, the plant extracts did now show changes in the physico-chemical and nutritional characteristics of the yogurts. Moreover, it did not interfere with the growth of lactic acid bacteria, a fundamental microorganism for the yogurt manufacturing process.

## **1. INTRODUÇÃO**

### 1.1. Conservação de alimentos

#### 1.1.1. Necessidade de conservação de alimentos

Diferentes processos aplicados no passado já visavam a conservação de alimentos, nomeadamente a defumação, a utilização do sal, vinagre e álcool, com base no pressuposto da rápida degradação dos alimentos que seria adiada com a utilização destas metodologias (Gava, 2007).

Concomitantemente, em tempos de guerra, a deterioração dos alimentos e o seu controlo eram fatores essenciais para manter os soldados longe de doenças, e, com isso, foram desenvolvidos os alimentos enlatados, surgindo então a necessidade de conservar esses alimentos pelo maior tempo possível, tornando-se este, num dos principais objetivos da indústria alimentar (Potter & Hotchkiss, 1999).

De entre os maiores motivos para a necessidade de conservação de alimentos está a sua degradação, a qual pode ocorrer devido a um mal delineamento das práticas agrícolas, a necessidade de uma maior variedade de alimentos na dieta humana e a perda por más condições de transporte e armazenamento, sendo necessário muitas vezes o uso de conservantes para reduzir esse desperdício gerado (Rahman, 2007).

Além disso, a procura dos consumidores por alimentos com maior qualidade tem aumentado significativamente, afetando diretamente a maneira como o alimento é conservado (Baines, 2012). A perda de qualidade do alimento pode provir de fatores microbiológicos, enzimáticos, químicos, físicos e mecânicos (Rahman, 2007). Aproximadamente 25% de todos os alimentos produzidos são perdidos devido à contaminação microbiana ao longo da cadeia de suprimentos. Além disso, mais de 40% dos danos gerados ao alimento ocorrem na área do varejo e no contato com o consumidor, sendo eventualmente descartado como lixo (Chibane *et al.*, 2018).

O oxigénio é o elemento químico mais predominante no planeta e existe na sua forma diatómica (O<sub>2</sub>), e, quase todos os organismos vivos o utilizam para produção de energia, sendo um elemento essencial para a vida. Porém, este elemento, devido à sua alta reatividade tem tendência para oxidar moléculas, tecidos ou órgãos que estejam na sua

vizinhança. Assim, os alimentos que estejam em contacto com o oxigénio ou as espécies reativas que dele derivem tendem a oxidar-se (Rojas & Buitrago, 2019; Carcho & Ferreira, 2012).

Desta forma, o uso de aditivos é algo comum na indústria alimentar, visto que possuem diversas funções como controlar o pH, dar cor ou aroma, intensificar o sabor e conservar alimentos pela inibição da sua oxidação e capacidade de impedir o desenvolvimento de microrganismos (Rahman, 2007). A oxidação é sem dúvida um dos fatores mais problemáticos na conservação dos alimentos, sendo necessária a utilização de agentes capazes de a impedir. De acordo com Halliwell (2007), os antioxidantes são definidos como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, reduz, previne ou remove o dano gerado do substrato pela oxidação”. A Figura 1 representa a ação do radical livre sobre proteínas, lípidos, açúcares e DNA/RNA.

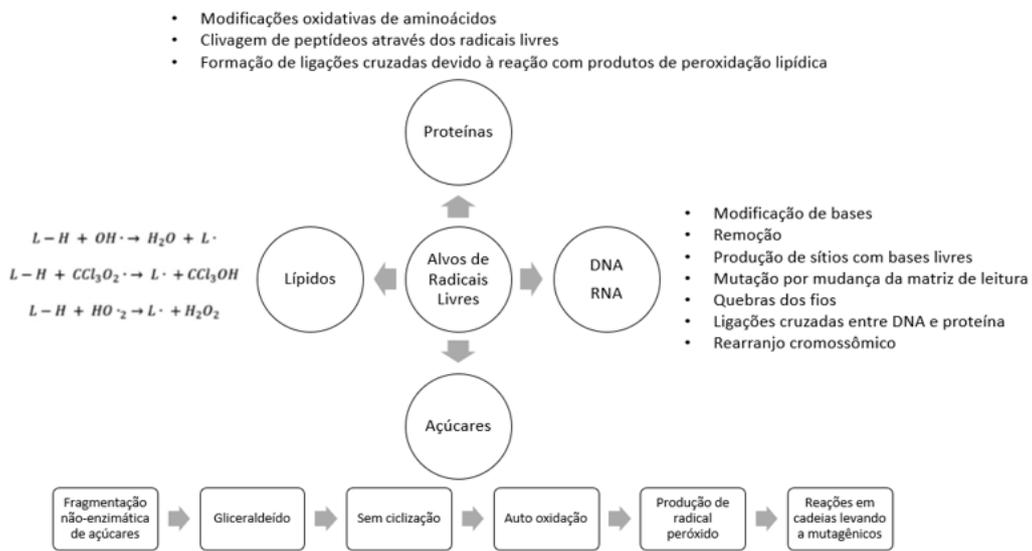


Figura 1. Ação do radical livre sobre as moléculas

Fonte: Adaptado de Carcho & Ferreira (2012).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, fonte ou solubilidade (Santos-Sánchez *et al.*, 2017). Existem diversos mecanismos de funcionamento de antioxidantes, sendo um deles a inativação do radical livre por transferência de elétrons. No primeiro processo o radical livre remove o átomo de hidrogênio do antioxidante, sendo que quanto menor a energia de ligação entre o grupo hidroxilo (O-H), mais facilmente ocorre a reação de inativação do radical livre e melhor é a atividade antioxidante. Outro dos mecanismos propostos baseia-se na doação de elétrons do antioxidante para o radical livre. Os diferentes mecanismos de oxidação de radicais e formas de os inativar justificam a multitude de aditivos antioxidantes que existem no mercado (Vuolo, Lima & Junior, 2019).

Outro tipo de conservação passa pela redução da proliferação microbiana no exterior ou no interior do alimento. Por definição, antimicrobianos são compostos químicos que estão naturalmente presentes ou são adicionados aos alimentos, com o objetivo principal de conservação através da inibição ou inativação de microrganismos patogênicos. Conseqüentemente, evitam a perda de alimentos através de deterioração microbiana e garantem que o alimento será seguro para consumo (Davidson *et al.*, 2015).

Quanto a fatores microbiológicos, podem ser considerados o crescimento de microrganismos (representado na Figura 2 e Tabela 1) em que é gerada a produção de *off-flavors* e toxinas; fatores enzimáticos como reações de escurecimento, mudança da coloração e *off-flavor*; fatores químicos como perdas de cor, de sabor, de nutrientes e reações de oxidação; fatores físicos como a cristalização, mudança de fase, encolhimento e colapso; e os fatores mecânicos como danos por vibração e por pressão (Rahman, 2007).

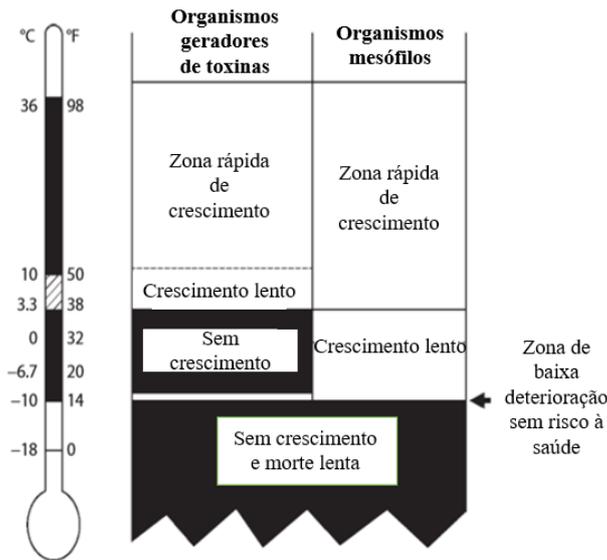


Figura 2. Limites de temperatura para crescimento de microrganismos

Fonte: Adaptado de Volpe *et al.* (2015).

Tabela 1. Classificação de microrganismos por temperatura de crescimento

Tipo de microrganismo	Mínimo	Ótimo	Máximo (°C)
Psicrófilos	-5	0	30
Psicrotrófilos	0	15-25	37
Mesófilos	10	30-37	45
Termotróficos	20	45	50
Termófilos	40	55	65

Fonte: Adaptado de Volpe *et al.* (2015).

Podem também ser considerados o controle de temperatura durante o armazenamento e transporte; humidade relativa do meio; exposição à luz (ultravioleta e infravermelho) durante o processamento, armazenamento e distribuição; composição da atmosfera da embalagem, entre outros (Volpe *et al.*, 2015).

No que respeita aos fatores intrínsecos ao alimento, existem certas variáveis que podem ser consideradas para o estudo de tempo de prateleira como a humidade e transferência de vapor de água, pH e acidez total, potencial de oxirredução (Eh), oxigénio disponível, tipo e quantidade de nutrientes e mudanças químicas e bioquímicas do alimento (Volpe *et al.*, 2015).

A atividade de água ( $a_w$ ) é um indicador quanto à estabilidade do alimento em função do crescimento microbiano, visto que a  $a_w$  representa a quantidade de água disponível para o mesmo. Cada classe de microrganismos possui uma  $a_w$  mínima, ótima e máxima, na qual a  $a_w$  mínima para cada tipo de microrganismo está representada na Tabela 2 (Volpe *et al.*, 2015).

Tabela 2. Relação entre microrganismos e atividade de água

Tipo de microrganismo	$a_w$ mínimo de crescimento
Salmonella	0,94
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,83 (0,90 para toxina)
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92
<i>Escherichia coli</i>	0,95
Leveduras	0,8
Fungos	0,6

Fonte: Volpe *et al.* (2015).

Assim, através da medição da  $a_w$  do alimento é possível prever quais são os potenciais microrganismos com capacidade de crescimento; manter uma estabilidade química do alimento; minimizar reações indesejáveis como reações de oxidação; estender a atividade de enzimas e otimizar propriedades físicas do alimento como por exemplo a migração de humidade no alimento e mudança de textura (Volpe *et al.*, 2015).

Apesar dos problemas referentes aos antioxidantes sintéticos, os benefícios do uso do aditivo superam os riscos. Os problemas relacionados à oxidação dos alimentos podem ser um grande risco à saúde quando comparados com o consumo dos antioxidantes (Gulçin, 2012). Devido ao uso exacerbado de conservantes artificiais, novas aplicações envolvendo aditivos naturais têm sido estudadas. Extratos de plantas são considerados como uma ótima alternativa aos conservantes artificiais, compostos por diferentes grupos de agentes antimicrobianos e antioxidantes como compostos fenólicos, ácidos orgânicos, óleos essenciais, entre outros (Menezes & Athmaselvi, 2018).

### 1.1.2. Problemática da conservação de alimentos

Quase todos os alimentos de origem animal e vegetal tendem a deteriorar-se com facilidade. Assim, para conservar os alimentos deve-se impedir ou retardar o crescimento de microrganismos ou reações de oxidação e para que isso aconteça, deve-se controlar as condições do alimento. Porém, os alimentos em geral possuem nutrientes, humidade, e oxigénio, favorecendo a propagação microbiana (Gava, 2007).

A deterioração microbiana, física ou química pode ser iniciada em qualquer etapa do processamento alimentar, desde a colheita, transporte, processamento, embalagem, tempo de prateleira, entre outros. Desta forma, é imperativo o máximo de cuidado em cada etapa, desde o primeiro contato com a matéria-prima até a distribuição do produto final. Primeiramente, é importante identificar as propriedades e características que deverão ser conservadas, sendo que algum fator pode ser crucial para um alimento e para outros muitas vezes desnecessário. Além disso, certas características do processamento podem ser consideradas desejáveis ou indesejáveis para a aceitação do produto final. De entre os possíveis exemplos, cita-se: reação de caramelização e Maillard, perda de humidade, formação de poros, entre outros (Rahman, 2007). Caso o alimento não esteja estéril, contenha água disponível e não esteja congelado, posteriormente irá sofrer alterações, favorecendo a multiplicação de microrganismos no produto, uma vez que a quantidade e distribuição de água no alimento é um dos fatores mais importantes na influência do crescimento microbiano (Freitas & Figueiredo, 2000). Na tentativa de desenvolver um novo método de conservação de alimentos, além de ser considerada a análise microbiana, deve ter-se em atenção as transformações físicas e sensoriais do

alimento, devendo manter-se intactas as condições naturais do produto durante todo o processo (Gava, 2007).

Por fim, quanto ao uso de aditivos alimentares, devem ser geralmente reconhecidos como seguros (do inglês, GRAS). Além disso, os aditivos conservantes não podem alterar o alimento além do objetivo específico para o qual foi designado, ou seja, apenas conservar (Carocho *et al.*, 2014).

Já foram realizados diversos estudos relacionando o consumo de aditivos artificiais com problemas relacionados à saúde (Gokoglu, 2018). De acordo com Mamur *et al.* (2012), verificou-se que o conservante sorbato de sódio possui efeito genotóxico em linfócitos humanos *in vitro*. Lerner & Matthias (2015) associaram a indústria de aditivos alimentares com o aumento da incidência de doenças autoimunes. Em outro estudo realizado por Ritz *et al.* (2012), associou-se os fosfatos, conservante utilizado na indústria de carnes, com problemas renais e cardiovasculares. Além disso, deve-se ter atenção ao uso combinado de aditivos, na qual Binstok *et al.* (1998) investigou o efeito da combinação de sorbatos e nitritos em carnes, relacionado com a formação de compostos mutagênicos. Portanto, a substituição dos conservantes sintéticos pelos naturais torna-se uma alternativa para garantir uma maior segurança, tanto para a população como para a natureza.

## 1.2. Matrizes naturais como conservantes

Aditivos conservantes são definidos pela *European Food Safety Authority* (EFSA) como “substância que tem como objetivo prolongar a vida de prateleira dos alimentos, protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos e/ou contra o crescimento de microrganismos patogênicos” (EFSA, 2008). De acordo com a U.S. *Food and Drug Administration* (FDA), ingredientes naturais são referidos como “ingredientes diretamente extraídos de produtos animais ou plantas, sendo contrário de ingredientes produzidos sinteticamente (FDA, 2004).

Ervas e especiarias sempre foram tradicionalmente utilizadas pelas suas características de mudar o *flavor* do alimento, de conservação de alimentos e objetivos

medicinais devido ao conhecimento da população em relação à capacidade de inibição de bactérias, bolores e leveduras (Smid & Gorris, 2007). Quanto à capacidade antioxidante, quase todas as plantas possuem alguma atividade e ainda possuem uma regulamentação com menores restrições por serem provenientes de fontes naturais (Pokorny, 2007). Apesar da substância ser encontrada naturalmente em alimentos, não há a garantia que o composto não é tóxico, sendo necessário estudos de potenciais carcinogênicos e efeitos mutagênicos (Gulçin, 2012).

Embora a maioria dos extratos provindos de plantas são definidos como substâncias GRAS, a utilização desses compostos é limitada por afetarem as características sensoriais do alimento aplicado, na qual a dose necessária para obter o efeito antimicrobiano ultrapassa os níveis organoléptico aceitáveis (Juneja, Dwivedi & Yan, 2012). Diversos compostos fenólicos biologicamente ativos possuem um ou mais anéis aromáticos, sendo responsáveis pelo aroma e a cor (Gulçin, 2012).

Apesar de existirem diversas metodologias para a conservação de alimentos, as técnicas de congelamento, esterilização e secagem são consideradas técnicas muito agressivas para o alimento. Além disso, alimentos manufaturados como carnes, frutas e derivados carecem de métodos de conservação na medida em que não é adequada a utilização dessas metodologias robustas, existindo como alternativa o uso de aditivos provindo de fontes naturais (Smid & Gorris, 2007).

De entre as alternativas provindas de fontes naturais, destacam-se determinadas plantas que possuem alta atividade antioxidante e antimicrobiana, como por exemplo o alecrim, denominado pela legislação da EFSA como E392 (Council Regulation, 2011). Outras plantas que são estudadas em função destas bioatividades podem ser consideradas, como o funcho, a erva-cidreira, a sálvia, o manjeriço, o orégão e diversas outras (Berdahl & McKeague, 2015).

### 1.2.1. Utilização de conservantes naturais em alimentos

A utilização de conservantes naturais abrangem dois desafios importantes: garantir a segurança do consumidor com a utilização de fontes naturais contrário aos

aditivos sintéticos, e reduzir a quantidade de resíduo ou lixo gerado a partir de alimentos degradados (Chibane *et al.*, 2018).

Um dos modos de ação das ervas e especiarias antioxidantes baseia-se em bloquear os radicais livres através de átomos doadores de hidrogénio. De entre as propriedades desejáveis para que a substância seja considerada um ótimo conservante, estão descritas: ser seguro para consumo; não ter efeito significativo na cor, aroma e *flavor* do alimento; ser efetivo em baixas concentrações; ser estável durante a preparação do alimento, processamento ou armazenamento; ser económico; versatilidade no uso; ser eficaz tanto em ambientes hidrofílicos como lipofílicos; fácil utilização e aumentar significativamente o tempo de prateleira (Embuscado, 2015).

As plantas, pelo simples fato de conseguirem transformar dióxido de carbono em diversos compostos mais complexos, além do oxigénio, essencial para a vida humana, com apenas água e a energia do sol, são consideradas organismos de interesse neste âmbito (Cseke *et al.*, 2006). Conservantes naturais são considerados mais saudáveis quando comparado com os artificiais na perspectiva do consumidor e supõe-se que os extratos de plantas são comestíveis devido ao consumo humano já realizado tradicionalmente (Chibane *et al.*, 2018).

Relativamente aos compostos produzidos pelas plantas, estes podem ser divididos em dois grupos principais: metabolitos primários e secundários, em que os metabolitos primários são definidos por serem os nutrientes essenciais para manutenção da célula como ácidos gordos, proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos; enquanto os metabolitos secundários, apesar de não serem nutrientes essenciais nem participarem da fotossíntese ou respiração celular, são conhecidos por também serem vitais para a sobrevivência da planta, pois são utilizados como um meio de atrair a polinização, proteção contra agentes oxidantes e radiação ultravioleta (Vuolo, Lima & Junior, 2019). Além disso, a planta produz esses compostos como uma defesa aos microrganismos, e por isso são considerados como uma fonte promissora de antimicrobianos (Chibane *et al.*, 2018).

Assim, os metabolitos secundários são divididos em três grupos principais, de acordo com sua rota de biossíntese e estrutura: compostos fenólicos; terpenóides e alcaloides. Todos esses compostos são de alguma forma conectados com os metabolitos

primários por serem utilizados como barreiras bloqueadoras e enzimas biossintetizadoras, como representado na Figura 3 (Vuolo, Lima & Junior, 2019).

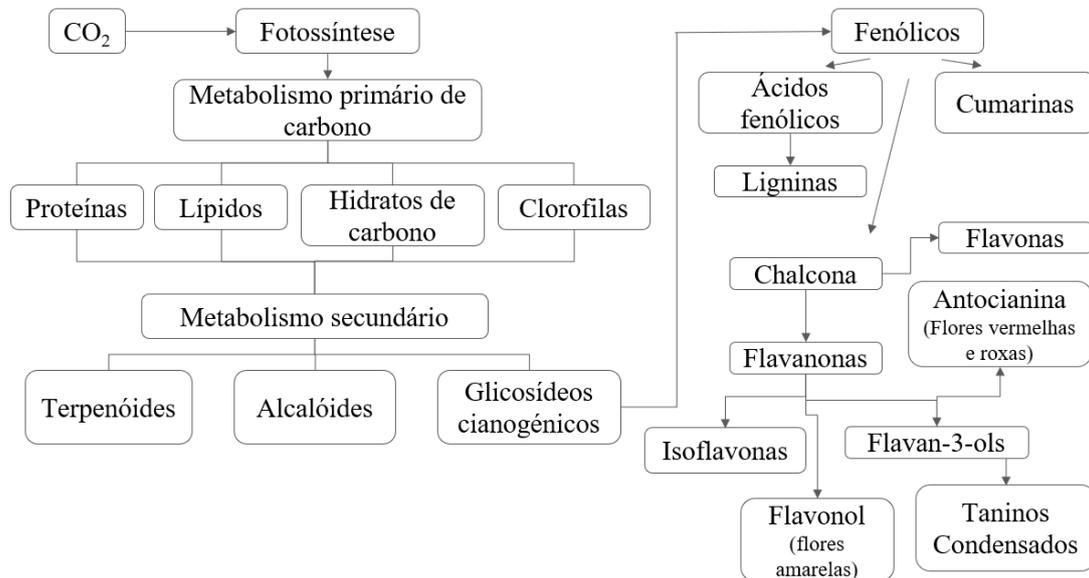


Figura 3. Relação entre o metabolismo primário e secundário de plantas

Fonte: Adaptado de Vuolo, Lima & Junior (2019).

São diversas as aplicações destas moléculas na indústria como agentes conservantes. Num estudo realizado pelos autores Carocho *et al.* (2016a), extratos de flores de castanheiro e erva-cidreira foram aplicados como agentes conservantes naturais em queijos maturados da Serra da Estrela, não havendo alteração no perfil nutricional do alimento e conservando os ácidos gordos da oxidação lipídica durante o tempo de prateleira deste produto.

Em outro estudo, Caleja *et al.* (2017) avaliaram a capacidade antioxidante dos extratos de funcho e camomila que foram posteriormente incorporados em biscoitos, obtendo boa atividade antioxidante quando comparados com biscoitos incorporados com conservantes artificiais, apesar de usarem maior quantidade do extrato natural. Além disso, não houve modificação no perfil nutricional do alimento nem na aparência externa dos biscoitos.

Ribeiro *et al.* (2016a) comparou o uso de extrato de estragão com o conservante comercial ácido ascórbico (E300) em massa de pizza, tendo o extrato demonstrado resultados similares quando à capacidade conservante, além de ter conferido propriedades bioativas ao alimento, traduzindo-se numa mais valia para o consumidor.

### 1.2.2. Caso particular da família Lamiaceae

As plantas desta família são utilizadas há séculos devido às suas propriedades culinárias e medicinais, atribuídas quer aos seus óleos essenciais como às plantas na sua forma natural, sendo conhecidos mais de 250 géneros e 7000 espécies. Quanto à sua classificação, estas pertencem ao Reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida e ordem Lamiales (Berdahl & McKeague, 2015).

A família Lamiaceae tem como característica a semelhança das flores com os lábios superiores e inferiores fundidos, com folhas do tipo simples, podendo estar dispostas de maneira oposta ou verticilarmente. O limbo pode apresentar-se partido, dentado ou inteiro. Os frutos, por fim, são secos e as sementes quase não possuem endosperma (Berdahl & McKeague, 2015).

Martins *et al.* (2014) avaliaram a bioatividade de extratos de orégãos, variando o método de extração (decoção, infusão e hidroetanólica) e verificaram que de entre os três métodos de extração, a decoção obteve as concentrações mais elevadas de flavonoides e compostos fenólicos totais, seguido por infusão e por fim a extração hidroetanólica. Em relação à capacidade antimicrobiana, a extração hidroetanólica obteve maior efetividade para *Escherichia coli*, indicando que o método de extração pode influenciar no propósito final do extrato (propriedade antioxidante ou antimicrobiana, por exemplo).

Carocho *et al.* (2016b) verificaram a capacidade conservante do manjeriço quando aplicado em queijo da Serra da Estrela tendo concluído que a incorporação das folhas de manjeriço diretamente no queijo, tiveram efeito antioxidante, reduziram o teor de humidade e preservaram os ácidos gordos insaturados e proteínas presentes no alimento. Além disso, foram comparadas as folhas desidratadas com o extrato obtido por

decoção, sendo o extrato resultante da decoção o que demonstrou o maior efeito conservante.

Num outro estudo, Martins *et al.* (2015) estudaram a bioatividade de diferentes extratos de sálvia (infusão, decoção e metanol/água 80:20 v/v), sendo que as extrações resultantes da decoção e do solvente metanol/água na proporção 80:20 v/v revelaram os melhores resultados em termos de propriedades antioxidantes e antifúngicas, sendo a extração por decoção a que apresentou maior concentração de compostos fenólicos.

### 1.2.3. Caracterização botânica do alecrim, manjeriço e sálvia

**Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.):** é um arbusto perene que pode alcançar até 1,5 metros de altura, originário do Mediterrâneo, porém, cresce naturalmente em Marrocos e é cultivada intencionalmente nos Estados Unidos, França e Espanha (Figura 4). As hastes do alecrim são lenhosas e as suas folhas são filiformes, pequenas e verdes na parte superior, enquanto esbranquiçadas no verso, com pelos finos e curtos (Berdahl & McKeague, 2015).



Figura 4. Folhas de *Rosmarinus officinalis* L.

Fonte: Plants of the World Online (2020)

É possível colher esta planta 3 a 4 vezes por ano, sendo que sua produção se mantém durante 5 a 7 anos. Atualmente o alecrim é cultivado como uma planta ornamental, com folhas em forma de cera e tolerante à seca. Para a sua produção comercial, o processo passa pela secagem da planta, sendo selecionadas as plantas com alto teor de compostos fenólicos e resistentes ao frio (Berdahl & McKeague, 2015).

**Manjericão (*Ocimum basilicum* L.):** é um arbusto perene, na qual atualmente existem mais de 60 variedades diferentes, sendo que sua produção se mantém até o segundo ano de cultivo e a primeira colheita é feita 3 meses após o plantio (Figura 5). Não tolera calor excessivo, frio e geadas e não suporta colheitas subsequentes, necessitando do replantio (May *et al.*, 2018).



Figura 5. Folhas de *Ocimum basilicum* L.

Fonte: Plants of the World Online (2020)

As suas espécies diferenciam-se a partir do aroma, podendo ter um odor doce, de limão, cravo, anis, entre outros. Além disso, também é classificado pelo tamanho, coloração da folhagem, porte e formato da copa. Apresenta caule ereto e ramificado e pode atingir até 1 metro de altura, sendo as suas folhas delicadas, ovaladas e cor verde-

brilhante. De entre as suas aplicações, o manjeriço é utilizado principalmente como condimento, na forma de folhas frescas ou secas (May *et al.*, 2018).

**Sálvia (*Salvia officinalis* L.):** é um arbusto perene nativo da região do Mediterrâneo (Figura 6), destacando-se as regiões da Europa Central, Albânia e Estados Unidos e pode ser colhido 2 a 3 vezes por ano, com vida útil de até 4 anos (Berdahl & McKeague, 2015).



Figura 6. Folhas de *Salvia officinalis* L.

Fonte: Plants of the World Online (2020)

É uma planta subarborescente, com folhas aromáticas largas, elípticas e de coloração verde-acinzentadas. Apresenta hastes ramificadas, eretas e recobertas por tricomas curtos. São inicialmente herbáceas e com o passar do tempo tornam-se lenhosas (Berdahl & McKeague, 2015).

### 1.3. Propriedades bioativas

De acordo com Valls *et al.* (2013), a influência de alimentos funcionais e nutracêuticos na economia ultrapassam 40 bilhões de dólares, aumentando a cada ano

devido ao aumento de vendas e desenvolvimento de novos produtos. Esse fato ocorre pela melhoria dos hábitos alimentares e conseqüentemente desejo de uma maior expectativa de vida, influenciados pela mídia e propagandas.

O consumo de frutas e vegetais vêm sendo associados com a redução de diversas doenças como por exemplo a arteriosclerose coronária. A mesma relação inversa também já foi verificada, relacionando a falta de consumo desses alimentos com doenças cardiovasculares e câncer, sendo atribuído à falta dos compostos antioxidantes presentes nas frutas e vegetais (Gulçin, 2012).

Um composto bioativo é definido como qualquer composto presente em alimentos, provindo de animais, plantas ou derivados, que possui um efeito no organismo após a sua ingestão, enquanto que um ingrediente bioativo é qualquer substância que, quando adicionada em alimentos, fornece algum tipo de benefício para a saúde (Fernandes *et al.*, 2019). As fontes mais comuns de compostos bioativos são derivadas de plantas como frutas, vegetais, legumes, grãos e algas (Arroyo *et al.*, 2019). Quanto aos benefícios para a saúde, os compostos bioativos são conhecidos pela sua capacidade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral e propriedades terapêuticas. Além disso, também têm sido utilizados como um meio de eliminação de microrganismos patogênicos devido à resistência desenvolvida aos agentes terapêuticos (antibióticos) (Galotto, Guarda & De Discastillo, 2015).

Não há apenas uma forma única de classificar os compostos bioativos, seja pela sua solubilidade, caminho de biossíntese ou classificação farmacológica. De acordo com Croteau, Kutchan & Lewis (2000), os compostos bioativos são divididos em três grandes categorias: 1) terpenos e terpenóides (cerca de 25.000 compostos); 2) alcaloides (aproximadamente 12.000 compostos) e 3) compostos fenólicos (cerca de 8.000 compostos). Estes compostos provêm de diversas partes das plantas (folhas, frutos, sementes e até raízes), e, são considerados responsáveis pela redução de doenças crônicas, relacionadas com o stress oxidativo (Ferreira & Abreu, 2007).

De entre os bioativos mais conhecidos fazem parte os carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e entre outros, estando amplamente descritos como antioxidantes pela sua capacidade de bloqueio de radicais livres, inibição de alterações

oxidativas, pelos seus efeitos benéficos quanto ao tratamento de hipertensão e diabetes tipo 2 e auxílio na inibição do crescimento em células tumorais (Ferreira & Abreu, 2007).

Relativamente à atividade antimicrobiana, acredita-se que a relação dos compostos fenólicos com esta capacidade está relacionada com a ruptura da membrana citoplasmática dos microrganismos, gerando a perda do conteúdo celular, porém acredita-se que o aumento da natureza lipofílica dos fenóis pode aumentar as propriedades antimicrobianas do composto (Msagati, 2013; Lule & Xia, 2005). A habilidade de penetrar mais facilmente a membrana celular e conseqüentemente gerar danos à estrutura e os componentes intracelulares estão relacionados diretamente com a efetividade do agente antibacteriano (Chibane *et al.*, 2018).

A membrana citoplasmática do microrganismo é formada por uma barreira hidrofóbica e o composto antimicrobiano age dificultando a integridade da mesma, afetando a manutenção das funções celulares como o transporte de substâncias e regulação do metabolismo, por exemplo. No geral, os compostos fenólicos e outras substâncias produzidas a partir do metabolito secundário das plantas são mais eficazes em bactérias Gram-positivo do que Gram-negativo. Isso ocorre devido as bactérias Gram-negativas possuírem uma camada de lipopolissacarídeo, oferecendo a bactéria uma proteção extra contra os fitoquímicos (Chibane *et al.*, 2018; Meyer *et al.*, 2002).

De acordo com Chibane *et al* (2018), a nível celular, existem diversos mecanismos para explicar a efetividade dos compostos fenólicos como agentes antimicrobianos. Apesar de todos os mecanismos não serem constatados na literatura, três mecanismos principais são citados: a) modificação da permeabilidade da membrana celular e ruptura da membrana citoplasmática; b) mudança nas funções intracelulares devido à ligação dos grupos OH dos compostos fenólicos nas enzimas e c) modificação da morfologia dos fungos, como rigidez celular e perda de integridade, a partir das interações realizadas nas membranas celulares. Por fim, há outros fatores como a mudança intracelular do pH e o bloqueio de produção de energia (interferência no sistema de ATP).

De entre os compostos mais conhecidos pela capacidade antioxidante e antimicrobiana do alecrim, manjeriço e da sálvia, destacam-se o ácido carnósico, carnosol, metil-carnosato, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, rosmadial, rosmariquinona, e o ácido rosmarínico (Berdahl & McKeague, 2015). A estrutura química

do ácido carnósico (a) e rosmarínico (b) estão representados na Figura 7. Quanto a atividade biológica do ácido rosmarínico, cita-se: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, antibactericida e antiviral, além de que os compostos fenólicos podem promover uma proteção contra o câncer (Petersen & Simmonds, 2003).

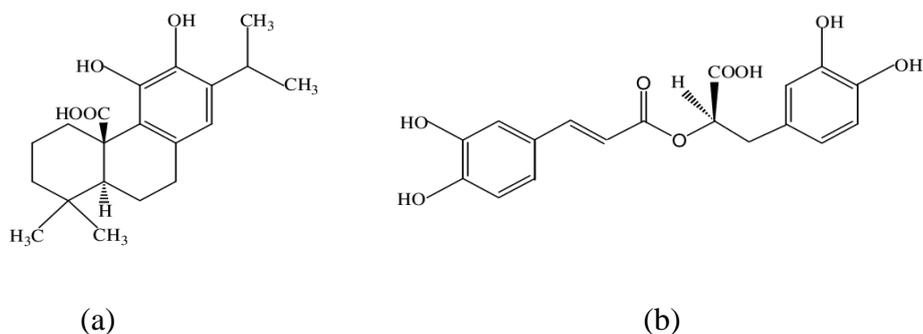


Figura 7. Estrutura química do ácido carnósico (a) e rosmarínico (b)

De acordo com o Regulamento (UE) n.º 231/2012, o carnosol e o ácido carnósico são os compostos responsáveis pela atividade antioxidante, visto que representam não menos que 90% dos diterpenos fenólicos totais presentes no extrato de alecrim. Além disso, os extratos de alecrim também contêm flavonoides com estruturas de luteína e apigenina (Raadt *et al.*, 2015). Jordán *et al.* (2017) descreveram a importância do carnosol nos extratos de alecrim, visto que esse composto aumenta a estabilidade à oxidação do ácido carnósico no processamento de carne de cordeiro, demonstrando o efeito sinérgico da combinação dos compostos fenólicos presentes no extrato com estrutura química similar.

Porém, Raadt *et al.* (2015) verificaram que não é tão fácil obter um padrão de composição dos compostos bioativos presentes no alecrim, visto que podem variar de acordo com o método de extração utilizado, parte da planta utilizada, se as partes da planta foram utilizadas frescas ou secas e época de colheita.

Apesar do alecrim e da sálvia produzirem basicamente os mesmos diterpenos fenólicos e outras substâncias fenólicas, o alecrim apresenta concentrações mais altas,

tornando-se economicamente mais atrativo. Além disso, quando desidratada, a sálvia possui densidade aparente menor que o alecrim (Berdahl & McKeague, 2015).

Ribeiro *et al.* (2016b) caracterizaram quimicamente os extratos de alecrim preparados a partir de uma mistura etanol/água, tendo detectado 18 compostos fenólicos de entre os quais se destacam os ácidos cafeico, rosmarínico, quínico, yunnaneico D e F e alguns flavonoides.

Carocho *et al.* (2016b) por sua vez, obteve os ácidos fenólicos e flavonoides a partir das folhas de manjeriço, conseguindo caracterizar, detetar e quantificar os ácidos rosmarínico, caftárico, cafeico, chicórico, yunnaneico E, e diversos outros compostos em menor quantidade. Stojkovic *et al.* (2013) verificaram que concentrações de ácido cafeico acima de 0,1 g/L inibiram completamente o crescimento de *S. aureus* em sopa de frango.

Martins *et al.* (2015) quantificou os compostos fenólicos de sálvia, a partir de diferentes métodos de extração (infusão, decocção e metanol/água). A luteolina-7-*O*-glucuronido, ácido rosmarínico, luteolina-7-*O*-glucósido e luteolina-*O*-acetilglucósido foram os compostos presentes em maior concentração.

Os compostos fenólicos presentes nessas três plantas podem ser utilizados em diversas aplicações devido às suas polaridades e solubilidades. O ácido carnósico possui carácter lipofílico, enquanto o ácido rosmarínico possui carácter hidrofílico, por exemplo. Quanto à solubilidade, outros compostos fenólicos como diterpenóides, flavonoides e até alguns constituintes dos óleos essenciais, distribuem-se num largo espectro de solubilidades, tornando versátil a sua aplicação (Berdahl & McKeague, 2015).

Contrariamente a outros antioxidantes artificiais, o ácido carnósico é caracterizado como um forte antioxidante devido à sua capacidade de atuar repetidamente como um agente redutor doando sequencialmente átomos de hidrogénio a partir de uma série de compostos fenólicos (Berdahl & McKeague, 2015). De acordo com Birtic *et al.* (2015), o ácido carnósico é afetado negativamente quando submetido a certas condições como luz intensa, calor, água e salinidade, por exemplo. O ácido carnósico vem sendo estudado pelas suas propriedades anticarcinogénicas e antitumorais, extraído a partir de plantas, como a sálvia e o alecrim (Barni *et al.*, 2012; Bauer *et al.*, 2012; Sharabani *et al.*, 2006).

Quanto a biodisponibilidade, Vaquero *et al.* (2013) verificou que o ácido carnósico é consumido e mantido no sistema circulatório durante diversas horas.

Os diterpenos fenólicos com estrutura similar ao ácido carnósico, como o carnosol, rosmanol e epirosmanol, por exemplo, são produtos da degradação do ácido carnósico, também apresentando atividade antioxidante. Outro composto que apresenta atividade antioxidante é o ácido rosmarínico, presente no alecrim (Birtic *et al.*, 2015).

Carocho *et al.* (2016b) quantificaram os compostos fenólicos presentes em manjeriço extraídos por decocção, encontrando 26 mg/g de ácido rosmarínico. Ribeiro *et al.* (2016) identificaram ácido rosmarínico em extratos aquosos de alecrim, em uma quantia de 68,5 mg/g. Por fim, Farhat *et al.* (2013) encontraram 18 mg/g de ácido rosmarínico em extratos metanólicos de sálvia.

### 1.3.1. Métodos de extração

Um extrato é definido como a fração solúvel, e essa fração pode ser removida de acordo com a solubilidade do composto desejado, seja em fase aquosa, alcoólica, lipídica ou outra. Para plantas, os extratos são obtidos a partir das folhas, caule, flores, frutas e até raízes, e as substâncias químicas obtidas nesse extrato são denominados de fitoquímicos (Gokoglu, 2018). O método de extração utilizado é fundamental para a obtenção de um extrato rico em compostos bioativos, sendo a primeira etapa no estudo de qualquer planta pelas suas capacidades medicinais. Os parâmetros que mais afetam a extração desses compostos são a planta ou parte da planta, solvente, temperatura, pressão e tempo (Azmir *et al.*, 2013).

Caleja *et al.* (2019) verificaram que na obtenção de um extrato otimizado de flores de castanheiro, o solvente utilizado era o maior responsável pela obtenção de um extrato com altos compostos bioativos, seguido pela temperatura, e por fim, o tempo de extração.

Existem diversos métodos de extração, podendo ser convencionais ou não, bem vistos do ponto ambiental, melhores na qualidade final do extrato e menor tempo de extração (Azmir *et al.*, 2013). Quanto aos métodos convencionais, citam-se: extração por Soxhlet, maceração, infusão, decocção, hidrodestilação e entre outros. Referentes aos

métodos modernos (ou não convencionais), são descritos a microdestilação, extração por membrana, micro-extração em fase sólida (SPME), ultrassom, fluido supercrítico e outros (Gupta, Naraniwal & Kothari, 2012). De acordo com Gokoglu (2018), os métodos convencionais que necessitam de tratamento químico ou calor, podem mudar o conteúdo, a bioatividade e as características dos compostos ativos na planta.

A extração assistida por ultrassons (EAU) é um método na qual utiliza-se de ondas sonoras, atravessando as moléculas e criando compressão e expansão. Esse processo cria bolhas e gera o crescimento até o colapso da mesma, sendo o fenômeno denominado de cavitação (Figura 8). Apesar desse método funcionar apenas em meio líquido (totalmente líquido ou líquido contendo materiais sólidos), é um método de alta eficiência, sendo capaz de extrair compostos orgânicos e inorgânicos presentes na planta com certa rapidez e sem a necessidade de solventes (Azmir *et al.*, 2013).

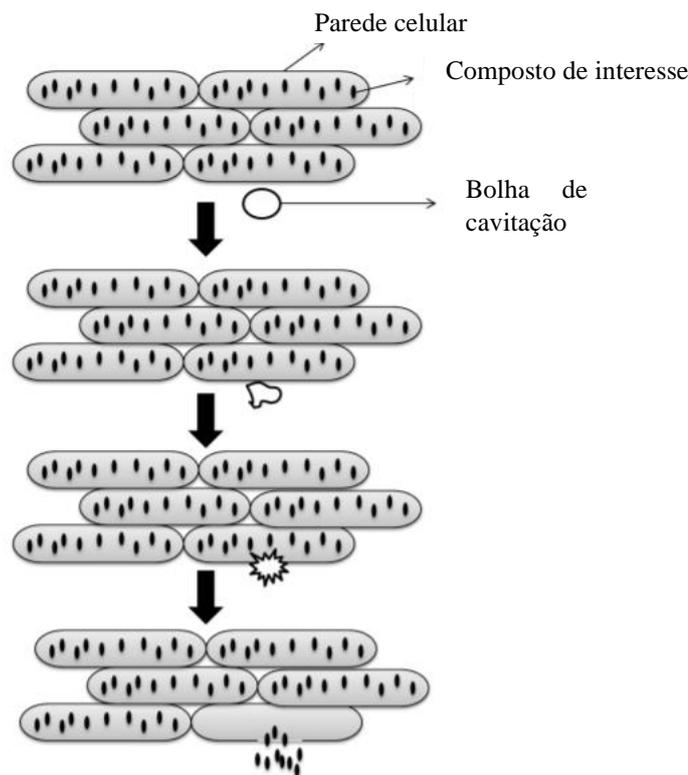


Figura 8. Processo de cavitação e liberação dos compostos bioativos

Fonte: Verruck & Prudencio (2018)

O processo de pré-extração, como trituração das amostras e armazenamento, também é uma etapa importante para o processo, visto que o preparo das amostras afeta na preservação dos fitoquímicos. Um exemplo é a utilização de amostras secas/liofilizadas comparada com amostras frescas, sendo as amostras secas mais vantajosas dado o longo tempo dos experimentos e conseqüentemente deterioração das amostras (Azwanida, 2015).

O tamanho da partícula também é relevante, visto que é responsável pelo aumento ou diminuição da superfície de contato. Amostras em pó constituem-se de pequenas partículas, que são homogêneas mais facilmente e possuem maior superfície de contato entre a amostra e o solvente utilizado para a extração (Azwanida, 2015).

#### 1.4. Aplicação de conservantes naturais nas indústrias de laticínios

O iogurte é um dos produtos lácteos fermentados mais conhecidos em todo mundo, existindo duas possíveis origens: pelo povo Turco que vivia na Ásia ou pelos nativos dos Países Bálticos. A Danone, fundada em Barcelona, Espanha, foi a primeira empresa a produzir iogurtes em larga escala, partindo do mesmo princípio de produção artesanal, porém de uma forma industrial (Pophaly *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos e na União Europeia o alimento só pode ser chamado de “iogurte” caso haja presença de bactérias lácticas no produto final. Se estas não existirem, a nomenclatura correta é “produto lácteo fermentado” (Yildiz, 2010).

Em relação à sua classificação, o iogurte pode ser natural, líquido, grego, com adição de frutas ou aromatizante, entre outros tipos (Yildiz, 2010). De entre as variáveis que influenciam a qualidade final do produto, a qualidade inicial do leite é a de maior importância, pois impacta diretamente a qualidade microbiológica, nutricional e o valor de mercado. Além disso, são também importantes a pureza da cultura do iogurte e sua respectiva atividade (Pophaly *et al.*, 2016).

Quanto à interação entre os microrganismos, o *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus bulgaricus* possuem uma relação simbiótica entre eles e entre os nutrientes existentes no leite. Essa relação é positiva devido ao rápido crescimento e

consequentemente rápida acidificação do leite, a qual seria muito mais lenta caso trabalhasse com as duas culturas separadamente. Além disso, o efeito sinérgico entre esses microrganismos produz certos compostos que colaboram no *flavor* do produto final e aumento da produção de polissacarídeos (Pophaly *et al.*, 2016).

No que se refere aos ingredientes, o principal e mais importante é o leite, podendo ser de vaca, cabra, entre outros. O leite utilizado pode ser integral, parcialmente desnatado, desnatado ou até a própria nata. Para ser utilizado na produção do iogurte, o leite deve seguir 3 critérios: 1) livre de antibióticos, sanitizantes, rancificado ou com origem de mastite; 2) baixa contagem de bactérias e 3) sem contaminação por bacteriófagos (Yildiz, 2010). Quanto às características desejáveis destacam-se a baixa acidez, limpo, bom sabor e odor e uma composição química padrão (Ozer, 2010).

De entre os outros componentes que podem estar presentes no iogurte, consideram-se os produtos derivados do leite (lactose, leite desnatado concentrado e leite desnatado em pó) para o aumento de sólidos não gordurosos; adoçantes (glicose ou sacarose e adoçantes de alta intensidade como o aspartame); estabilizantes (gelatina, carboximetil celulose, gomas, alginatos, carrageninas e proteína de leite) e aromatizantes (preparados de frutas, naturais ou artificiais) (Yildiz, 2010). Os macronutrientes de diversos iogurtes estão presentes na Tabela 3 (Chryssanthopoulos & Maridaki, 2010).

Tabela 3. Macronutrientes de diversos tipos de iogurtes (por 100 g)

Tipo de alimento	Energia (kcal)	Água (g)	Carboidratos (g)	Gorduras totais (g)	Proteína (g)
Iogurte integral	79	8,9	7,8	3,0	5,7
Iogurte semi-desnatado	56-63	87,2	7,0-7,4	1,0-1,6	3,0-4,8
Iogurte desnatado	54	86,9	8,2	0,2	5,4
Iogurte líquido	62	84,4	13,1	Traços	3,1
Lassi (com adoçante)	62	83,3	11,6	0,9	2,6
Kefir	65	87,5	4,0	3,5	3,3

Fonte: Chryssanthopoulos & Maridaki (2010).

O iogurte, como o leite, é uma matriz complexa quanto aos seus nutrientes. Em relação aos hidratos de carbono, a lactose é um dissacarídeo formado a partir de galactose e glicose, e representa aproximadamente 54% de todo o conteúdo de sólidos não gordurosos (Chryssanthopoulos & Maridaki, 2010).

A percentagem de proteína também não difere muito entre o iogurte e o leite, porém, a indústria adiciona uma quantidade de leite desnatado em pó durante a produção, aumentando conseqüentemente o conteúdo de proteína no produto final. A composição baseia-se em duas fontes de proteínas: a caseína representa 80% de toda a fonte de proteína bovina, enquanto o soro do leite constitui os outros 20%. Tanto o iogurte como o leite são indicados como uma ótima fonte proteica devido a produção de valores significativos de aminoácidos essenciais (Chryssanthopoulos & Maridaki, 2010).

Os lípidos presentes no leite constituem características físicas, químicas e biológicas únicas, com um papel fundamental na textura, sabor, aparência e estabilidade do iogurte. A composição única baseia-se em ácidos gordos essenciais, vitaminas lipossolúveis e diversos outros compostos com potencial benéfico à saúde, em que os triglicerídeos compõem de 97 a 98% do conteúdo total de lípidos, enquanto a minoria é representada por fosfolípidos, esteróis livres como colesterol e traços de ácidos gordos livres. Quanto ao seu potencial benéfico, os CLA (do inglês *Conjugated Linoleic Acid*) são relacionados com efeitos anticarcinogénicos, redução de inflamações, diabetes, perda de densidade óssea, disfunção imunológica e diversas outras patologias (Chryssanthopoulos & Maridaki, 2010).

O leite e o iogurte também representam a quantidade maioritária de vitaminas e minerais necessários para o funcionamento do organismo. De entre as vitaminas presentes, destacam-se as hidrossolúveis (vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> e vitamina C) e lipossolúveis (A, D, E e K). Quanto aos minerais, o cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco, iodo, cobre, manganês, selênio, potássio e sódio são encontrados em leite em diferentes quantidades, sendo o cálcio o mais abundante (Chryssanthopoulos & Maridaki, 2010). A Tabela 4 abaixo representa a percentagem de cada nutriente de produtos lácteos

para o suprimento diário de pessoas americanas e canadenses entre 1994 e 1996 (Yildiz, 2010).

Tabela 4. Suprimento diário de nutrientes provindo de produtos lácteos

---

72% do cálcio
60% da vitamina D (caso seja fortificado)
29% de fósforo
30% da riboflavina
23% da vitamina A
31% da vitamina B12
20% da proteína
17% do potássio
18% do zinco
15% do magnésio
18% da gordura
13% das calorias

---

Fonte: Yildiz (2010).

A contaminação em iogurtes, principalmente por bolores e leveduras, reduz significativamente o tempo de prateleira do produto. De entre as metodologias aplicadas para controlar esse problema, incluem-se: tratamento por calor (pasteurização); restrição de oxigênio; armazenamento em baixas temperaturas e utilização de agentes conservantes como sorbato e natamicina (Sahan & Golge, 2005). Os sorbatos são considerados ótimos conservantes por serem compostos inertes (não reagem com o alimento) e são eficazes mesmo em baixos níveis de pH, além de não afetarem drasticamente as características sensoriais do alimento (Saidi, Faid & Warthesen, 2003). Para que não haja efeitos adversos na qualidade do produto final, a concentração de sorbato de potássio deve ser limitada, variando entre 0,05% e 0,2% (Al-Ashmawy & Ibrahim, 2009).

A contaminação de iogurtes por leveduras é relativamente frequente, visto que o baixo pH do produto se torna um ambiente favorável para o crescimento destes microrganismos. Além disso, a adição de frutas e açúcar contribuem ainda mais para a contaminação, visto que ambos são fontes de substrato. De entre as possíveis formas de reconhecer a contaminação por leveduras, podem mencionar-se a geração de *off-flavors*; diferença na textura pela produção de gases e inchaço ou rompimento da embalagem. Sobre condições corretas de refrigeração (5°C), o iogurte pode durar de 3 a 4 semanas se seguidas as boas práticas de fabrico (Suriyarachchi & Fleet, 1981).

Sahan & Golge (2005) avaliaram os efeitos do conservante sorbato de potássio em relação à qualidade microbiológica de iogurte. Foram aplicadas diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 ppm) do antimicrobiano com duas metodologias: na primeira o conservante foi incorporado na produção do iogurte, enquanto na segunda foi aplicado um *spray* na superfície do alimento. A partir da análise estatística avaliando 1, 7, 15 e 30 dias de armazenamento, verificou-se que as diferentes metodologias de aplicação do conservante não obtiveram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

Porém, a aplicação de diferentes concentrações gerou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), influenciando o crescimento de bactérias mesófilas, esporuladas aeróbicas, psicrófilas e bolores e leveduras. Além disso, um outro ponto positivo foi a não alteração na quantidade de bactérias lácticas, preservando as culturas iniciais (Sahan & Golge, 2005).

Said, Faid & Warthesen (2003) por outro lado, estudaram o efeito do sorbato aplicados em iogurtes caseiros e industriais e verificaram que no geral as amostras tratadas com sorbato apresentaram menor crescimento das bactérias lácticas e conseqüentemente produção de acidez retardada, aplicando 0,1% do agente conservante.

Martins *et al.* (2014) investigaram a propriedades nutraceuticas de flores de amora (*Rubus ulmifolius* Schott), quando aplicados em iogurtes, sendo as flores de amora ricas em compostos fenólicos e apresentando alta atividade antioxidante. Além disso, também foram testados dois métodos de extração (decocção e hidroetanólica), sendo a extração hidroetanólica mais eficiente na obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos.

Caleja *et al.* (2016) compararam o uso de aditivos naturais (provindos de plantas) com o uso do sorbato de potássio em iogurte, verificando que não houve mudanças significativas no pH e valor nutricional, quando comparado à amostra preparada com o conservante artificial. Além disso, os iogurtes produzidos com conservantes naturais apresentaram maior atividade antioxidante, indicando a possível utilização de conservantes naturais como uma alternativa aos artificiais.

Helena *et al.* (2017) adicionaram bio-resíduos do cogumelo *A. bisporus* em iogurtes, sendo capazes de manter as proteínas e a fração lipídica, atribuindo essa preservação devido a capacidade antioxidante do extrato de cogumelo. Corrêa *et al.* (2018) também verificaram as propriedades bioativas de cogumelo (*A. blazei*), verificando notáveis propriedades antioxidantes e antimicrobianas, além de não apresentar hepatotoxicidade.

Pelo exposto, verifica-se a complexidade de requisitos que um conservante deve ter para conseguir exercer a sua função, sem causar qualquer tipo de alteração no iogurte final.

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos do presente trabalho englobam a otimização da extração de compostos conservantes a partir de alecrim, manjeriço e sálvia, de forma a utilizar estes extratos como agentes conservantes na indústria alimentar.

Objetivos específicos deste trabalho, citam-se:

1. Análise de triagem da extração de compostos conservantes utilizando: extratos aquosos (infusão e decocção) e extratos hidroetanólicos, pela técnica de extração assistida por ultrassons (EAU) e determinação dos intervalos de extração pela metodologia de superfície de resposta (RSM) por análise de triagem;
2. Caracterização química dos extratos obtidos por HPLC-DAD-MS;
3. Caracterização bioativa dos extratos através da sua atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica;
4. Incorporação dos melhores extratos em iogurtes;
5. Avaliação dos parâmetros físicos dos alimentos ao longo do tempo de prateleira: textura, cor e pH;
6. Análise microbiológica dos produtos alimentares ao longo do tempo de prateleira;
7. Avaliação do perfil nutricional e monitorização das moléculas conservantes ao longo do tempo de prateleira.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Plantas utilizadas

Foram utilizadas três plantas: alecrim, manjerição e sálvia. Estas plantas foram fornecidas a granel pela empresa Cantinho das Aromáticas, situada em Vila Nova de Gaia, região norte de Portugal. Em seguida, foram trituradas e armazenadas para posterior análise (Figura 9).

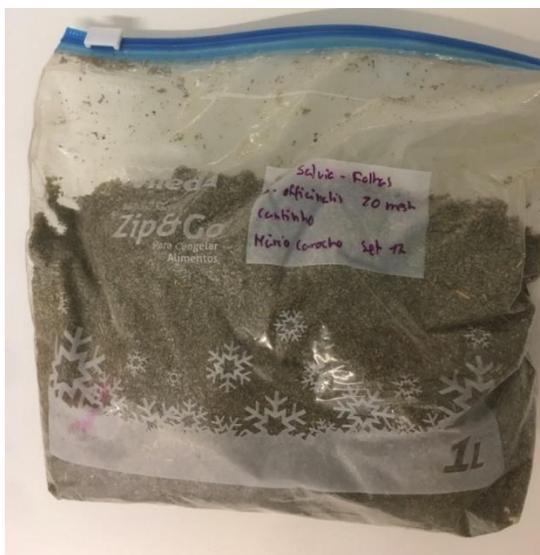


Figura 9. Sálvia triturada

#### 3.2. Preparação dos extratos

Os extratos foram obtidos recorrendo à tecnologia de extração assistida por ultrassons (EAU) (sonicador QSonica, modelo CL-33, Newton, Connecticut, EE. UU) (Figura 10). Uma quantidade conhecida de amostra foi pesada e colocada em contacto com o solvente (EtOH/H<sub>2</sub>O), variando a sua proporção. Após este passo, foi colocada no EAU para otimização das condições ideais de extração variando os parâmetros do equipamento. As amostras foram de seguida centrifugadas (5000 rpm, durante 20 min a 10 °C), filtradas através de um filtro de papel (Whatman nº 4), e o etanol foi evaporado a 40 °C utilizando um evaporador rotativo a vácuo (Büchi, R-210, Flawil, Switzerland)

(Figura 11). Por fim, a fração aquosa foi liofilizada (47 °C, 0,045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA) para a obtenção do extrato em pó. Os extratos foram armazenados ao abrigo da humidade e da luz para posterior análise.



Figura 10. Equipamento de extração assistida por ultrassons

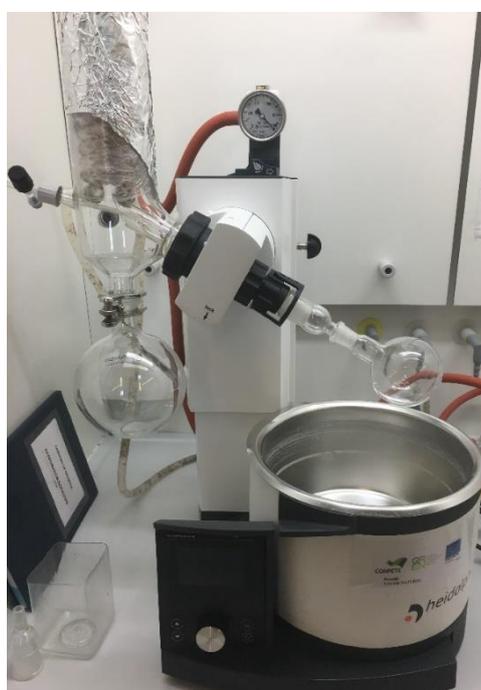


Figura 11. Evaporador rotativo

### 3.3. Análise de triagem da extração por UAE

#### 3.3.1. Delineamento fatorial fracionado

Numa primeira etapa, e, de forma a realizar uma prospecção sobre as condições mais favoráveis para a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos, foi avaliada a planta *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Este estudo baseou-se em um delineamento fatorial de dois níveis, com resolução IV ( $2^{3-1}$ ), também conhecido como delineamento fatorial fracionado, um método ideal para um processo de prospecção. O delineamento foi construído e aleatorizado utilizando o software Design expert 12.0.1. (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN, USA), consistindo em 4 processos de extração (2 repetições por condição), sendo as variáveis fixas nessa experiência definidas como  $X_1$ : tempo (7,5 e 12,5 min),  $X_2$ : solvente (0 e 80% EtOH), e  $X_3$ : potência do ultrassom (275 e 450 W).

As variáveis dependentes foram expressas de acordo com a concentração de ácido rosmarínico (Y1), em mg/g de extrato, por HPLC. No delineamento fatorial fracionado, os fatores foram denominados como Intercept = Intercept + ABC; A = A + BC; B = B + AC; e C = C + AB em ordem para determinar os fatores pertinentes e os limites da experiência para serem utilizados em futuros delineamentos otimizados.

#### 3.3.2. Delineamento multinível unifatorial

A seleção secundária e a avaliação dos fatores e níveis foram realizadas para determinar os limites apropriados da experiência seguindo as instruções do primeiro ensaio. As variáveis independentes foram  $X_1$ : tempo (10-300 s) e  $X_4$ : temperatura (20-75 °C) em 6 e 4 níveis diferentes, respectivamente. Para cada um dos 2 fatores, um multinível unifatorial ou delineamento fatorial geral foi realizado e analisado.

### 3.3.3. Perfil e quantificação dos compostos fenólicos

Os extratos de alecrim, manjerição e sálvia foram dissolvidos em EtOH (80:20 v/v) de forma a obter uma concentração de 10 mg/mL. De seguida foram filtrados usando filtros descartáveis de 0,22 µm, e, injetados.

Os dados cromatográficos relativos à identificação e quantificação de compostos fenólicos para a otimização da extração foram adquiridos utilizando um Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), acoplado com um detetor de diodos (280, 330 e 370 nm) e um detetor de massas com ionização por *electrospray* (Linear Ion Trap LTQ XL, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), utilizado em modo negativo. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4,6 mm x 150 mm, Waters, Milford, MA, USA) a 35 °C.

Os compostos fenólicos foram identificados considerando o tempo de retenção, UV-Vis e espectro de massas, em comparação com os padrões comerciais e os dados disponíveis na literatura. As curvas de calibração dos padrões fenólicos foram construídas através do sinal UV-Vis para a obtenção da análise quantitativa. No caso de padrões comerciais não disponíveis, os compostos foram quantificados por uma curva de calibração dos compostos mais similares disponíveis. Os resultados foram expressos em mg/g de extrato utilizando ácido cinâmico para os ácidos fenólicos, ácido rosmarínico como o composto principal na família Lamiaceae e quercetina para os flavonoides.

## 3.4. Propriedades bioativas dos extratos obtidos e toxicidade

### 3.4.1. Atividade antioxidante

Quatro soluções de eritrócitos (2,8%, v/v; 200 µL), preparadas numa solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), foram misturadas com 400 µL das seguintes soluções: 1) extrato (6-500 µL/mL em PBS); 2) PBS (controlo); 3) água (até hemólise total) e 4) controlo positivo Trolox (7,81-250 µg/mL)

Após a pré-incubação em agitação a 37 °C durante 10 min, adicionou-se 200 µL de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorido (AAPH, 160 mM em PBS, Sigma-

Aldrich) e a densidade óptica foi medida em 690 nm a cada 10 min num leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, ELX800) até a completa hemólise (Lockowandt *et al.*, 2019).

Os valores de  $\Delta t$  (min) relativos à metade do tempo de hemólise (valores  $H_{t50}$ ), obtidos a partir das curvas hemolíticas de cada amostra de extrato (subtraindo os valores de  $H_{t50}$  do controlo PBS), foram correlacionados com a concentração de cada extrato, para a obtenção dos valores  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), calculados nos intervalos de tempo de 120 e 180 min, *i.e.*, a concentração de extrato necessária para proteger 50% da população de eritrócitos da ação hemolítica do AAPH para 120 e 180 min.

### 3.4.2. Atividade antimicrobiana

Para a atividade antibacteriana foram utilizadas as seguintes bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (isolado clinicamente) e *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973). De entre as bactérias Gram-negativas, citam-se: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) e *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030).

Quanto a atividade antifúngica, foram utilizados seis micromicetes, sendo eles: *Aspergillus fumigatus* (isolado a partir de humanos), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Trichoderma viride* (IAM 5061) e *Penicillium verrucosum var. cyclopium* (isolado a partir de um alimento).

Com o intuito de avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos hidroetanólicos de alecrim, sálvia e manjerição, o método da microdiluição foi utilizado (Sokovic *et al.*, 2010). Os resultados foram apresentados através da inibição completa do crescimento microbiano (CMI, concentração mínima inibitória), através do ensaio colorimétrico de viabilidade microbiana, tal como a concentração mínima bactericida/fungicida (CMB e CMF, respetivamente). Os controlos positivos utilizados foram os conservantes artificiais E211 e E224 (benzoato de sódio e metabissulfito de potássio, respetivamente) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### 3.4.3. Citotoxicidade

A fim de avaliar a toxicidade dos extratos obtidos em células normais, de forma a garantir a segurança das concentrações activas, os extratos foram testados numa linha celular obtida a partir de células normais de porco (designada como PLP2), sendo o tecido de fígado lavado com uma solução salina equilibrada de Hank (HBSS), contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, obtendo explantes de 1x1 mm<sup>3</sup>.

Os explantes então foram transferidos para frascos de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB, 10%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) e incubados a 37 °C numa incubadora com atmosfera modificada contendo 5% CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura foi renovado a cada dois dias para assegurar o crescimento celular e observado em um microscópio com contraste de fase. As células foram subcultivadas e plaqueadas numa microplaca de 96 poços, obtendo uma densidade de 1,0 x 10<sup>4</sup> células/poço e a avaliação foi feita utilizando o método da Sulforodamina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Abreu *et al.*, 2011).

Assim, uma cultura de células (PLP2) foi obtida a partir de fígado de porco e testada com diferentes extratos hidroetanólicos e diferentes concentrações (alecrim, manjeriço e sálvia). A leitura da absorbância foi realizada utilizando um leitor de microplacas a 540 nm e o controlo positivo utilizado foi a elipticina. Os resultados foram expressos em valores GI<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% do crescimento celular).

### 3.5. Incorporação dos extratos em iogurtes

Para a preparação dos iogurtes, utilizou-se um iogurte natural de 125 g, (Pingo Doce) para 1 L de leite meio gordo UHT (Pingo Doce), à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), e incorporaram-se os extratos vegetais liofilizados (cerca de 30 mg/kg). As amostras foram colocadas numa iogurteira durante 8 horas. Após a preparação, adicionou-se a um copo uma porção de polpa de fruta de morango (aproximadamente 20 g, GoGo Squeez Fruit Snack), preenchendo o fundo do copo, sendo

o iogurte adicionado por cima com os extratos previamente incorporados (Figuras 12 e 13).



Figura 12. Incorporação dos extratos e polpa de frutas no iogurte



Figura 13. Diferença entre o iogurte *in natura* e o incorporado com a polpa

Foram feitos iogurtes com polpa de fruta natural, uma vez que os iogurtes naturais sem adição de frutas não necessitam da adição de conservantes. Assim, os extratos foram adicionados na mesma quantidade que o aditivo artificial sorbato de potássio, quantidade que está regulamentada pela legislação em vigor (Council Regulation, 2008), visto que é o aditivo mais utilizado para esta matriz alimentar. Os ingredientes e a tabela nutricional dos ingredientes utilizados estão descritos nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5. Tabela nutricional e lista de ingredientes do leite meio gordo

Tabela nutricional	
	Por 100 mL
Energia	270 kJ / 64 kcal
Lípidos	3,6 g
Dos quais saturados	2,5 g
Hidratos de carbono	4,9 g
Dos quais açúcares	4,9 g
Fibras	0 g
Proteínas	3,2 g
Sal	0,1 g
Ingredientes: Leite UHT meio gordo homogeneizado	

Tabela 6. Tabela nutricional e lista de ingredientes do iogurte natural

Tabela nutricional	
	Por 100 mL
Energia	206 kJ / 49 kcal
Lípidos	1,5 g
Dos quais saturados	1 g
Hidratos de carbono	5 g
Dos quais açúcares	4,3 g
Fibras	0 g
Proteínas	3,9 g
Sal	0,1 g
Ingredientes: leite pasteurizado desnatado, leite pasteurizado, leite em pó magro, proteínas do leite, fermentos lácticos	

Tabela 7. Tabela nutricional e lista de ingredientes da polpa de frutas

Tabela nutricional	
	Por 100 mL
Energia	286 kJ / 68 cal
Lípidos	0,5 g
Dos quais saturados	0,2 g
Hidratos de carbono	14 g
Dos quais açúcares	13 g
Proteínas	< 0,5 g

Sal	< 0,01 g
<b>Ingredientes:</b>	
Polpa de maçã	66,4%
Polpa de morango	21,6%
Sumo de maçã concentrado	
Polpa de banana	4,0%
Polpa de groselha-negra	

Todas as etapas de incorporação foram feitas em condições de assepsia para evitar quaisquer contaminações utilizando um bico de Bunsen, e, utensílios e bancadas previamente esterilizados. Após esse processo, os iogurtes foram homogeneizados com uma espátula e armazenados no frigorífico a uma temperatura de 4-5 °C.

A codificação das amostras está descrita na Tabela 8 abaixo. Todas as amostras foram analisadas em triplicado durante os 14 dias de prateleira, tendo-se analisado no tempo 0 (T0), após 7 dias (T7) e após 14 dias (T14), num total de 45 amostras (Figura 14).

Tabela 8. Amostras de iogurte

<b>Amostra</b>	<b>Contendo</b>	<b>Codificação</b>
	Controlo	IC
	Sorbato de potássio	ISP
	Alecrim	IA
	Manjerição	IM
	Sálvia	IS



Figura 14. Amostras de iogurte

### 3.6. Avaliação dos parâmetros físico-químicos

Quanto à avaliação dos parâmetros físicos e químicos, foram feitas as análises de cor, pH e atividade de água.

Para a análise de cor, utilizou-se um colorímetro Konica Minolta (Chiyoda, Tokyo, Japan) Chroma Meter CR-400 (Figura 15), com um iluminante D65, padrão estabelecido pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE), com 8 mm de abertura e 10° de ângulo de observação. Foram avaliados parâmetros como o grau de luminosidade ( $L^*$ ) e as coordenadas cromáticas ( $a^*$  e  $b^*$ ), na qual  $a^*$  apresenta o tom mais avermelhado (vermelho-verde) e  $b^*$  mais amarelado (amarelo-azul).

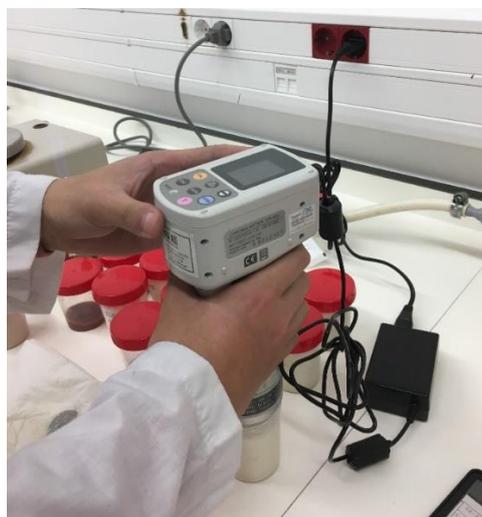


Figura 15. Colorímetro

Para cada amostra (iogurte com polpa), foram feitas medições em três pontos diferentes, obtendo a média entre as 3 medições. Para a calibração do colorímetro, obtiveram-se os valores dispostos na Tabela 9. Além disso, também foram avaliados os parâmetros apenas para a polpa pura.

Tabela 9. Calibração do colorímetro

Calibração	
Y	86,3
x	0,3208
y	0,3365

Relativamente ao pH, utilizou-se um titulador com potenciômetro Hanna Instruments HI 902; foram também feitas três medições para cada amostra (Figura 16).



Figura 16. Titulador e potenciômetro

Por fim, a atividade de água foi medida a partir de um Dew Point Water Activity Meter 4TE (Aqua Lab) (Figura 17).



Figura 17. Medidor de atividade de água

### 3.7. Avaliação da textura

De forma a conseguir entender os efeitos que os diferentes extratos podem ter no perfil de textura dos iogurtes, estes foram sujeitos a uma análise num texturómetro *TA.XT plus* da Stable Micro Systems (Vienna Court, Godalming, Reino Unido) (Figura 18). Visto que os iogurtes são alimentos semissólidos, optou-se por uma análise de extrusão invertida, permitindo verificar a firmeza, consistência, coesividade e trabalho da coesividade dos iogurtes, utilizando a plataforma de extrusão invertida com o disco de perspex de 45 mm de diâmetro e o copo com 45 mm de altura. O gatilho de análise foi definido como força, sendo o limiar de 5 g, e o modo de análise definido como a distância de 10 mm. O tipo de teste foi de compressão com uma velocidade inicial de 5 mm/s, velocidade de teste 3 mm/s e velocidade de regresso à origem de 10 mm/s.



Figura 18. Texturómetro

### 3.8. Perfil nutricional

A análise do perfil nutricional ao longo do tempo de prateleira foi feita avaliando a composição centesimal, tal como o teor de açúcares solúveis, ácidos orgânicos e ácidos gordos individuais. Para este efeito, os diferentes iogurtes foram congelados e liofilizados (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA).

#### 3.8.1. Composição centesimal

Referente à composição centesimal, foram determinados o teor de gordura bruta, proteínas, humidade e cinza, de acordo com os Métodos Oficiais de Análise, 17<sup>a</sup> edição (AOAC, 2016).

A gordura bruta foi obtida a partir de um extrator de Soxhlet, como apresentado na Figura 19. Utilizou-se 1 g de amostra e éter de petróleo como solvente para a extração. Após a extração a amostra é colocada na estufa até à evaporação do éter de petróleo, sendo a gordura total obtida pela diferença entre o tubo com o resíduo resultante da extração e o peso do tubo vazio. O teor de gordura foi expresso em g/100 g de peso fresco.



Figura 19. Extrator de Soxhlet

Para a obtenção do teor de proteínas, utilizou-se o método Macro-Kjeldahl, seguindo da metodologia AOAC 920.87, utilizando um fator de conversão de 6,38 (produtos lácteos). Assim, 0,25 g de amostra foi digerida em ácido sulfúrico com catalisador  $K_2SO_4/CuSO_4$  durante 70 min a 400 °C num digestor (Bloc Digest 12, JP Selecta, Barcelona) (Figura 20). Posteriormente, utilizou-se um destilador Kjeldahl com titulador alcalino integrado (modelo Pro-Nitro-A, JP Selecta, Barcelona) (Figura 21). O teor de proteínas foi expresso em g/100 g de peso fresco.



Figura 20. Digestor para proteínas



Figura 21. Destilador Kjeldahl

A humidade foi avaliada a partir de um medidor de humidade (PMB 163 Moisture Analyzer, Adam Equipment, Oxford), como mostrado na Figura 22, seguindo a metodologia AOAC 925.09. O equipamento é capaz de aquecer a amostra utilizando uma lâmpada de halogénio com potência de 400 W, registando a massa inicial e final da amostra após manutenção de um peso constante durante um intervalo de tempo, e, calculando, por fim, o teor de humidade.



Figura 22. Medidor de humidade

As cinzas foram determinadas segundo a metodologia AOAC 923.03. Cerca de 0,25 g de amostra são colocadas em cadinhos e incineradas numa mufla (Lenton ECF 12/22, Hope Valley, UK) a 550 °C (Figura 23). O teor de minerais foi expresso em g/100 g de peso fresco. O teor de cinzas é calculado pela diferença do peso dos cadinhos com a amostra incinerada com o peso dos cadinhos vazios.



Figura 23. Mufla

### 3.8.2. Ácidos gordos individuais

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa acoplada a um detector por ionização de chama (CG-FID) (DANI 1000, Contone, Switzerland) (Figura 24). O procedimento inicia-se com a derivatização da gordura total obtida, pela adição de 5 mL de uma solução metanol/ácido sulfúrico/tolueno 2:1:1 (v/v/v). As amostras são de seguida colocadas num banho a 50 °C com agitação constante durante aproximadamente 12 horas. A etapa posterior é realizada com a adição de 3 mL de água destilada e 3 mL de éter etílico, e, homogeneizados em vortex. Após a separação de fases, retirou-se o líquido sobrenadante para um vial contendo sulfato de sódio anidro. Após este processo, as amostras foram filtradas com filtros descartáveis de nylon 0,22 µm e injetados no CG-FID, utilizando uma coluna Zebron-Kame (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm).

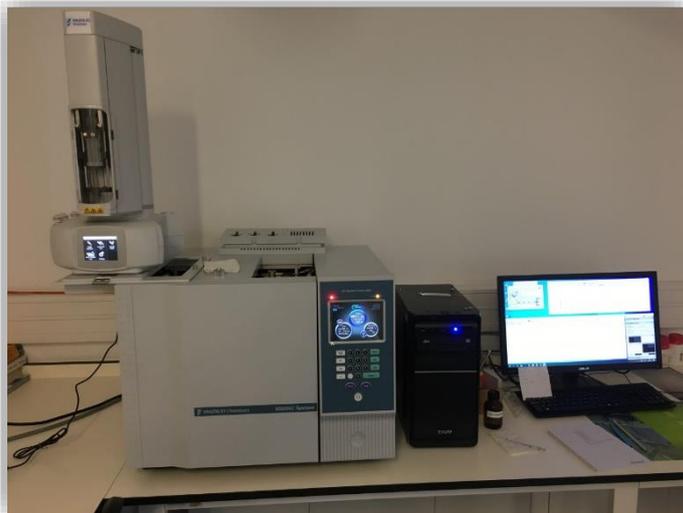


Figura 24. CG-FID

A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: temperatura inicial da coluna a 100 °C, mantida por 2 min, aumento da temperatura de 10 °C/min até 140 °C, seguido por um aumento de 3 °C/min até 190 °C e por fim 30 °C/min até 260 °C, mantido por 2 min. O gás de arraste (hidrogénio) foi mantido a 1,1 mL/min (0,61 bar), medidos a 100 °C. A injeção *split* (1:50) foi realizada a 250 °C e a identificação dos ácidos gordos individuais foi obtida a partir da comparação dos tempos de retenção dos padrões comerciais FAME Mix C4-C24 (padrão 4788-U, Sigma-Aldrich). Os resultados foram apresentados em percentagem relativa de cada ácido gordo quantificado.

### 3.8.3. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram detectados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com um detector de fotodiodos (HPLC-DAD) (Shimadzu 20A series, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) (Figura 25). Inicialmente pesou-se 1 g de amostra, a qual se adicionou 25 mL de ácido metafosfórico (4,5%) num gobelé coberto com alumínio. As amostras foram mantidas sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 20 min. De seguida, as amostras foram filtradas com a ajuda de um papel de filtro (Whatman N°

4) para um tubo de ensaio e por fim para um vial âmbar de 1,5 mL com a ajuda de uma seringa e filtro de nylon 0,22 µm, para a análise no HPLC-DAD.



Figura 25. HPLC-DAD

A separação dos compostos foi realizada através de uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex), termostaticada a 35 °C e a detecção ocorreu nos comprimentos de onda de 215 e 245 nm através de um detetor de diodos (DAD). O solvente de eluição utilizado foi ácido sulfúrico (3,6 mM). Para a identificação e quantificação dos ácidos orgânicos foi comparado os tempos de retenção e dos espectros dos padrões comerciais, tal como suas respectivas retas de calibração. Os resultados foram apresentados em g/100 g de peso fresco (fw).

#### 3.8.4. Açúcares solúveis

Os açúcares solúveis foram determinados por HPLC acoplado com um detector de índice de refração (HPLC-RI) (Knauer, Smartline System 1000, Berlin, Germany), (Figura 26). Pesou-se cerca de 1 g da amostra liofilizada, e adicionou-se 1 mL de uma solução padrão de melezitose (IS, 25 mg/mL) e 40 mL de uma solução aquosa de etanol 80:20 v/v. As amostras foram num banho termostático a 80°C durante 1 h e 30 min, sendo

agitadas a cada 15 min. Após este processo, o etanol foi evaporado no evaporador rotativo e perfeitado o volume com água destilada até 5mL, num balão volumétrico. Por fim, as amostras são filtradas com filtros 0,22 µm e injetadas no HPLC-RI.



Figura 26. HPLC-RI

Para a determinação dos açúcares livres, utilizou-se de uma coluna 100-5 NH<sub>2</sub> Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 µm, Knauer). A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/água desionizada (70:30 v/v) a 35 °C com um caudal de 1 mL/min (forno 7971 R Grace). A identificação e quantificação foi realizada utilizando os tempos de retenção de padrões comerciais. Os dados foram analisados utilizando o software Clarity 2.4 (DataApex, Praga, República Tcheca). Por fim, os resultados foram expressos em g/100 de peso fresco (fw).

### 3.9. Análise microbiológica

#### 3.9.1. Preparação das amostras

A preparação das amostras para análise de carga microbiana seguiu o procedimento descrito na International Organization for Standardization (ISO, 2003).

Todos os iogurtes foram analisados em fresco. Foi avaliado o crescimento microbiológico ao longo do tempo de prateleira (dias 0, 7 e 14). Inicialmente misturou-se 1 g da amostra de iogurte em 9 mL de água peptonada. A partir dessa diluição, foram feitas diluições sucessivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ). Foram analisados diferentes microrganismos, os mais representativos e causadores de degradação neste tipo de alimentos (Tabela 10). Todas as diluições efetuadas foram analisadas em duplicado.

Tabela 10. Análises microbiológicas realizadas

Contagem	Meio de cultura	Modo de incubação	Norma ISO
Mesófilos aeróbios totais	PCA	72h a 30 °C	4833-2:2013
Coliformes	VRBLA	48h a 37 °C	4832:2006
Bolores/leveduras	DRBC	5 dias a 25 °C	21527-1/2:2008
Bactérias lácticas psicrófilas	MRSagar	5 dias a 22 °C	15214:1998

PCA: Plate Count Agar; VRBLA: Violet Red Bile Lactose Agar;

DRBC: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol; MRSagar: De Man, Rogosa e Sharpe.

#### 3.9.2. Contagem de microrganismos

Para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais foi utilizada a técnica da sementeira por incorporação (ISO 4833-2:2013): 1 mL de amostra foi colocada numa placa de Petri, à qual foram adicionados cerca de 15 mL do meio de cultura PCA (Plate Count Agar) líquido (Figura 27), em duplicado (Limite de Quantificação (LOQ) = 1 log (Unidades Formadoras de Colónias) CFU/g). As placas foram então

homogeneizadas e após a solidificação do meio, estas foram incubadas a 30 °C em posição invertida durante 72h. A contagem foi realizada em placas que continham entre 15 e 300 colónias.

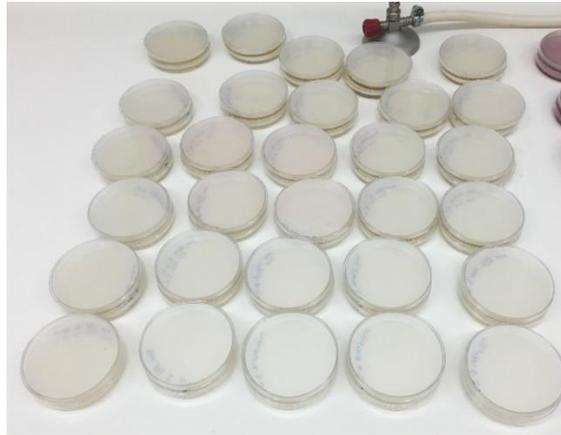


Figura 27. Meio de cultura PCA

Para a contagem de coliformes (ISO 4832:2006) inoculou-se 1 mL da amostra numa placa, à qual se adicionaram 15 mL do meio de cultura VRBLA (Violet Red Bile Lactose Agar) líquido (Figura 28), pela técnica de sementeira por incorporação, em duplicado (Limite de Quantificação (LOQ) = 1 log (Unidades Formadoras de Colónias) CFU/g). As placas foram homogeneizadas e solidificadas, sendo incubadas a 37°C durante 48h em posição invertida. A contagem foi realizada em placas que continham entre 10 e 150 colónias.



Figura 28. Meio de cultura VRBLA

Relativamente aos bolores e leveduras (ISO 21527-1/2:2008), 0,2 mL da amostra foram colocados em placas de Petri contendo 15 mL do meio de cultura DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) já solidificado (Figura 29), em duplicado (LOQ = 1,7 log CFU / g), utilizando a técnica de sementeira por espalhamento (spread plate technique). As placas foram incubadas em posição normal a 25°C durante 5 dias, sendo a contagem realizada em placas que continham menos que 150 colónias. A contagem de leveduras e bolores foram realizadas depois de 2 e 5 dias de incubação, respetivamente.

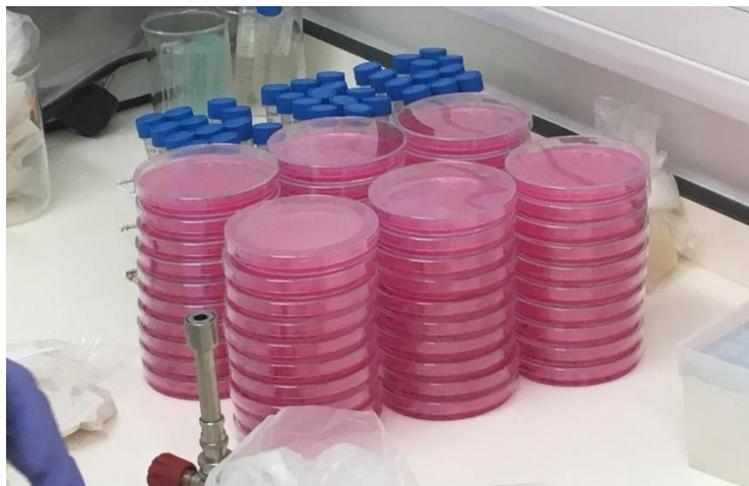


Figura 29. Meio de cultura DRBC

Para a contagem de bactérias lácticas (ISO 15214:1998): 1 mL da amostra foi colocada numa placa de Petri, à qual se adicionaram 15 mL do meio de cultura MRSagar (De Man, Rogosa e Sharpe) (Figura 30), pela técnica de sementeira por incorporação. Após a solidificação do meio, uma camada de meio extra (10 mL) foi adicionada de forma a promover as condições de anaerobiose (LOQ = 1 log UFC / g). As placas foram incubadas ainda na posição invertida a 22 ° C por 5 dias, sendo a contagem feita em placas que continham entre 15 e 300 colónias.

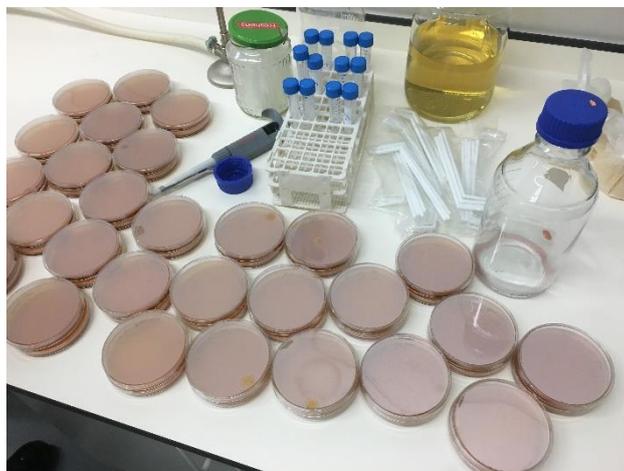


Figura 30. Meio de cultura MRS

### 3.10. Análise estatística

Para o delineamento fatorial fracionado foram utilizados a análise de variância (ANOVA) e Pareto para determinar os efeitos principais e suas magnitudes, enquanto que para o delineamento fatorial completo foi feita uma comparação entre as diferentes amostras através da análise de variância (ANOVA) simples utilizando teste-F com  $p$ -value = 0,05, juntamente com o teste da diferença mínima significativa (LSD) de Fischer. Ambas análises foram realizadas utilizando o software Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA).

Ao longo de todo o trabalho, os valores são apresentados por média±desvio padrão. No que concerne à análise dos parâmetros dos iogurtes, os valores foram

analisados através de uma ANOVA a 2 fatores, com soma de quadrados do tipo III, recorrendo ao software SPSS, versão 25. Este modelo de análise linear multivariado permite tratar os dois fatores TC (tipo de conservante) e TP (tempo de prateleira) de uma forma independente, permitindo entender a contribuição de cada um deles independente do outro, oferecendo uma melhor compreensão do comportamento dos vários parâmetros ao longo do tempo. Ao longo de todo o trabalho, o nível de significância é de 0,05.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Teste de rastreio

#### 4.1.1. Desenho fatorial fracionado aplicado em *Rosmarinus officinalis*

A seleção dos fatores foi feita a partir da otimização de planos anteriores realizado pelo nosso grupo de pesquisa e outros projetos relacionados ao *Rosmarinus officinalis*, de modo a reduzir o tempo e maximizar o rendimento, sendo as variáveis mais relevantes para a EAU o tempo de extração, potência do equipamento e percentagem de etanol em água como solvente de extração (Tabela 11). O fatorial fracionado é um delineamento rápido, porém efetivo para verificar os efeitos principais e suas magnitudes, e tem sido significativo para a tomada de decisões.

Tabela 11. Ordem de ensaio do delineamento fracionado e resultados

Ensaio	Fatores			Concentração de ácido rosmarínico (mg/g extrato)
	Tempo (min)	Potência (W)	Solvente (%)	
1	12,5 (-1)	275 (-1)	80 (1)	31,12
2	7,5 (1)	450 (1)	80 (1)	26,02
3	7,5 (1)	275 (-1)	0 (-1)	2,26
4	12,5 (-1)	450 (1)	0 (-1)	3,33

Como é possível observar numericamente (Tabela 11) e de forma gráfica (Figura 31), o efeito do solvente utilizado teve o maior e melhor impacto dos três fatores testados, sendo eficaz em mais de 2 vezes quando comparado com o segundo efeito (tempo). De acordo com os resultados obtidos e descritos, a decisão tomada para trabalhos futuros será a utilização da menor potência do equipamento de ultrassons devido à economia de recursos, tal como a maior concentração de etanol como solvente de extração. A eficiência na extração com a diminuição de solventes polares no rendimento de compostos fenólicos

de *Rosmarinus officinalis* também já foi descrito por outros autores (Oliveira *et al.*, 2016; Sik *et al.*, 2020), o que reforça a decisão tomada por esse trabalho.

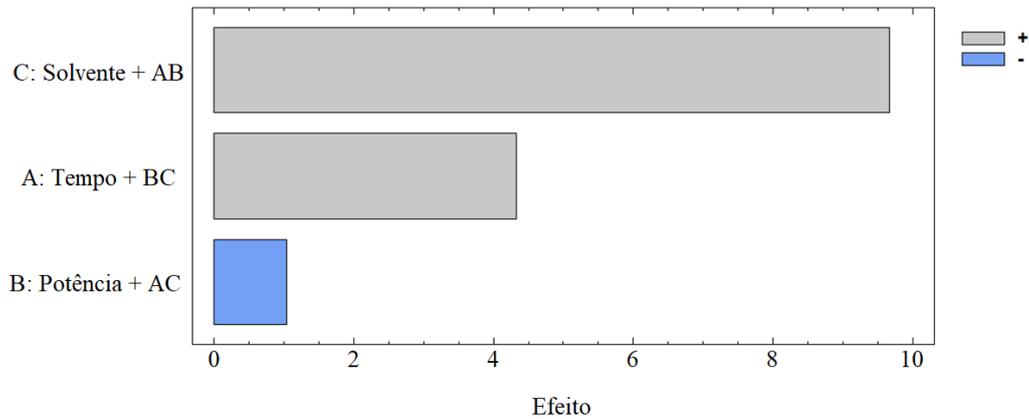


Figura 31. Diagrama de Pareto da magnitude dos efeitos

#### 4.1.2. Delineamento multinível (tempo)

De acordo com os resultados obtidos anteriormente, uma análise mais profunda do rendimento do extrato em diferentes tempos torna-se um fator importante para investigar. A esse ponto é importante lembrar que os valores de tempo utilizados foram de 7,5 e 12,5 minutos, e, ao mesmo tempo, ensaios paralelos no nosso grupo de investigação apontaram a possibilidade de utilizar tempos menores de extração. Assim, realizou-se um novo ensaio variando o tempo entre 10 segundos e 5 minutos em três plantas da mesma família Lamiaceae (alecrim, manjeriço e sálvia), como disposto na Figura 32. A comparação entre as três plantas estudadas está representada na Figura 33.

Figura 32. Concentração dos compostos fenólicos para (a) alecrim; (b) manjeriço e (c) sálvia para diferentes tempos

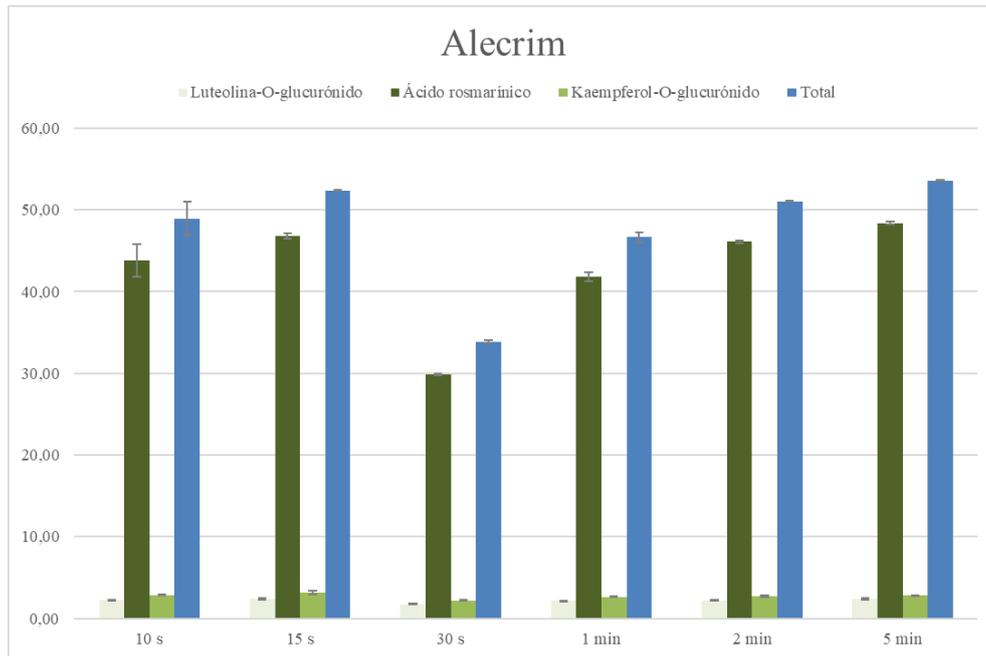


Figura 32 (a). Alecrim

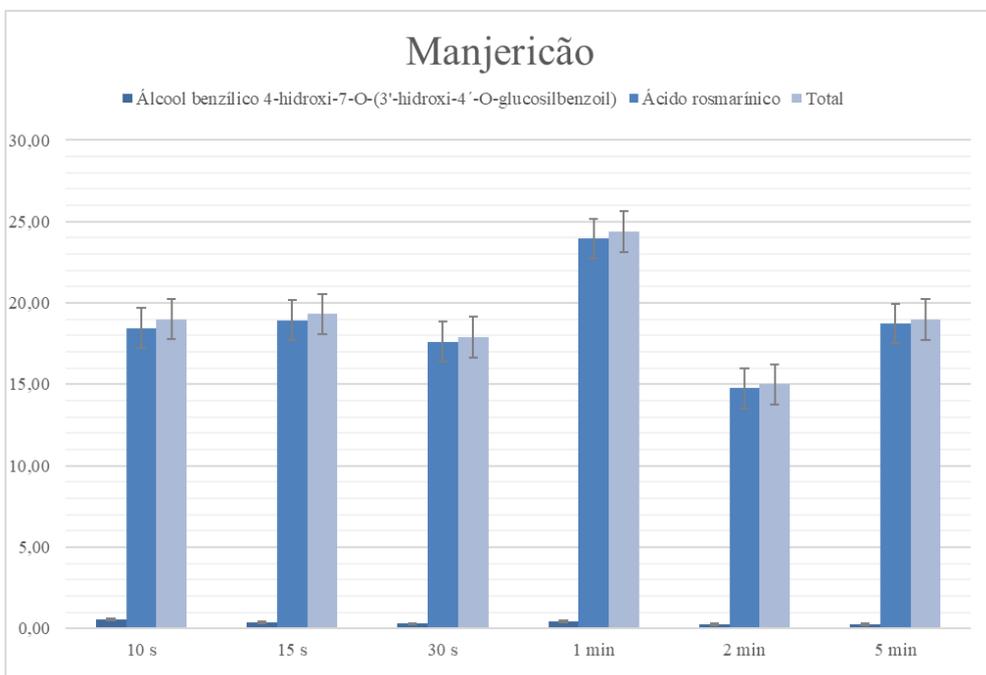


Figura 32 (b). Manjeriço

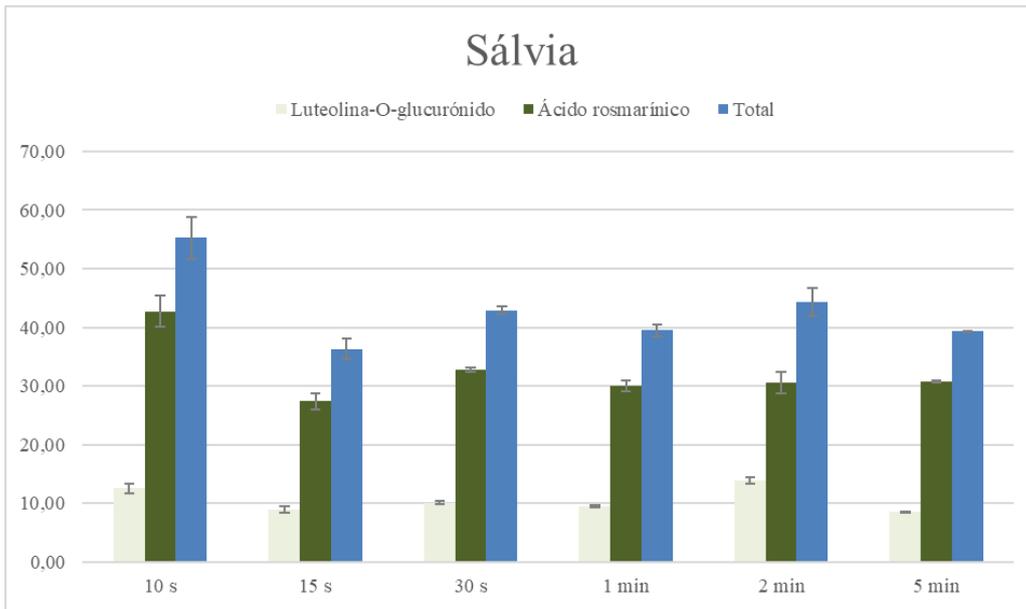


Figura 32 (c). Sálvia

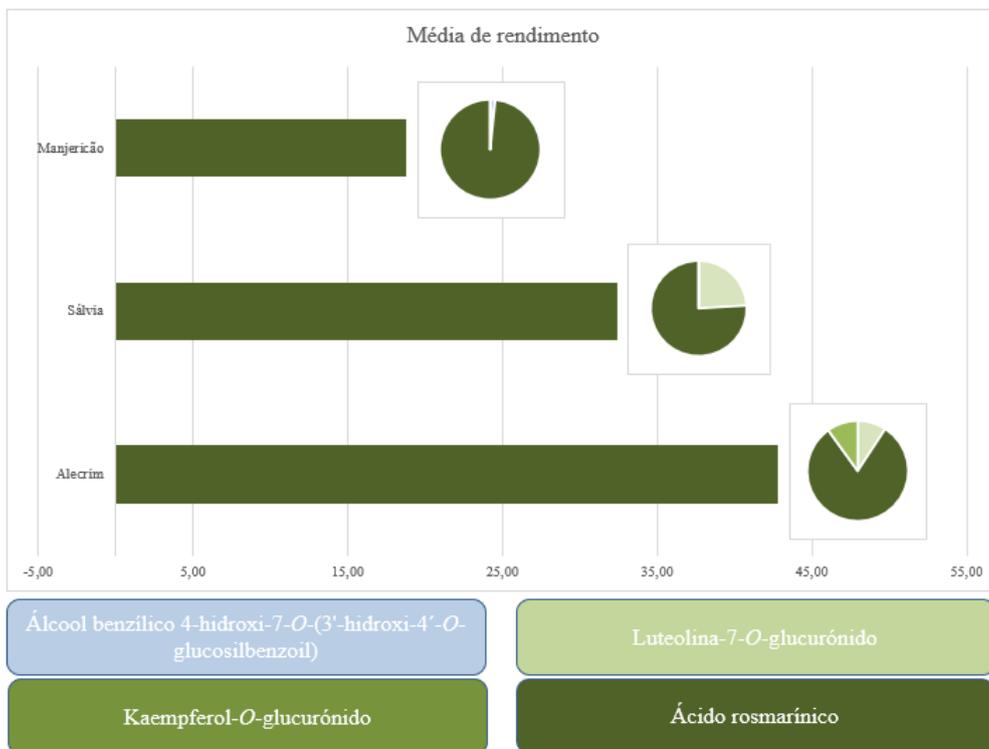


Figura 33. Rendimento médio e comparação entre os três extratos analisados

A partir das Figuras 32 e 33, é claramente visível que o alecrim é a planta que apresenta a maior quantidade de compostos fenólicos, mas também a maior concentração de ácido rosmarínico, em concordância com os resultados reportado por Sik *et al.* (2020). Além do ácido rosmarínico, foram identificados e quantificados mais três compostos fenólicos, tendo sido no total identificados 4 moléculas maioritárias (Tabela 12). A identificação foi efetuada tendo em consideração o ião molecular e a fragmentação do composto, mas também o tempo de retenção, características do UV-Vis e comparação com padrões comerciais quando disponíveis. O pico 1 apresentou um ião pseudomolecular com  $m/z$  421 e foi identificado por tentativa como álcool benzílico 4-hidroxi-7-*O*-(3'-hidroxi-4'-*O*-glucosilbenzoil). Os picos 2 e 4 foram identificados como luteolina-*O*-glucurónido e kaempferol-*O*-glucurónido, respetivamente, apresentando ambos um ião pseudomoleculares em  $m/z$  461, mas sendo distinguidos pelo seu espectro UV-Vis. Por fim, o pico 3, com ião pseudomolecular em  $m/z$  359, foi identificado como sendo ácido rosmarínico em comparação com o padrão comercial. Este composto foi encontrado em maior quantidade nas três amostras.

Tabela 12. Tentativa de identificação do perfil fenólico dos extratos vegetais

Pico	Rt (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Tentativa de identificação
1	15,95	421	Álcool benzílico 4-hidroxi-7- <i>O</i> -(3'-hidroxi-4'- <i>O</i> -glucosilbenzoil)
2	18,29	461	Luteolina- <i>O</i> -glucurónido
3	21,12	359	Ácido rosmarínico
4	24,48	461	Kaempferol- <i>O</i> -glucurónido

Por outro lado, nos três gráficos isolados de cada planta foi encontrada alta variabilidade com diferença estatisticamente significativa em quase todos os resultados. Surpreendentemente, em todos os menores tempos, obtiveram-se maiores concentrações e rendimentos quando comparados com os relatados na seção 4.1.1. Também é importante ressaltar que não parece haver nenhuma tendência específica nos diferentes tempos aplicados. Basicamente, altos rendimentos de compostos fenólicos diferem não apenas em plantas, mas também em flutuações de tempo, portanto, duas conclusões evidentes podem ser retiradas desses resultados: primeiro, mais especificidade na metodologia de

superfície de resposta deve ser aplicada para se obter resultados ótimos de cada planta, e segundo: o poder de extração EAU aparenta ser maior que o esperado e mais análises neste assunto deveriam ser realizadas, visto que não existem muitos estudos relacionados ao tempo de extração. Acima de tudo, é um resultado interessante porque, em ensaios de RSM baseados em extrações EAU, a tendência é a utilização em tempos longos, até maiores que os testados nesse trabalho. Se ensaios futuros puderem ser realizados, a redução do uso de energia para a extração de compostos fenólicos poderia levar a uma economia incalculável.

#### 4.1.3. Delineamento multinível (temperatura)

Em conjunto com os resultados obtidos do delineamento fatorial e do delineamento fatorial com a variável tempo dependente, uma análise extra multinível baseada no efeito da temperatura também foi realizado, atuando num intervalo entre 20 e 75 °C. A ideia principal de incorporar temperatura como um fator foi devido à existência de possíveis compostos fenólicos termolábeis. Portanto, a decisão de analisar um intervalo comum de temperatura aplicado em diferentes extrações pareceu interessante com o intuito de maximizar a seleção de fatores para futuras otimizações.

Na Figura 34, encontra-se uma representação agrupada de diferentes temperaturas em cada planta estudada, e tal como o fator tempo, também não há um padrão evidente no rendimento da extração das três plantas, portanto, interpretações independentes devem ser destacadas.

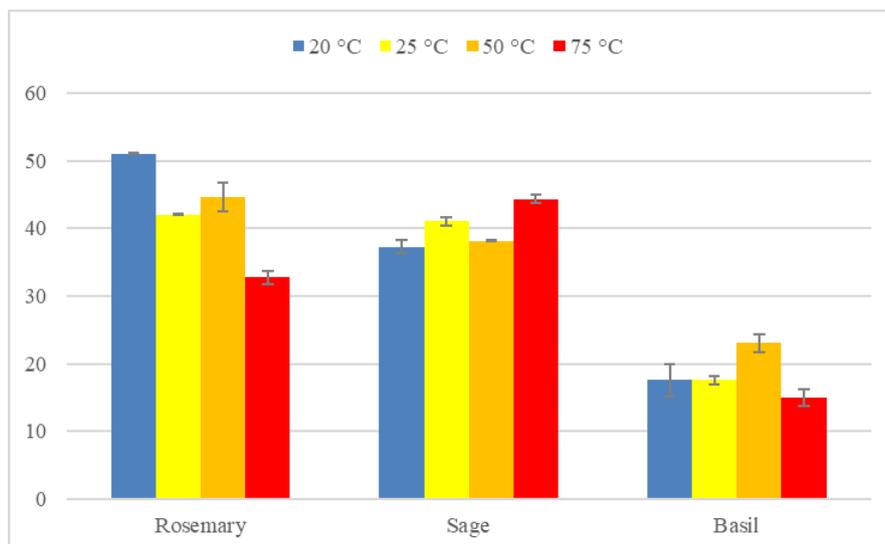


Figura 34. Efeito da temperatura no rendimento de ácido rosmarínico nas plantas avaliadas

No caso do alecrim, é observado um efeito negativo no rendimento com o aumento da temperatura. Apesar de apresentar um pequeno pico a 50 °C, apresenta menor rendimento quando comparado com a menor temperatura aplicada. Entretanto, também é importante verificar que a menor temperatura apresentou um rendimento 37% maior, quando comparado com a maior temperatura, sugerindo um impacto relevante nos níveis desse fator.

Contrariamente ao alecrim, para a sálvia, o aumento da temperatura causou um efeito positivo, obtendo a maior eficiência com a maior temperatura testada, apesar de não apresentar resultados da mesma magnitude que o alecrim. Entre os intervalos da menor para a maior temperatura, houve um acréscimo de aproximadamente 15% no rendimento da extração do ácido rosmarínico, apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

A partir de uma análise mais profunda dos compostos estudados, não foi detetado nenhum padrão específico, como suposto no início, não encontrando degradação de flavonoides, nem de ácido rosmarínico. Além disso, a diferença na resposta pode ser atribuída ao arranjo dos polifenóis na matriz alimentar, permitindo de certa forma, uma maior facilidade de extração numa planta quando comparada com outra e

consequentemente, a quantidade de energia necessária irá variar para cada planta, portanto é necessário aplicar um foco em futuros ensaios relacionados com a temperatura.

#### 4.1.4. Condições ótimas de extração

Por fim, determinaram-se os valores encontrados de teste de rastreio da extração, sendo: 1 min; temperatura: 75 °C; e potência do equipamento: 375 W. A partir dessas condições, analisaram-se os extratos vegetais mais promissores, pela sua bioatividade e citotoxicidade, para posterior incorporação nos iogurtes. A identificação e quantificação, tal como os tempos de retenção e ião pseudomolecular ( $[M-H]^-$ ) dos compostos fenólicos, estão descritos na Tabela 13 abaixo.

Tabela 13. Composição fenólica dos extratos vegetais

Pico	Composto identificado	Quantificação (mg/g extrato)		
		Alecrim	Manjeriçao	Sálvia
1 <sup>a</sup>	Álcool benzílico 4-hidroxi-7- <i>O</i> -(3'-hidroxi-4'- <i>O</i> -glucosilbenzoil)	n.d	1,00±0,048	n.d
2 <sup>b</sup>	Luteolina- <i>O</i> -glucuronido	1,40±0,078	n.d	12,77±0,071
3 <sup>c</sup>	Ácido rosmarínico	15,99±0,363	17,90±0,365	23,42±0,261
4 <sup>b</sup>	Kaempferol- <i>O</i> -glucuronido	1,29±0,075	n.d	n.d
	Total	18,68±0,210	18,90±0,413	36,19±0,332

n.d – não detetado. Padrões das curvas de calibração: <sup>a</sup> ácido cinâmico ( $y = 1E+06x - 222204$ ); <sup>b</sup> quercetina-3-*O*-glucosídeo ( $y = 34843x - 160173$ ); <sup>c</sup> ácido rosmarínico ( $y = 191291x - 652903$ )

A tentativa de identificação dos compostos fenólicos foi descrita no Capítulo 4.1.2. Foram identificados e quantificados 4 picos, sendo considerado apenas os compostos maioritários. Para o alecrim, foram identificados e quantificados três picos: luteolina-*O*-glucuronido, ácido rosmarínico e kaempferol-*O*-glucuronido. Quanto ao manjeriçao, apenas o álcool benzílico 4-hidroxi-7-*O*-(3'-hidroxi-4'-*O*-glucosilbenzoil) e o ácido rosmarínico foram detetados. Por fim, foram identificados e quantificados na sálvia os compostos luteolina-*O*-glucuronido e ácido rosmarínico.

O ácido rosmarínico foi o único composto identificado em todos os extratos avaliados e com concentração relevante. Os compostos obtidos nesse trabalho também

são confirmados por outros autores (Ribeiro *et al.*, 2016; Carochio *et al.*, 2016b; Roby *et al.*, 2013).

A composição fenólica de cada extrato vegetal corrobora com os resultados obtidos em ensaios preliminares, como demonstrados na Figura 33. As diferentes concentrações obtidas entre este resultado e os anteriores são justificadas pelo fato de cada planta (alecrim, manjeriço e sálvia) possuir diferentes condições ótimas de extração, variando a temperatura e o tempo para cada extrato, como constatado nas seções 4.1.2. e 4.1.3. Os perfis fenólicos dos extratos vegetais encontram-se nas Figuras 35, 36 e 37.

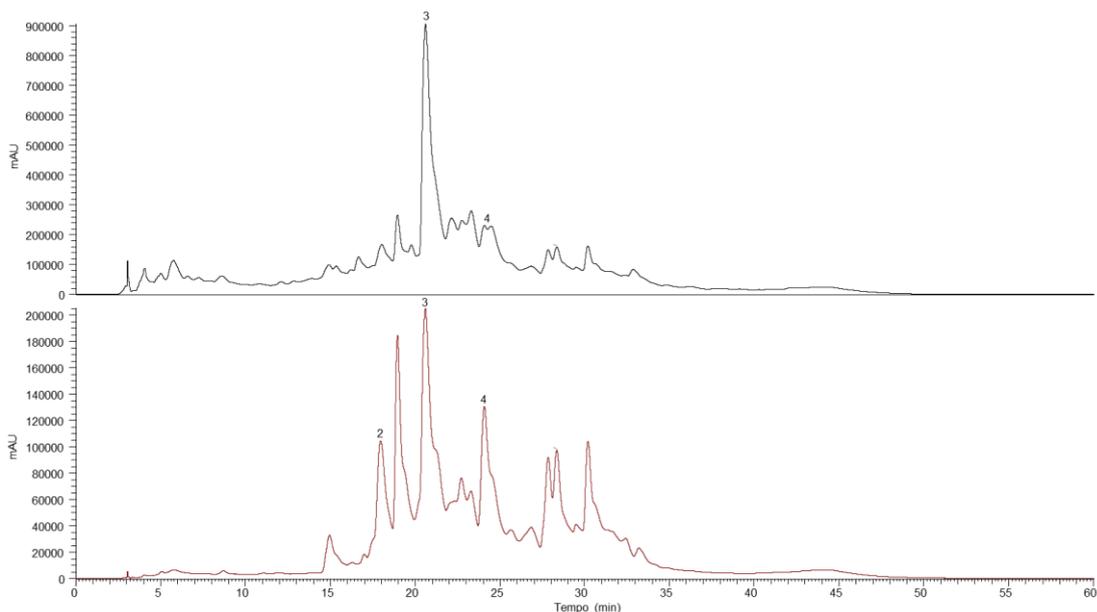


Figura 35. Perfil fenólico do extrato de alecrim a 280 nm (cima) e 370 nm (baixo). Os números apresentados correspondem aos compostos descritos na Tabela 13

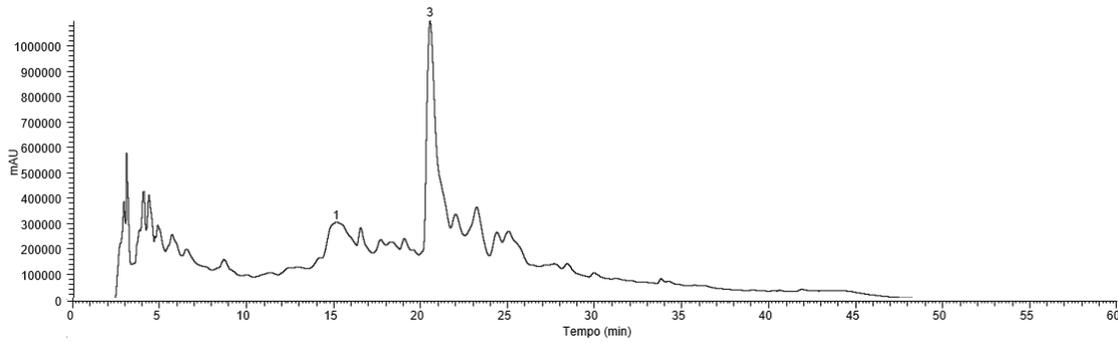


Figura 36. Perfil fenólico do extrato de manjeriço a 280 nm. Os números apresentados correspondem aos compostos descritos na Tabela 13

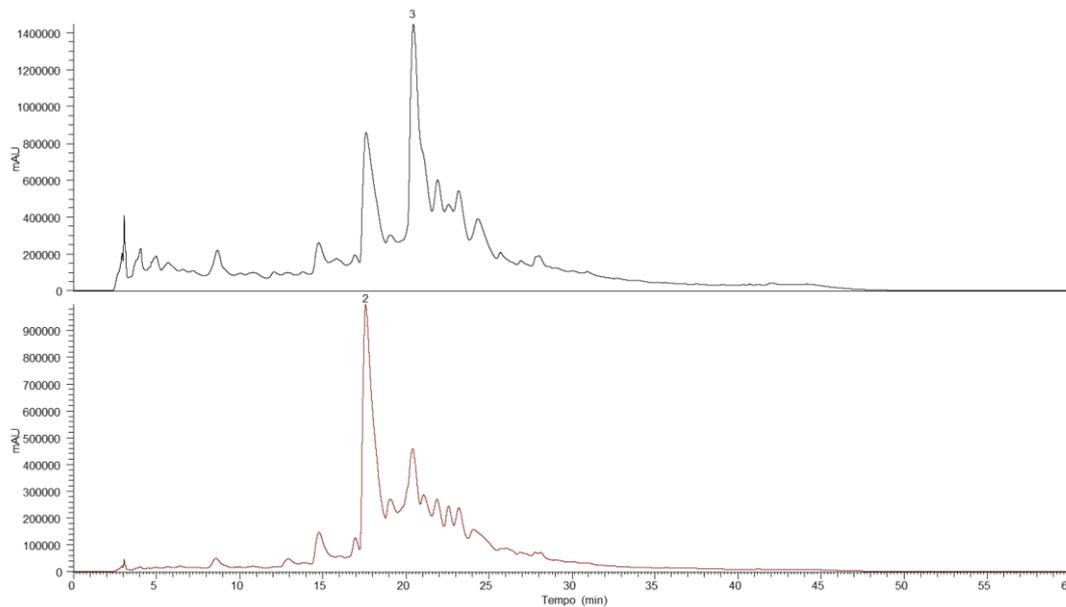


Figura 37. Perfil fenólico do extrato de sálvia a 280 nm (cima) e 370 nm (baixo). Os números apresentados correspondem aos compostos descritos na Tabela 13

## 4.2. Propriedades bioativas dos extratos obtidos e toxicidade

### 4.2.1. Atividade antioxidante

A Tabela 14 apresenta a capacidade antioxidante dos extratos vegetais e do controlo positivo (Trolox), determinado pelo método OxHLIA, pelos períodos de 120 e 180 min. Quanto menor a concentração de extrato necessária para inibir a hemólise oxidativa, maior é a atividade antioxidante.

O alecrim e a sálvia demonstraram uma maior proteção dos eritrócitos, ao inibirem 50% da hemólise oxidativa, quando comparados com o Trolox no tempo de 120 min (valores de  $IC_{50}$  (120 min) de 1,2; 2,6 e 41  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente). Da mesma forma, no período de 180 min foram obtidos os valores de  $IC_{50}$  (180 min) de 6,9; 8,8 e 63  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente). Por outro lado, o manjeriço foi o extrato que possuiu menor capacidade antioxidante entre os extratos avaliados, com valores de  $IC_{50}$  para 120 e 180 min de 60 e 87  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente.

Tabela 14. Atividade antihemolítica dos extratos vegetais ( $\mu\text{g/mL}$ )

	OxHLIA ( $IC_{50}$ values)	
	$\Delta t$ 120 min	$\Delta t$ 180 min
Manjeriço	60 $\pm$ 1	87 $\pm$ 1
Sálvia	2,6 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 0,4
Alecrim	1,2 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,3
Trolox	41 $\pm$ 1	63 $\pm$ 1

Em termos de capacidade antioxidante entre os extratos, o alecrim demonstrou a maior capacidade, seguido pela sálvia e por fim, o manjeriço. O extrato de alecrim resultou na maior atividade antioxidante, como previsto, uma vez que o extrato já é regulamentado pela EFSA (Council Regulation, 2011) e estudado por diversos autores pela sua alta capacidade antioxidante (Martínez *et al.*, 2019; McBride, Hogan & Kerry, 2007; Ribeiro *et al.*, 2016b). Portanto, verifica-se que a capacidade antioxidante dos extratos vegetais está possivelmente relacionada com a composição fenólica, como representado na Figura 33 (rendimento dos extratos vegetais).

É importante realçar que o Trolox é um composto puro, enquanto os extratos vegetais são uma mistura de compostos, com propriedades bioativas ou não (Ayuso *et al.*, 2020).

A capacidade antioxidante pode ser dividida em diversas categorias: altamente ativa ( $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ); moderadamente ativa ( $50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ); pouco ativa ( $100$

< IC<sub>50</sub> < 200 µg/mL) e praticamente inativa (IC<sub>50</sub> > 200 µg/mL) (Rai *et al.*, 2017). Em relação a esta classificação, os extratos de alecrim e sálvia foram avaliados com alta capacidade antioxidante e o extrato de manjeriço com capacidade antioxidante moderada.

Finimundy *et al.* (2020) utilizaram uma mistura de extratos vegetais com 50% de alecrim, extraídos por infusão, e avaliaram a capacidade antioxidante pelo método OxHLIA, encontrando um valor IC<sub>50</sub> de 22 µg/mL para Δt = 60 min. Porém, pelo método TBARS a mesma mistura obteve um valor IC<sub>50</sub> de 4,5 µg/mL.

Majdi *et al.* (2020) exploraram dois extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum* cv. Cinnamon e *Ocimum x citriodorum*) extraídos a partir de uma solução hidroetanólica a temperatura ambiente, resultando em valores IC<sub>50</sub> para o ‘Cinnamon’ e o *Ocimum x citriodorum* de 48 e 54 µg/mL, respectivamente, para Δt = 60 min. Avaliaram ainda a infusão, obtendo valores de 27,6 e 26,9 µg/mL. Estes resultados corroboram que o método de extração tem total interferência nos compostos antioxidantes presentes no extrato.

Não foram encontrados estudos referentes à sálvia realizados pelo mesmo método para determinar a atividade antioxidante (OxHLIA), porém, McCarthy *et al.* (2001) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos de alecrim e sálvia pelo método TBARS e encontraram resultados similares entre os dois extratos (0,291 e 0,457 mg malonaldeído/kg amostra, respectivamente). O presente trabalho também confirmou a boa atividade antioxidante de ambos (1,2 e 2,6 µg/mL) e a sua similaridade nos resultados.

#### 4.2.2. Atividade antimicrobiana

A Tabela 15 apresenta a atividade antibacteriana dos três extratos vegetais contra diversas bactérias Gram negativas e positivas, consideradas contaminantes em alimentos. O alecrim e a sálvia demonstraram comportamentos equivalentes, com concentração inibitória de 1 mg/mL e concentração bactericida de 2 mg/mL para todas as bactérias testadas. O manjeriço apresentou uma concentração inibitória e bactericida maior (2 mg/mL e 4 mg/mL respectivamente) para todas as bactérias, com exceção do *Bacillus*

*cereus*, que apresentou concentração inibitória e bactericida equivalente ao alecrim e à sálvia.

Tabela 15. Atividade antibacteriana dos extratos vegetais (mg/mL)

	Alecrim		Sálvia		Manjeriço		E211		E224	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	2	1	2	2	4	4	4	1	1
<i>Bacillus cereus</i>	1	2	1	2	1	2	0,5	0,5	2	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	2	1	2	2	4	1	2	0,5	1
<i>Escherichia coli</i>	1	2	1	2	2	4	1	2	0,5	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	2	1	2	2	4	1	2	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	2	1	2	2	4	2	4	0,5	0,5

Relativamente aos controlos positivos E211 e E224 (benzoato de sódio e metabissulfito de potássio, respetivamente), todos os extratos vegetais obtiveram resultados superiores na inibição do *S. aureus* quando comparados com o E211, e superiores na inibição do *B. cereus* quando comparados com o E224.

Verifica-se também que os aditivos sintéticos variam muito na concentração necessária para inibir cada tipo de bactéria. Por exemplo, o conservante E211 necessita de 4 mg/mL para a inibição do *S. aureus* e apenas 0,5 mg/mL para a inibição do *B. cereus*, indicando que o aditivo é seletivo para cada bactéria. Os extratos vegetais, por outro lado, inibem todas as bactérias na mesma razão, com exceção do manjeriço para o *B. cereus*, demonstrando a ampla aplicação dos extratos vegetais em diversas matrizes alimentares.

Na Tabela 16 é representada a atividade antifúngica dos extratos vegetais, sendo que os fungos foram mais suscetíveis aos extratos, quando comparados com as bactérias. O alecrim obteve a maior capacidade antifúngica entre os extratos, necessitando apenas de 0,12 mg/mL para a inibição do fungo *Penicillium verrucosum var. cyclopium*. Os outros extratos resultaram entre 0,25 e 1 mg/mL para atingir sua capacidade inibitória.

Tabela 16. Atividade antifúngica dos extratos vegetais (mg/mL)

	Alecrim		Sálvia		Manjeriço		E211		E224	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	1	2	1	1
<i>Aspergillus niger</i>	0,25	0,5	0,5	1	0,5	1	1	2	1	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,5	1	0,25	0,5	0,5	1	2	2	1	1
<i>Penicillium funiculosum</i>	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	1	2	0,5	0,5
<i>Penicillium verrucosum</i> <i>var. cyclopium</i>	0,12	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5	2	4	1	1
<i>Trichoderma viride</i>	0,5	1	0,5	1	0,5	1	1	2	0,5	0,5

Comparando os extratos vegetais com os conservantes sintéticos utilizados como controlo positivo, nota-se que os extratos foram equivalentes ou superiores na inibição de todos os fungos testados, sugerindo que, no geral, os extratos são mais eficientes na inibição dos fungos do que os aditivos benzoato de sódio e metabissulfito de potássio. O benzoato de sódio apresentou CMI de 2 mg/mL para o *Penicillium verrucosum var. cyclopium*, enquanto o alecrim, por outro lado, demonstrou ser capaz de inibir o mesmo fungo com apenas 0,12 mg/mL, sendo 15 vezes mais potente que o conservante sintético testado.

Carocho *et al.* (2016b) avaliaram os extratos de manjeriço através da extração por decocção em água e obtiveram um MIC para as mesmas bactérias entre 0,125 e 0,250 mg/mL. Para os fungos, os valores do MIC variaram entre 0,062 e 0,250 mg/mL para os mesmos testados neste trabalho. Takwa *et al.* (2018) também verificaram a atividade antimicrobiana de extratos de manjeriço pelo método de extração por maceração com etanol:água 80:20 (v/v) e obtiveram um CMI entre 0,10 e 0,45 mg/mL para bactérias, enquanto que para fungos obtiveram valores entre 0,20 e 0,60 mg/mL.

Gaio *et al.* (2015) analisaram a ação antimicrobiana dos extratos de manjeriço obtidos a partir de hidrodestilação, armazenando o óleo essencial. A partir desse método obtiveram um CMI para diversas bactérias entre 0,25 e 1 mg/mL.

Moreno *et al.* (2006) utilizaram diversos solventes e verificaram que o solvente utilizado afeta diretamente a atividade antimicrobiana de extratos de alecrim, sendo o

metanol e acetona bem mais eficazes que a água para a inibição do *S. aureus* (2, 4 e 25 mg/mL, respetivamente).

Portanto, verifica-se que o método de extração afeta significativamente a atividade antimicrobiana dos extratos, igualmente a capacidade antioxidante. Além disso, em certos trabalhos a atividade antibacteriana foi maior que a antifúngica, e em outros a situação inversa ocorreu, indicando também que o método de extração não afeta proporcionalmente as bactérias e os fungos.

Por outro lado, também há as condições climáticas em que a planta cresceu, onde varia entre as diferentes regiões ou países. As condições de sobrevivência da planta influenciam na produção dos metabolitos secundários, uma vez que um dos objetivos desses compostos são como uma proteção para a planta (Vuolo, Lima & Junior, 2019).

No geral, o alecrim apresentou os melhores resultados, tanto para a atividade antibacteriana como para a antifúngica, seguido pela sálvia e por fim, o manjeriço. Bozin *et al.* (2007) também avaliou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do alecrim e da sálvia, na qual o alecrim também apresentou a melhor atividade para ambos (bactérias e fungos).

Avaliações *in vitro* nem sempre são conclusivas, visto que são necessários avaliações *in situ* para concluir a real atividade antimicrobiana do extrato devido as interações dos compostos bioativos com a composição do alimento, podendo ocorrer a diminuição da efetividade. Em alimentos com alto teor de lípidos, por exemplo, uma camada de gordura pode formar ao redor do microrganismo e protegê-lo da ação antimicrobiana. Outro exemplo que diminui a eficácia do agente antimicrobiano é o teor de humidade, podendo dificultar o transporte da substância até a célula microbiana (Cabral, Pinto & Patriarca, 2013). A proteína presente no alimento pode gerar um complexação com o polifenol, também diminuindo sua bioatividade (Papadopoulou & Frazier, 2004).

#### 4.2.3. Citotoxicidade

Com exceção do alecrim (Council Regulation, 2011), os demais extratos vegetais ainda não são regulamentados pela legislação da EFSA, não garantindo a população que o consumo desses extratos é seguro. Portanto, realizar a avaliação da toxicidade é de extrema importância, visto que os compostos tóxicos podem gerar a produção de diversos metabolitos, levando a toxicidade (Abreu *et al.*, 2011). Quanto à atividade citotóxica, todos os extratos vegetais não apresentaram hepatotoxicidade em células PLP2, ultrapassando a máxima concentração testada de 400 µg/mL (Tabela 17).

Tabela 17. Hepatotoxicidade em valores GI<sub>50</sub> (µg/mL) em células PLP2

Extratos hidroetanólicos	GI <sub>50</sub>
Alecrim	> 400
Sálvia	> 400
Manjeriço	> 400
Elipticina	2,3 ± 0,2

Carocho *et al.* (2016b) avaliaram extratos de manjeriço pelo método de decocção e não foi indicado hepatotoxicidade nos extratos testados (GI<sub>50</sub> > 400 µg/mL). Afonso *et al.* (2019) avaliaram a citotoxicidade da *Salvia officinalis Icterina* extraídos pelo método de decocção em água, apresentando GI = 304,9 µg/mL.

Por fim, nenhum dos extratos de alecrim de Gonçalves *et al.* (2019) (extraídos apenas por agitação a temperatura ambiente) apresentaram toxicidade (GI<sub>50</sub> > 400 µg/mL).

Apesar dos métodos de extração diferirem entre os autores, em nenhum dos trabalhos foi apresentado hepatotoxicidade entre os extratos, indicando que independente das técnicas de extração, não apresentam toxicidade.

## 4.3. Avaliação dos parâmetros físico-químicos

Os resultados dos parâmetros físico-químicos, tal como nutricional e contagem microbiana, serão referentes aos iogurtes incorporados, e não referente aos extratos como as análises realizadas anteriormente. A Tabela 18 indica os parâmetros físico-químicos dos iogurtes, como as três coordenadas da cor ( $L^*$ ,  $a^*$ , e  $b^*$ ), atividade de água e pH. A representação da tabela segue uma análise dos dois fatores, tempo de prateleira (TP) e tipo de conservante (TC), de uma forma independente para que se consiga entender melhor os efeitos de cada um dos fatores nos resultados apresentados, ou, se porventura, houve uma interação entre ambos. Assim, a parte superior da tabela representa a passagem do tempo, mas incluído em cada um dos dias estão todos os tipos de iogurtes diferentes. Na parte inferior, para cada tipo de extrato conservante, estão incluídos os três tempos de análise. Quando cada um dos fatores pode ser analisando independentemente ( $p$ -value TP x TC > 0,05), então a classificação é feita recorrendo a testes *post-hoc* (teste de Tukey para amostras homoscedásticas e Tahmane T2 para não homoscedásticas), contudo, quando ( $p$ -value TP x TC < 0,05) então, para alguns casos apenas tendências puderam ser obtidas pelas médias marginais estimadas (MME).

Tabela 18. Parâmetros de cor, atividade de água e pH

		$L^*$	$a^*$	$b^*$	Atividade de água	pH
Tempo de prateleira (TP)	0 Dias	71±3 <sup>a</sup>	2,6±0,2 <sup>b</sup>	10,9±0,7	0,992±0,001 <sup>a</sup>	4,8±0,2
	7 Dias	79±2 <sup>b</sup>	2,8±0,5 <sup>b</sup>	12±1	0,995±0,001 <sup>b</sup>	4,8±0,2
	14 Dias	82±3 <sup>b</sup>	2,1±0,2 <sup>a</sup>	11±2	0,996±0,001 <sup>b</sup>	4,9±0,1
	$p$ -value (n=15)	Teste de Tukey	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tipo de conservante (TC)	Controlo	78±6	2,7±0,5 <sup>a</sup>	11,5±0,8	0,997±0,001 <sup>b</sup>	4,8±0,2
	Alecrim	78±5	2,2±0,5 <sup>a</sup>	10,6±0,8	0,9944±0,0008 <sup>a</sup>	4,7±0,1
	Manjerição	76±4	2,5±0,6 <sup>a</sup>	12±2	0,995±0,001 <sup>a</sup>	4,9±0,2
	Sálvia	78±5	2,3±0,3 <sup>a</sup>	11±1	0,995±0,001 <sup>a</sup>	4,8±0,2
	Sorbato de potássio	77±6	2,0±0,3 <sup>a</sup>	10±1	0,995±0,001 <sup>a</sup>	4,91±0,05
$p$ -value (n=9)	Teste de Tukey	0,235	0,031	<0,001	<0,001	0,162
ST×PT (n=45)	$p$ -value	0,416	0,096	<0,001	0,852	0,399

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas, com um nível de significância de 0,05. Os desvios padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes. Assim, devem ser considerados como um intervalo de valores e não como medida de precisão.

Entre os conservantes utilizados, apenas para o b\* (amarelo-azul) registou uma interação significativa. Referente ao tempo de prateleira, houve diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na cor, na qual o parâmetro  $L^*$  diferiu entre os dias 0 e 7, tornando-se ligeiramente mais claro com a passagem do tempo, e o  $a^*$  (verde-vermelho) entre os dias 7 e 14, registando uma tendência para a redução da tonalidade vermelha. Portanto, verifica-se que o tempo de prateleira teve mais influência que os extratos na variação da cor, como representado na Figura 38. Os iogurtes foram homogeneizados antes da recolha dos valores da cor e a polpa de fruta utilizada não tinha qualquer tipo de corante, justificando a ausência da intensidade da cor vermelha.

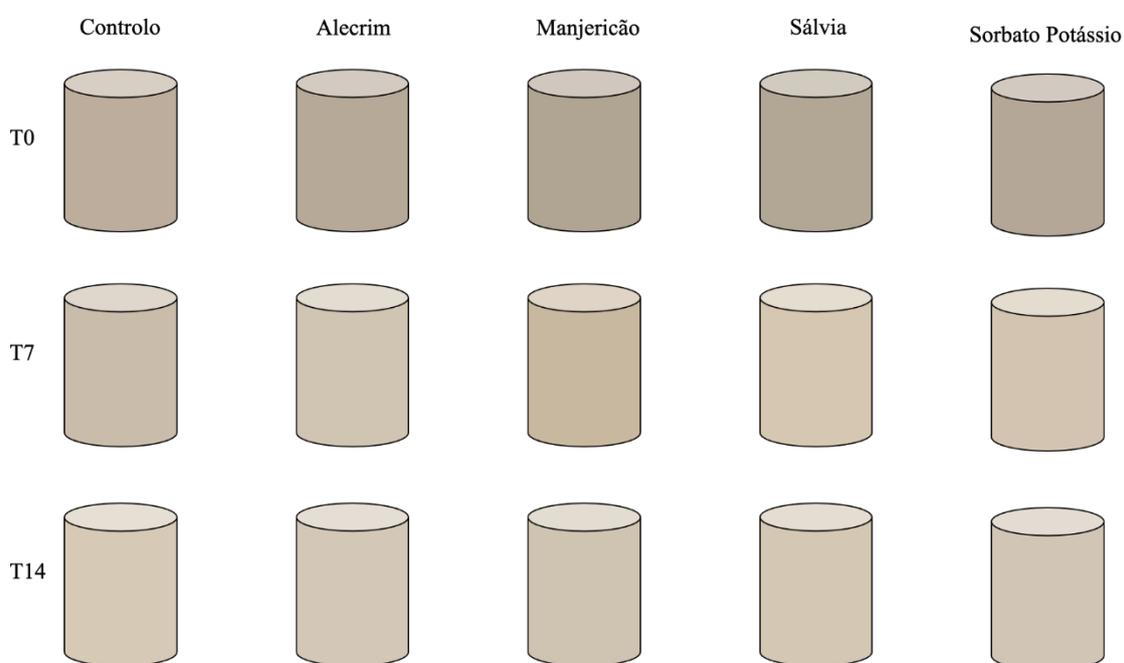


Figura 38. Representação da cor dos diferentes iogurtes ao longo dos 14 dias com dados recolhidos do colorímetro.

No que concerne a atividade de água ( $a_w$ ), a partir do  $p$ -value é possível verificar que ambos os dois fatores influenciaram e ambos puderam ser classificados. Assim, percebe-se que ao longo dos 14 dias, a atividade de água aumenta, ainda que muito ligeiramente, e que todos os extratos conservantes, bem como o sorbato de potássio, também fazem diminuir esse parâmetro, com diferenças significativas quando comparado

com o controlo. Finalmente, para o valor de pH, durante os 14 dias não se verificaram diferenças significativas, nem com a adição dos diferentes extratos. Esse resultado é bastante satisfatório, visto que alterações no pH de alimentos geralmente relacionam-se com alterações de textura ou, sobretudo, organolépticas, o que se deve evitar na procura de novos aditivos alimentares.

Apesar de Caleja *et al.* (2016) não obterem os mesmos resultados para os parâmetros de cor, as amostras com adição dos conservantes (naturais e sintéticos) não diferiram do controlo, como esperado de um aditivo alimentar. A adição de polpa de frutas nos iogurtes feito neste trabalho justifica a diferença no resultado dos parâmetros de cor obtidos por Caleja *et al.* (2016). Apesar disso, as amostras também tenderam para a redução da tonalidade vermelha ao longo do tempo, como verificado pelos autores.

#### 4.4. Avaliação da textura

A Tabela 19 representa o perfil de textura dos iogurtes nos diferentes tempos de análise usando o teste de extrusão invertida de forma a obter a firmeza, consistência, coesividade e trabalho de coesividade.

Tabela 19. Textura dos diferentes iogurtes após realização de um teste de extrusão invertida

		Firmeza (g)	Consistência (g/s)	Coesividade (g)	Trabalho de Coesividade (g/s)
Tempo de prateleira (TP)	0 Dias	49±8	138±21	-31±7	-22±6
	7 Dias	56±11	151±26	-38±9	-28±7
	14 Dias	57±10	146±26	-35±9	-26±8
	<i>p</i> -value (n=15)	Teste de Tukey	0,007	0,075	0,003
Tipo de conservante (TC)	Controlo	51±8	140±15	-32±6	-24±6
	Alecrim	65±13	175±30	-45±9	-33±8
	Manjeriçã	53±3	133±9	-30±3	-21±3
	Sálvia	57±2	152±18	-36±7	-28±5
	Sorbato de potássio	42±3	126±14	-28±6	-20±5
<i>p</i> -value (n=9)	Teste de Tukey	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TP×TC (n=45)	<i>p</i> -value	0,037	0,027	0,012	0,004

Os desvios padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes. Assim, devem ser considerados como um intervalo de valores e não como medida de precisão.

A firmeza, não tendo uma definição universal, é uma das dimensões mais importantes de alimentos semissólidos, pois é considerada como uma propriedade tecnológica ao invés de uma propriedade verdadeira resultante da compressão de alimentos. A firmeza está intimamente relacionada com a composição dos alimentos, pois a concentração de certos nutrientes faz variar em grande medida a firmeza. Além disso, a firmeza costuma ser caracterizada como um atributo viscoelástico de resistência à deformação, sendo definida por Faber *et al.* (2016) como o inverso da conformidade no final de um regime de deformação durante os primeiros 0.1 segundos da recuperação.

A consistência está relacionada com a firmeza, a grossura ou a viscosidade no caso do objeto de estudo ser um fluido ou semifluido. A coesividade é considerada como a força interna de um material compactado e ligada ao grau de deformação ou destruição do alimento quando uma força deformante é aplicada, mas também como a tendência de um alimento para se manter junto (Tobin *et al.*, 2017). Finalmente, o trabalho da coesão é o valor da coesividade por uma determinada unidade de tempo ou área, neste caso o tempo.

Assim, a partir da Tabela 19 pode-se entender que ambos os fatores, TP e TC tiveram uma interação significativa para alterar o perfil de textura dos iogurtes ao longo dos 14 dias, revelando que a utilização dos extratos de plantas não interfere nas propriedades reológicas dos iogurtes.

#### 4.5. Perfil nutricional

##### 4.5.1. Composição centesimal

A Tabela 20 apresenta a composição dos iogurtes e sua avaliação ao longo da vida de prateleira (0, 7 e 14 dias), tal como o efeito dos conservantes utilizados (alecrim, manjerição, sálvia e sorbato de potássio) quando comparado com o controle.

Tabela 20. Parâmetros nutricionais em g/100 g de peso fresco

		Humidade	Gordura bruta	Cinzas	Proteínas	Hidratos de carbono	Energia kcal	Energia kJ
Tempo de prateleira (TP)	0 Dias	87±2	1,7±0,3 <sup>b</sup>	1,0±0,2 <sup>b</sup>	2,9±0,3	8±1	34±7	144±30
	7 Dias	88±3	1,2±0,3 <sup>a</sup>	0,6±0,2 <sup>a</sup>	3,0±0,7	8±1	31±7	130±27
	14 Dias	88±2	1,3±0,5 <sup>a,b</sup>	0,7±0,2 <sup>a</sup>	2,7±0,8	7±1	29±6	137±27
<i>p</i> -value (n=15)	Teste de Tukey	0,088	0,039	<0,001	0,153	0,079	0,068	0,068
Tipo de conservante (TC)	Controlo	87±2	1,6±0,6 <sup>a</sup>	0,8±0,4	2,8±0,4	7±1	33±6	137±27
	Alecrim	87±1	1,6±0,5 <sup>a</sup>	0,8±0,2	3,1±0,3	8±1	35±5	145±20
	Manjeriço	88±2	1,1±0,6 <sup>a</sup>	0,8±0,1	2,9±0,6	7±1	29±6	120±26
	Sálvia	89±1	1,1±0,4 <sup>a</sup>	0,9±0,3	2,9±0,3	8±1	29±4	124±18
	Sorbato de potássio	88±2	1,6±0,6 <sup>a</sup>	0,8±0,3	2,7±0,8	7±2	32±10	136±41
<i>p</i> -value (n=9)	Teste de Tukey	0,592	0,043	0,725	0,473	0,120	0,207	0,207
ST×PT (n=45)	<i>p</i> -value	0,088	0,186	0,306	0,080	0,009	0,110	0,110

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas, com um nível de significância de 0,05. Os desvios padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes. Assim, devem ser considerados como um intervalo de valores e não como medida de precisão.

Quanto à composição nutricional, a humidade foi o parâmetro mais abundante, como esperado devido à alta quantidade de água presente nos iogurtes. A média da humidade (87,75 g/100 g) foi próxima da encontrada por Corrêa *et al.* (2018) e por Caleja *et al.* (2016) (84,79 g/100 g e 87,47 g/100 g, respetivamente).

Após a humidade, os parâmetros obtidos em maior quantidade foram os hidratos de carbono e as proteínas, na qual os hidratos de carbono apresentaram uma média de 7,4 g/100 g, e 2,88 g/100 g para as proteínas. Corrêa *et al.* (2018) e Caleja *et al.* (2016) obtiveram 5,36 g/100 g e 5,55 g/100 g para os hidratos de carbono e 5,62 e 3,77 para as proteínas, respetivamente. Os maiores teores de hidratos de carbono e menores para as proteínas encontrados neste trabalho podem ser justificados pela formulação utilizada para a produção dos iogurtes. Por fim, a gordura bruta foi o nutriente encontrado em menor abundância.

Apenas nos hidratos de carbono se verificou uma interação significativa (0,009), revelando que o valor deste nutriente se alterou por ação do tempo e da incorporação dos extratos de uma forma interativa. Para os outros nutrientes a interação não foi significativa, sendo necessário tirar conclusões por cada fator.

Não houve diferenças significativas na humidade com o passar dos 14 dias de tempo de prateleira nem com a incorporação dos diferentes extratos vegetais ou o sorbato de potássio, mostrando que nenhum deles teve influência nesse fator. Para a gordura, a variação aconteceu sobretudo com o passar do tempo, verificando-se uma diferença significativa dos 0 para os 14 dias, passando-se o mesmo em relação às cinzas. A contribuição energética dos iogurtes não foi afetada pela adição dos diferentes conservantes. Efetivamente, a adição dos diferentes extratos não teve qualquer ação concreta nos iogurtes, o que é um dado positivo, visto que os aditivos alimentares não podem ter qualquer tipo de aporte nutricional ou alterar de algum modo o perfil nutricional dos alimentos onde são adicionados. Caleja *et al.* (2016) também verificou que o tempo de prateleira (TP) possui maior influência nas amostras do que o tipo de conservante utilizado (TC).

#### 4.5.2. Ácidos gordos individuais

A Tabela 21 expressa o valor dos ácidos gordos mais abundantes expressos em percentagem relativa do seu total. Dos 13 ácidos gordos identificados, os ácidos saturados (SFA) mostraram ser os mais abundantes, tanto em quantidade como em número de moléculas individuais, chegando aos 78%, restando apenas cerca de 20% para os ácidos gordos monoinsaturados. Em relação aos ácidos gordos polinsaturados, apenas se registou o ácido linoleico (C18:2) com uma percentagem que variou entre os 1 e 2%. A proporção também foi relatada por Corrêa *et al.* (2018), na qual SFA > MUFA > PUFA.

Tabela 21. Perfil em ácidos gordos individuais, bem como ácidos gordos saturados totais (SFA) e ácidos gordos monoinsaturados totais (MUFA)

		C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	SFA	MUFA
Tempo de Prateleira (TP)	0 Dias	3,0±0,7	2,1±0,3	4,3±0,7	4,6±0,8	13±1	0,8±0,2	1,22±0,0 5	37±2	1,3±0,2	0,9±0,3	12±1	17±1	2±1	78±2	20±1
	7 Dias	3,2±0,5	1,9±0,3	3,7±0,7	4,1±0,6	12±1	0,7±0,2	1,19±0,0 5	38±1	1,4±0,2	1,0±0,2	12,7±0,9	18±1	1,5±0,8	78±2	20±1
	14 Dias	3,2±0,3	2,1±0,1	4,6±0,3	5,2±0,4	14,5±0,9	0,83±0,09	1,36±0,04	37,7±0,7	1,3±0,1	0,85±0,09	10,8±0,7	16,5±0,5	1,0±0,2	80,4±0,5	18,6±0,6
<i>p</i> -value (n=15)	Teste de Tukey	0,289	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,051	<0,001	0,003	0,045	0,043	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tipo Conservante (TC)	Controlo	2,9±0,6	2,0±0,2	4,2±0,7	4,7±0,7	14±1	0,8±0,2	1,3±0,1	38±1	1,3±0,2	0,8±0,1	12±2	18±1	1,2±0,4	79±1	19±1
	Alecrim	1,8±0,3	1,9±0,2	4,1±0,5	4,6±0,5	13±1	0,8±0,1	1,25±0,07	37,4±0,5	1,4±0,2	0,8±0,2	12±1	17,9±0,9	1,5±0,7	78±2	20,1±0,9
	Manjerição	2,4±0,2	1,9±0,5	4±1	4±1	13±1	0,9±0,2	1,27±0,07	37±2	1,3±0,1	0,81±0,09	12±1	18±2	1,6±0,7	78±3	20±2
	Sálvia	3,0±0,4	2,1±0,1	4,1±0,4	4,4±0,5	13±1	0,9±0,2	1,2±0,1	38±1	1,4±0,2	1,1±0,3	12±1	17,3±0,7	2±1	78±2	19,5±0,9
	Sorbato Potássio	3,4±0,3	2,1±0,4	4,4±0,7	4,9±0,7	14±1	0,8±0,1	1,28±0,06	38±1	1,2±0,2	1,0±0,1	12±2	16,2±0,8	1,0±0,4	80,8±0,7	18±1
<i>p</i> -value (n=9)	Teste de Tukey	0,037	0,065	0,149	0,022	<0,001	0,078	<0,001	0,025	0,020	<0,001	0,993	<0,001	<0,001	<0,001	0,416
TP×TC (n=45)	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas, com um nível de significância de 0,05. Os desvios padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes. Assim, devem ser considerados como um intervalo de valores e não como medida de precisão.

C6:0 – ácido caproico; C8:0 – ácido caprílico; C10:0 – ácido cáprico; C12:0 – ácido láurico; C14:0 – ácido mirístico; C14:1 – ácido miristoléico; C15:0 – ácido pentadecanoico; C16:0 – ácido palmítico; C16:1 – ácido palmitoleico; C17:0 – ácido heptadecanoico; C18:0 – ácido esteárico; C18:1 – ácido oleico; C18:2 – ácido linoleico; SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados.

O ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1), ácido mirístico (C14:0) e ácido esteárico (C18:0) foram os ácidos gordos individuais mais abundantes, chegando aos 38, 18, 14,5 e 12%, respectivamente. Conceição *et al.* (2020), Corrêa *et al.* (2018), Heleno *et al.* (2017) e Caleja *et al.* (2016) também identificaram e quantificaram os mesmos 4 ácidos gordos, tal como sendo os mais abundantes em percentagem relativa.

No que concerne à influência do TP e do TC, para todos os casos se registou uma interação significativa relevando que efetivamente os extratos vegetais e o sorbato de potássio não exercem influência na alteração dos ácidos gordos durante os 14 dias. Por outro lado, o tempo de prateleira de 14 dias parece não ter sido suficiente para que criasse alterações no perfil de ácidos gordos, ou, a adição de polpa de fruta pode ter exercido um efeito protetor dos ácidos gordos insaturados.

Apesar do iogurte ser considerado um alimento saudável devido à alta quantidade de nutrientes e propriedades benéficas como melhora do sistema imunológico e da flora intestinal, a matriz alimentar possui alta quantidade de ácidos gordos saturados (SFA), compostos que a Organização Mundial de Saúde (OMS) associou com o risco de doenças cardiovasculares (Weerithilake *et al.*, 2014; WHO, 2003).

Porém um estudo de revisão realizado por Fattore & Fanelli (2013) verificou que o ácido palmítico, ácido gordo encontrado em maior percentagem nos iogurtes, não há evidências suficientes que comprovem o risco associado a problemas cardiovasculares, na qual o ácido gordo aumenta na mesma proporção os níveis de colesterol LDL e HDL (lipoproteínas de baixa e alta intensidade, respectivamente).

Além disso, há diversos estudos relacionados ao ácido oleico, segundo composto encontrado em maior abundância nos iogurtes, evidenciando a redução de doenças cardiovasculares, além de associar o ácido oleico com propriedades anti-inflamatórias e anticoagulantes, como reportado por Lopez-Huertas (2010).

## 4.5.3. Ácidos orgânicos

Na Tabela 22 estão representados os diferentes ácidos orgânicos identificados nas amostras de iogurte, recorrendo a um HPLC-DAD para sua identificação. Entre eles, destacam-se os mais abundantes, nomeadamente o ácido láctico e o ácido cítrico, que em conjunto com os restantes, oxálico, málico e fumárico, totalizam aproximadamente 0,6 g/100 de iogurte em massa fresca.

Tabela 22. Perfil em ácidos orgânicos dos iogurtes apresentados em g/100 g de peso fresco

		Ácido Oxálico	Ácido Málico	Ácido Láctico	Ácido Cítrico	Ácido Fumárico	Total Ácidos Orgânicos
Tempo de Prateleira (TP)	0 Dias	0,007±0,003	0,13±0,03	0,28±0,08 <sup>a</sup>	0,22±0,06	0,006±0,003	0,6±0,1
	7 Dias	0,004±0,003	0,13±0,03	0,30±0,01 <sup>a</sup>	0,23±0,05	0,007±0,003	0,7±0,1
	14 Dias	0,001±0,001	0,12±0,02	0,37±0,01 <sup>b</sup>	0,18±0,05	0,004±0,004	0,6±0,1
<i>p</i> -value (n=15)	Teste de Tukey	<0,001	0,238	0,028	0,001	0,036	0,02
Tipo Conservante (TC)	Controlo	0,005±0,004	0,12±0,02	0,3±0,1	0,19±0,06	0,007±0,003	0,6±0,2
	Alecrim	0,005±0,003	0,13±0,02	0,35±0,08	0,22±0,04	0,005±0,004	0,7±0,1
	Manjerição	0,003±0,004	0,11±0,03	0,3±0,1	0,20±0,05	0,005±0,003	0,6±0,2
	Sálvia	0,004±0,003	0,13±0,02	0,33±0,08	0,22±0,03	0,003±0,001	0,7±0,1
	Sorbato de potássio	0,003±0,003	0,13±0,04	0,3±0,1	0,23±0,07	0,009±0,003	0,6±0,2
<i>p</i> -value (n=9)	Teste de Tukey	0,119	0,108	0,705	0,143	0,001	0,532
TP×TC (n=45)	<i>p</i> -value	0,003	<0,001	0,502	<0,001	0,026	0,037

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas, com um nível de significância de 0,05. Os desvios padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes. Assim, devem ser considerados como um intervalo de valores e não como medida de precisão.

Apesar da sua pouca quantidade, os ácidos orgânicos são muito relevantes para alimentos de base láctea, sobretudo o ácido láctico. Apenas o ácido láctico não revelou uma interação significativa, pois todos outros ácido tiveram pouca variação seja em

termos de passagem de tempo e de conservante utilizado, excetuando o ácido oxálico que revelou uma tendência para decrescer ao longo do tempo.

No que concerne ao ácido láctico, a passagem do tempo revelou maior influência que a adição dos extratos, mostrando uma tendência decrescente de ácido láctico ao longo do tempo, com diferenças estatisticamente significativas entre os dias 7 e 14.

As altas concentrações de ácido cítrico podem ser justificadas pela adição de polpa de frutas nos iogurtes, e não como contaminação ou outro conservante adicionado em iogurtes. Porém, diversos outros estudos também apontam a presença de ácido cítrico em iogurtes, como descrito por Lee, Lee & Kim (2002), Hong & Ko (1991), Shin, Lee & Kim (1993) e Vénica *et al.* (2018).

O ácido láctico representa um importante agente em produtos lácteos, visto que é um composto considerado como GRAS e utilizado frequentemente na indústria alimentar como aditivo acidulante, conservante e outros. Os outros ácidos orgânicos presentes em iogurtes colaboram no desenvolvimento de um sabor complexo para o produto. A fermentação é definida pela conversão do substrato por um microrganismo, célula vegetal ou animal ou enzimas, em um determinado produto. Portanto, apesar da sua importância, o ácido láctico não é encontrado naturalmente nos produtos alimentares, mas é produzido durante a fermentação pelas bactérias lácticas (Theron e Lues, 2011; Spreer e Mixa, 1995).

#### 4.5.4. Açúcares solúveis

A Tabela 23 apresenta os açúcares solúveis presentes nos iogurtes durante os 14 dias de análise. Foram detetados quatro açúcares solúveis, nomeadamente a frutose, glucose, sacarose e o açúcar mais abundante em produtos lácteos, a lactose, que registou valores entre 4 e 5 g/100 g.

Tabela 23. Perfil em açúcares solúveis dos iogurtes apresentados em g/100 g de peso fresco

		Frutose	Glucose	Sacarose	Lactose	Açúcares Solúveis Totais
Tempo de Prateleira (TP)	0 Dias	1,9±0,3	0,8±0,1	0,15±0,05	5,1±0,7 <sup>b</sup>	8±1
	7 Dias	1,7±0,4	0,7±0,2	0,16±0,08	4,4±0,3 <sup>a, b</sup>	7±1
	14 Dias	1,5±0,6	0,6±0,2	0,13±0,09	4,0±0,1 <sup>a</sup>	6±2
<i>p</i> -value (n=15)	Teste de Tukey	0,031	0,003	0,517	0,039	0,029
Tipo Conservante (TC)	Controlo	1,7±0,5	0,7±0,2	0,12±0,08	4±1	7±2
	Alecrim	1,8±0,6	0,8±0,2	0,20±0,09	5±1	8±2
	Manjeriço	1,6±0,3	0,7±0,1	0,15±0,08	4,4±0,6	6,9±0,9
	Sálvia	1,7±0,5	0,7±0,2	0,12±0,07	4±1	7±2
	Sorbato de potássio	1,7±0,5	0,7±0,2	0,13±0,04	4±1	7±2
<i>p</i> -value (n=9)	Teste de Tukey	0,812	0,583	0,135	0,526	0,583
TP×TC (n=45)	<i>p</i> -value	0,025	0,041	0,112	0,081	0,037

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas, com um nível de significância de 0,05. Os desvios padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes. Assim, devem ser considerados como um intervalo de valores e não como medida de precisão.

Em termos de classificação do efeito dos extratos vegetais e do tempo de prateleira, a frutose, glucose e total de açúcares solúveis mostraram interações significativas, não permitindo tirar conclusões nem dizer se o TP ou TC tiveram mais influência que o outro.

A sacarose registou uma interação não significativa, mas não mostrou alterações significativas entre cada um dos dias ou extratos incorporados. Apenas para a lactose se conseguiu definir que o tempo de prateleira tem maior influência na quantidade de lactose que a incorporação dos extratos, registando um decréscimo estatisticamente significativo do dia 0 para o dia 14, pois ao sétimo dia não havia diferenças, mostrando um decréscimo contínuo e constante ao longo do tempo. Este comportamento é corroborado pelo aumento constante e significativo de ácido láctico, registado na Tabela 22 (ácidos orgânicos), revelando que as bactérias lácticas estavam, ao longo tempo, a converter lactose em ácido láctico, e que os extratos de plantas não alteraram este fenómeno natural

nos iogurtes. Durante a fermentação láctica, a lactose não é totalmente convertida, permanecendo em níveis de até 4 g/100 g de produto (Spreer & Mixa, 1995).

Em trabalhos com iogurte, Corrêa *et al.* (2018) encontraram uma média de 4,17 g/100 g de lactose (sem adição de polpa), enquanto Heleno *et al.* (2017) verificou uma quantidade média de 3,8 g/100 g (com adição de polpa). A diferença nos resultados obtidos pode ser justificada pelo diferente modo de produção do iogurte ou a marca do iogurte utilizado, tal como a adição ou não de polpa.

De acordo com Spreer & Mixa (1995), a fermentação é uma das etapas fundamentais para a fabricação de iogurtes, sendo a pré-fermentação a etapa de decomposição da lactose em glucose e galactose. Posteriormente, a glucose é consumida em diversas etapas até a formação de ácido láctico. A lactose e a glucose serão os dois principais açúcares utilizados como substrato, sendo consumido ao longo do tempo, como é comprovado na Tabela 23.

#### 4.6. Análise microbiológica

As Figuras 39 e 40 apresentam as contagens para microrganismos aeróbios mesófilos e bactérias lácticas psicrótrófilas, respectivamente.

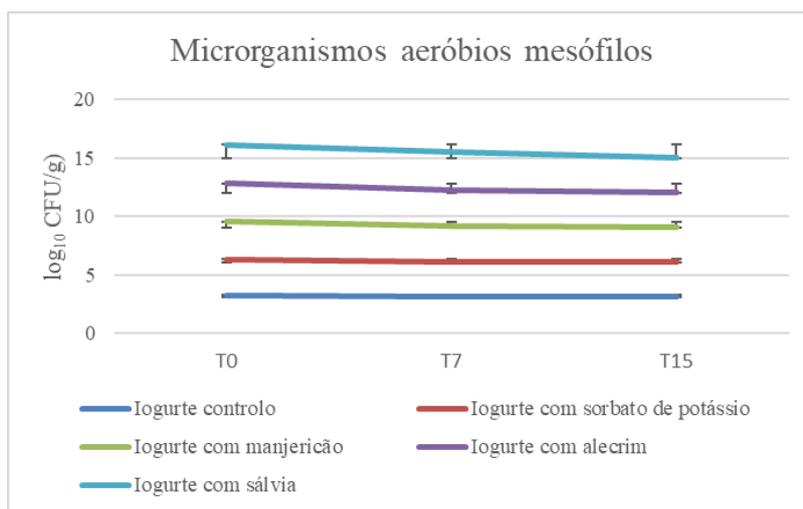


Figura 39. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos ao longo de 14 dias

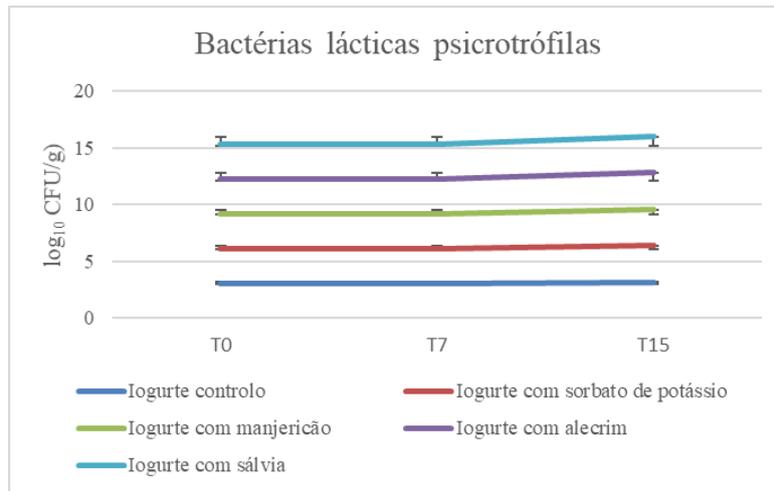


Figura 40. Contagem de bactérias lácticas psicrófilas ao longo de 14 dias

Para os microrganismos aeróbios mesófilos, houve um ligeiro decréscimo entre os dias 0 e 14, porém sem diferenças estatísticas significativas. Quanto a contagem de coliformes e bolores e leveduras, não houve crescimento ao longo dos 14 dias avaliados.

Verifica-se um ligeiro aumento da quantidade de bactérias lácticas, sendo justificado pelo consumo de lactose e correspondente transformação em ácido láctico, como apresentado nas Tabelas 22 e 23 (ácidos orgânicos e açúcares solúveis, respetivamente).

As bactérias lácticas são estudadas pelas suas propriedades benéficas probióticas, como a melhoria da função da barreira epitelial e restauração da homeostase microbiana através de interações entre os microrganismos, além de colaborar nas funções do sistema imunológico e a eliminação de patógenos (Beermann & Hartung, 2016).

## **5. CONCLUSÃO**

A otimização dos extratos vegetais a partir de um delineamento fatorial fracionado foi capaz de verificar que a percentagem de solvente utilizada é o fator determinante para a obtenção de um extrato rico em ácido rosmarínico, seguido pelo tempo de extração e por fim, a potência do equipamento. A partir de um estudo mais detalhado sobre os fatores avaliados, verificou-se que não há um padrão geral para o tempo aplicado e para a temperatura, indicando que o maior tempo e a maior temperatura não irão necessariamente obter o maior rendimento em ácido rosmarínico nos extratos.

Quanto às propriedades bioativas, o alecrim apresentou a melhor capacidade antioxidante, seguido da sálvia e do manjeriço, assim como para a atividade antimicrobiana. Esse fato sugere a possível relação dos compostos fenólicos com a atividade antioxidante e antimicrobiana. Nenhum dos três extratos vegetais apresentaram hepatotoxicidade em células PLP2, à máxima concentração testada.

Para os parâmetros físico-químicos, nomeadamente cor, atividade de água, pH e textura, constatou-se no geral que o tempo de prateleira (ao longo dos 14 dias) teve maior influência que o tipo de conservante utilizado, tal como nos parâmetros nutricionais. Considera-se um ponto positivo pois os aditivos conservantes devem evitar a alteração dessas características.

Um dos estudos mais relevantes para a aplicação de conservantes em iogurtes, é o estudo da inibição das bactérias lácticas ao longo do tempo de prateleira. Apesar do extrato ser utilizado pelas suas propriedades antimicrobianas, deve-se evitar a inibição das bactérias lácticas presentes no iogurte. Essa observação pode ser realizada avaliando três parâmetros: a quantidade de lactose, ácido láctico e contagem de bactérias lácticas. De acordo com a análise de açúcares solúveis e ácidos orgânicos, verificou-se uma diminuição significativa na quantidade de lactose, tal como um aumento na concentração de ácido láctico presente no iogurte, indicando a presença das bactérias lácticas. Por fim, houve um aumento das bactérias lácticas, justificada pelo consumo de substrato (lactose e glucose) ao longo dos 14 dias.

Portanto, os extratos vegetais testados (alecrim, manjeriço e sálvia) foram capazes de apresentar boa capacidade antioxidante e antimicrobiana, além de não afetar

as características físico-químicas e nutricionais do alimento, nem o normal crescimento e multiplicação das bactérias lácticas.

Para próximos passos da investigação, será importante testar maiores tempos e temperaturas de extração para otimizar o rendimento dos compostos bioativos, tal como maior concentração dos extratos. Também é necessário testar períodos mais extensos de vida de prateleira, verificando se o conservante é realmente eficaz, além de testar os iogurtes com e sem a polpa de fruta, para investigar se a polpa também foi responsável pela conservação dos iogurtes (apesar de não conter conservantes adicionados) e para verificar se existem alterações das características físico-químicas e nutricionais.

Assim pode concluir-se que esta dissertação foi bem sucedida, na medida em que foi possível obter um extrato otimizado em termos de compostos fenólicos, compostos estes diretamente relacionados com a bioatividade exibida. Foi ainda possível a incorporação dos melhores extratos em iogurtes verificando-se a sua capacidade de conservação sem alteração dos parâmetros intrínsecos dos iogurtes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, R. M. V.; Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R. C.; Lima, R. T.; Vasconcelos, M. H.; Adegas, F.; Chaves, R.; Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno [3, 2-b] pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicine Chemistry*, 46, 5800–5806.

Afonso, A. F.; Pereira, O. R.; Fernandes, Â.; Calhelha, R. C.; Silva, A. M. S.; Ferreira, I. C. F. R.; Cardoso, S. M. (2019). Phytochemical Composition and Bioactive Effects of *Salvia africana*, *Salvia officinalis* 'Icterina' and *Salvia mexicana* Aqueous Extracts. *Molecules*, 24, 4327.

Al-Ashmawy, M. A. M.; Ibrahim, J. I. (2009). Influence of potassium sorbate on the growth of yeasts and moulds in yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 224-226.

Arroyo, B. J.; Santos, A. P.; De Melo, E. A.; Campos, A.; Lins, L.; Boyano-Orozco, L. C. (2019). Chapter 8 - Bioactive Compounds and Their Potential Use as Ingredients for Food and Its Application in Food Packaging. In: Campos, M. R. S. *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Woodhead Publishing. Duxford. 143-156.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2016). Official Methods of Analysis, 17th edition. Washington DC, 2000.

Ayuso, M.; Pinela, J.; Dias, M. I.; Barros, L.; Ivanov, M.; Calhelha, R. C.; Sokovic, M.; Ramil-Rego, P.; Barreal, M. E.; Gallego, P. P.; Ferreira, I. C. F. R. (2020). Phenolic composition and biological activities of the *in vitro* cultured endangered *Eryngium viviparum* J. Gay. *Industrial Crops & Products*, 148, 112325.

Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghaffoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.

- Azwanida, N. N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4, 196.
- Baines, D. (2012) Chapter 1 – Defining the term “natural” in the context of food products. In: Baines, D.; Seal, R. *Natural food additives ingredients and flavouring*. Woodhead Publishing. United Kingdom. 1-22.
- Barni, M. V.; Carlini, M. J.; Cafferata, E. G.; Puricelli, L.; Moreno, S. (2012). Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cell. *Oncology Reports*, 27, 1041-1048.
- Bauer, J.; Kuehnl, S.; Rollinger, J. M.; Scherer, O.; Northoff, H.; Stuppner, H.; Werz, O.; Koeberle, A. (2012). Carnosol and carnosic acids from *Salvia officinalis* inhibit microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342, 169-176.
- Beermann, C.; Hartung, J. (2016). Chapter 3 – Lactic acid bacteria and associated products characteristics within milk fermentation. In: Puniya, A. K. *Fermented Milk and Dairy Products*. CRC Press. Florida. 47-82.
- Berdahl, D. R.; Mckeague, J. (2015). Chapter 8 – Rosemary and sage extracts as antioxidants for food preservation. In: Shahidi, F. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Woodhead Publishing. Cambridge. 177-211.
- Binstok, G.; Campos, C.; Varelab, O.; Gerschensona, L. N. (1998). Sorbate-nitrite reactions in meat products. *Food Research International*, 31, 581-585.
- Birtic, S.; Dussort, P.; Pierre, F.; Bily, A. C.; Roller, M. (2015). Carnosic acid. *Phytochemistry*, 115, 9-19.
- Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Samojlik, I.; Jovin, E. (2007). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7879-7885.

- Cabral, L. C.; Pinto, V. F.; Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 1-14.
- Caleja, C.; Barros, L.; Antonio, A. L.; Carocho, M.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, I. C. F. R. (2016). Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. *Food Chemistry*, 210, 262-268.
- Caleja, C.; Barros, L.; Antonio, A. L.; Oliveira, B. P. P.; Ferreira, I. C. F. R. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342-346.
- Caleja, C.; Barros, L.; Prieto, M. A.; Bento, A.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, I. C. F. R. (2019). Development of a natural preservative obtained from male chestnut flowers: optimization of a heat-assisted extraction technique. *Food & Function*, 10, 1352-1363.
- Carocho, M.; Barreira, J. C. M.; Bento, A.; Fernández-Ruiz, V.; Morales, P.; Ferreira, I. C. F. R. (2016a). Chestnut and lemon balm based ingredients as natural preserving agents of the nutritional profile in matured “Serra da Estrela” cheese. *Food Chemistry*, 204, 185-193.
- Carocho, M.; Barreiro, M. F.; Morales, P.; Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377-399.
- Carocho, M.; Barros, L.; Barreira, J. C. M.; Calhella, R. C.; Sokovic, M.; Fernandez-Ruiz, V.; Santos-Buelga, C.; Morales, P.; Ferreira, I. C. F. R. (2016b). Basil as functional and preserving ingredient in “Serra da Estrela” cheese. *Food Chemistry*, 207, 51-59.
- Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R. (2012) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.

Chibane, L. B.; Degraeve, P.; Ferhout, H.; Bouajila, J.; Oulahal, N. (2018). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1457-1474.

Chryssanthopoulos, C.; Maridaki, M. (2010). Chapter 9 – Nutritional Aspects of Yogurt and Functional Dairy Products. In: Yildiz, F. *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*. CRC Press. Florida. 267-306.

Conceição, N.; Albuquerque, B. R.; Pereira, C.; Corrêa, R. C. G.; Lopes, C. B.; Calhelha, R. C.; Alves, M. J.; Barros, L.; Ferreira, I. C. F. R. (2020). By-Products of Camu-Camu [*Myrciaria dúbia* (Kunth) McVaugh] as Promising Sources of Bioactive High Added-Value Food Ingredients: Functionalization of Yogurts. *Molecules*, 25, 1-17.

Corrêa, R. C. G.; Barros, L.; Fernandes, Â., Sokovic, M.; Bracht, A.; Peralta, R. M.; Ferreira, I. C. F. R. (2018). A natural food ingredient based on ergosterol: optimization of the extraction from *Agaricus blazei*, evaluation of bioactive properties and incorporation in yogurts. *Food & Function*, 9, 1465-1474.

Council Regulation (2008). *Regulation (EC) No 1333/2008*. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008R1333-20181029&rid=1>. Acesso em: 06 de agosto de 2020.

Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD. p. 1250-1318.

Cseke, L. J.; Lu, C. R.; Kornfeld, A.; Kaufman, P. B.; Kirakosyan, A. (2006). Chapter 3 – Regulation of Metabolite Synthesis in Plants. In: Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S. L.; Duke, J. A.; Briemann, H. L. *Natural Products from Plants*. CRC Press. Florida. 51-100.

Davidson, P. M.; Cekmer, H. B.; Monu, E. A.; Techathuvanan, C. (2015). Chapter 1 - The use of natural antimicrobials in food: an overview. In: Taylor, T. M. *Handbook of*

*Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Woodhead Publishing. United Kingdom. 1-30.

EFSA. European Food Safety Authority. *Regulation (EC) No 1129/2011*. Disponível em: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/28cb4a37-b40e-11e3-86f9-01aa75ed71a1/language-en>. Acesso em: 07 de janeiro de 2020.

EFSA. European Food Safety Authority. *Regulation (EC) No 1333/2008*. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32008R1333&from=EN>. Acesso em: 07 de janeiro de 2020.

EFSA. European Food Safety Authority. *Regulation (EU) No 231/2012*. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0231&from=EN>. Acesso em: 02 de novembro de 2020.

Embuscado, M. E. (2015). Chapter 11 – Herbs and spices as antioxidants for food preservation. In: Shahidi, F. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Woodhead Publishing. Cambridge. 251-280.

Faber, T. J.; Jaishankar, A.; McKinley, G. H. (2016). Describing the firmness, springiness and rubberiness of food gels using fractional calculus. Part I: Theoretical framework. *Food Hydrocolloids*, 62, 311-324.

Farhat, M. B.; Landoulsi, A.; Chaouch-Hamada, R.; Sotomayor, J. A.; Jordán, M. J. (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49, 904-914.

Fattore, E.; Fanelli, R. (2013). Palm oil and palmitic acid: a review on cardiovascular effects and carcinogenicity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 648-659.

FDA. U.S. Food and Drugs Administration. *Overview of Food Ingredients, Additives & Colors*. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>. Acesso em: 02 de outubro de 2019.

Fernandes, S. S.; Coelho, M. S.; Salas-Mellado, M. M. Chapter 7 – Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Food: Polyphenols, Carotenoids, Peptides From Animal and Plant Sources New. (2019). In: Campos, M. R. S. *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Woodhead Publishing. Duxford. 119-140.

Ferreira, I. C. F. R.; Abreu, R. M. V. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, 1, 32-39.

Finimundy, T. C.; Pereira, C.; Dias, M. I.; Caleja, C.; Calhelha, R. C.; Sokovic, M.; Stojkovic, D.; Carvalho, A. M.; Rosa, E.; Barros, L.; Ferreira, I. C. F. R. (2020). Infusions of Herbal Blends as Promising Sources of Phenolic Compounds and Bioactive Properties. *Molecules*, 25, 2151.

Freitas, A. C.; Figueiredo, P. (2000). *Conservação de Alimentos*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa. 201 p.

Gaio, I.; Saggiorato, A. G.; Treichel, H.; Cichoski, A. J.; Astolfi, V.; Cardoso, R. I.; Toniazzo, G.; Valduga, E.; Paroul, N.; Cansian, R. L. (2015). Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 10, 323-329.

Galotto, M. J.; Guarda, A.; De Discastillo, C. L. (2015). Chapter 10 - Antimicrobial Active Polymers in Food Packaging. In: Cirillo, G.; Spizzirri, U. G.; Iemma, F. *Functional Polymers in Food Science: From Technology to Biology*. Scrivener Publishing. Massachusetts. 323-346.

Gava, A. J. (2007). *Princípios de Tecnologia de Alimentos*. Editora Nobel. São Paulo. 289 p.

Gokoglu, N. (2018). Novel natural food preservatives and applications in seafood preservation: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2068-2077.

Gonçalves, G. A.; Corrêa, R. C. G.; Barros, L.; Dias, M. I.; Calhelha, R. C.; Correa, V. G.; Bracht, A.; Peralta, R. M.; Ferreira, I. C. F. R. (2019). Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation on a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) extract rich in rosmarinic acid. *Food Chemistry*, 271, 393-400.

Gulçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.

Gupta, A.; Naraniwal, M.; Kothari, V. (2012). Modern Extraction Methods for Preparation of Bioactive Plant Extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1, 8-26.

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147-1150.

Heleno, S. A.; Rudke, A. R.; Calhelha, R. C.; Caroch, M.; Barros, L.; Gonçalves, O. H.; Barreiro, M. F.; Ferreira, I. C. F. R. (2017). Development of dairy beverages functionalized with pure ergosterol and mycoesterol extracts: an alternative to phytosterol-based beverages. *Food & Function*, 8, 103-110.

Hong, O.; Ko, Y. (1991). Study on Preparation of Yogurt from Milk and Rice. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 23, 587-592.

ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feedings stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions. *ISO 15213*. 2003. 1-6.

ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique. *ISO 4833-2*. 2013. 1-12.

ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique. *ISO 4832*. 2006. 1-6.

ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. *ISO 21527-1*. 2008. 1-8.

ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. *ISO 21527-2*. 2008. 1-9.

Jordán, M. J.; Castillo, J.; Bañón, S.; Martínez-Conesa, C.; Sotomayor, J. A. (2014). Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. *Food Chemistry*, 151, 212-218.

Juneja, V. K.; Dwivedi, H. P.; Yan, X. (2012). Novel Natural Food Antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 381-403.

Lee, I.; Lee, S.; Kim, H. S. (2002). Preparation and Quality Characteristics of Yogurt Added with *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 31, 411-416.

Lerner, A.; Matthias, T. (2015). Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 14, 479-489.

Lockowandt, L.; Pinela, J.; Roriz, C. L.; Pereira, C.; Abreu, R. M. V.; Calhella, R. C.; Alves, M. J.; Barros, L.; Bredol, M.; Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496–503.

- Lopez-Huertas, E. (2010). Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research*, 61, 200-207.
- Lule, S. U.; Xia, W. (2005). Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International*, 21, 367-388.
- Majdi, C.; Pereira, C.; Dias, M. I.; Calhelha, R. C.; Alves, M. J.; Rhourri-Frih, B.; Charrouf, Z.; Barros, L.; Amaral, J. S.; Ferreira, I. C. F. R. (2020). Phytochemical Characterization and Bioactive Properties of Cinnamon Basil (*Ocimum basilicum* cv. 'Cinnamon') and Lemon Basil (*Ocimum x citriodorum*). *Antioxidants*, 9, 369.
- Mamur, S.; Yuzbasioglu, D.; Unal, F.; Aksoy, H. (2012). Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in lymphocytes in vitro. *Cytototechnology*, 64, 553-562.
- Martínez, L.; Castillo, J.; Ros, G.; Nieto, G. (2019). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Rosemary, Pomegranate and Olive Extracts in Fish Patties. *Antioxidants*, 8, 1-16.
- Martins, N.; Barros, L.; Santos-Buelga, C.; Henriques, M.; Silva, S.; Ferreira, I. C. F. R. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 158, 73-80.
- Martins, N.; Barros, L.; Santos-Buelga, C.; Henriques, M.; Silva, S.; Ferreira, I. C. F. R. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378-385.
- May, A.; Pinheiro, M. Q.; Sacconi, L. V.; De Jesus, J. P. F. (2018). *Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura*. Instituto Agrônômico de Campinas – IAC. Campinas.

- McBride, N. T. M.; Hogan, S. A.; Kerry, J. P. (2006). Comparative addition of rosemary extract and additives on sensory and antioxidant properties of retail packaged beef. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1201-1207.
- McCarthy, T. L.; Kerry, J. P.; Kerry, J. F.; Lynch, P. B.; Buckley, D. J. (2001). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, 57, 177-184.
- Menezes, J.; Athmaselvi, K. A. (2018). Chapter 5 – Report on Edible Films and Coatings. In: Grumezescu, A. M.; Holban, A. M. *Food Packaging and Preservation*. Academic Press. Londres. 177-207.
- Meyer, A.; Suhr, K.; Nielsen, P.; Holm, F. (2002). Chapter 6 – Natural food preservatives. In: Ohlsson, T.; Bengtsson, N. *Minimal processing Technologies in the food industry*. Woodhead Publishing. Cambridge. 124-174.
- Moreno, S.; Scheyer, T.; Romano, C. S.; Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40, 223-231.
- Msagati, T. A. M. (2013). *Chemistry of Food Additives and Preservatives*. Wiley-Blackwell. Chichester. 315 p.
- Oliveira, G. D. A. R.; Oliveira, A. E.; Conceição, E. C.; Leles, M. I. G. (2016). Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acid from rosemary. *Food Chemistry*, 211, 465-473.
- Ozer, B. (2010). Chapter 2 – Strategies for Yogurt Manufacturing. In: Yildiz, F. *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*. CRC Press. Florida. 47-97.
- Papadopoulou, A.; Frazier, R. A. (2004). Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 186-190.

Petersen, M.; Simmonds, M. S. J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121-125.

Plants of the World. Disponível em <<http://www.plantsoftheworldonline.org/>>. Acesso em: 02 de dezembro de 2020.

Pokorny, J. (2007). Chapter 11 – Antioxidants in Food Preservation. In: Rahman, M. S. *Handbook of Food Preservation*. CRC Press. Londres. 259-286.

Pophaly, S. D.; Kumar, H. Tomar, S. K.; Singh, R. (2016). Chapter 11 – Yogurt: Concepts and Developments. In: Nout, M. J. R.; Sarkar, P. K. *Fermented Milk and Dairy Products*. CRC Press. Florida. 311-328.

Potter, N. N.; Hotchkiss, J. H. (1999). *Ciencia de los alimentos*. Editora ACRIBIA, S.A. 667 p.

Raadt, P.; Wirtz, S.; Vos, E.; Verhagen, H. (2015). Short Review of Extract of Rosemary as a Food Additive. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 5, 126-137.

Rahman, M. S. (2007). Chapter 1 – Food Preservation: Overview. In: Rahman, M. S. *Handbook of Food Preservation*. CRC Press. Florida. 3-18.

Rai, M.; Paralikar, P.; Agarkar, G.; Ingle, A. P.; Derita, M.; Zacchino, S. (2017). Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 519, 67-78.

Ribeiro, A.; Barros, L.; Calhelha, R. C.; Carocho, M.; Ciric, A.; Sokovic, M.; Dias, M. M.; Santos-Buelga, C.; Barreiro, M. F.; Ferreira, I. C. F. R. (2016a). Tarragon phenolic extract as a functional ingrediente for pizza dough: Comparative performance with ascorbic acid (E300). *Journal of Functional Food*, 26, 268-278.

Ribeiro, A.; Caleja, C.; Barros, L.; Santos-Buelga, C.; Barreiro, M. F.; Ferreira, I. C. F. R. (2016b). Rosemary extracts in functional food: extraction, chemical characterization

and incorporation of free and microencapsulated forms in cottage cheese. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 2185-2196.

Ritz, E.; Hahn, K.; Ketteler, M.; Kuhlmann, M. K.; Mann, J. (2012). Phosphate Additives in Food – a Health Risk. *Deutsches Arzteblatt International*, 109, 49-55.

Roby, M. H. H.; Sarhan, M. A.; Selim, K. A.; Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.

Rojas, J.; Buitrago, A. (2019). Chapter 1 – Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship with Prevention of Neurodegenerative Diseases. In: Campos, M. R. S. *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Woodhead Publishing. Duxford. 3-31.

Sahan, N.; Golge, O. (2005). The effects of potassium sorbate on the microbiology quality of yogurt. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 56, 49-72.

Saidi, B.; Faid, M.; Warthesen, J. J. (2003). Effect of sorbate on yogurt fermentation and stability of sorbate. *Actes Inst. Agron. Vet*, 23, 5-13.

Santos-Sánchez, N. F.; Salas-Coronado, R.; Valadez-Blanco, R.; Hernández-Carlos, B.; Guadarrama-Mendoza, P. C. (2017). Natural antioxidant extracts as food preservatives. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 16, 361-370.

Sharabani, H.; Izumchenko, E.; Wang, Q.; Kreinin, R.; Steiner, M.; Barvish, Z.; Kafka, M.; Sharoni, Y.; Levy, J.; Uskokovic, M.; Studzinski, G. P.; Danilenjo, M. (2006). Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. *International Journal of Cancer*, 118, 3012-3021.

Shin, Y.; Lee, K.; Kim, D. (1993). Studies on the Preparation of Yogurt from Milk and Sweet Potato or Pumpkin. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 25, 666-671.

- Sik, B.; Hanczné, E. L.; Kapcsándi, V.; Ajtony, Z. (2020). Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six Lamiaceae plants as determined by HPLC-DAD measurement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 184, 113173.
- Smid, E. J.; Gorris, L. G. M. (2007). Chapter 10 – Natural Antimicrobials for Food Preservation. In: Rahman, M. S. *Handbook of Food Preservation*. CRC Press. Londres. 237- 258.
- Sokovic, M.; Glamočlija, J.; Marin, P. D.; Brkić, D.; Van Griensven, L. J. L. D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15, 7532–7546.
- Spreer, E.; Mixa, A. (1995). Chapter 8 – Acidified Milk Products. In: \_\_. *Milk and Dairy Product Technology*. CRC Press. New York. 339-364.
- Stojkovic, D.; Petrovic, J.; Sokovic, M.; Glamoclija, J.; Kukic-Markovic, J.; Petrovic, S. (2013). *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3205-3208
- Suriyarachchi, V. R.; Fleet, G. H. (1981). Occurrence and Growth of Yeasts in Yogurts. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 574-579.
- Takwa, S.; Caleja, C.; Barreira, J. C. M.; Sokovic, M.; Achour, L.; Barros, L.; Ferreira, I. C. F. R. (2018). *Arbutus unedo* L. and *Ocimum basilicum* L. as sources of natural preservatives for food industry: A case study using loaf bread. *LWT – Food Science and Technology*, 88, 47-55.
- Theron, M. M.; Lues, J. F. R. (2011). Chapter 2 – Nature and composition of organic acids. In: \_\_. *Organic Acids and Food Preservation*. CRC Press. Florida. 21-40.
- Tobin, A. B.; Heynemann, P.; Wemmer, J.; Stokes, J. R.; Nicholson, T.; Windhab, E. J.; Fischer, P. (2017). Cohesiveness and flowability of particulated solid and semi-solid food systems. *Food & Function*, 10, 3397-3816.

Valls, J.; Pasamontes, N.; Pantaleón, A.; Vinaixa, S.; Vaqué, M.; Soler, A.; Millán, S.; Gómez, X. (2013). Chapter 80 – Prospects of Functional Foods/Nutraceuticals and Markets. In: Ramawat, K. G.; Mérillon, J. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolic and Terpenes*. Springer. Berlin. 2491-2526.

Vaquero, M. R.; García-Villalba, R.; Larrosa, M.; Yáñez-Gascón, M. J.; Fromentin, E.; Flanagan, J.; Roller, M.; Tomas-Barberan, F. A.; Espin, J. C.; García-Conesa, M. T. (2013). Bioavailability of the major bioactive diterpenoids in a rosemary extract: metabolic profile in the intestine, liver, plasma, and brain of Zucker rat. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 1834-1846.

Vénica, C. I.; Wolf, I. V.; Suárez, V. B.; Bergamini, C. V.; Perotti, M. C. (2018). Effect of the carbohydrates composition on physicochemical parameters and metabolic activity of starter culture in yogurts. *LWT – Food Science and Technology*, 94, 163-171.

Verruck, S.; Prudencio, E. S. (2018). Ultrassom na indústria de alimentos: aplicações no processamento e conservação. Atena Editora. São Paulo. 50 p.

Volpe, M. G.; Di Stasio, M.; Paolucci, M.; Moccia, S. (2015). Chapter 2 – Polymers for Food Shelf-Life Extension. In: Cirillo, G.; Spizzirri, U. G.; Iemma, F. *Functional Polymers in Food Science: From Technology to Biology*. Scrivener Publishing. Massachusetts. 9-61.

Vuolo, M. M.; Lima, V. S.; Junior, M. R. M. (2019). Chapter 2 – Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In: Campos, M. R. S. *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Woodhead Publishing. Duxford. 33-47.

Weerathilake, W. A. D. V.; Rasika, D. M. D.; Ruwanmali, J. K. U.; Munasinghe, M. A. D. D. (2014). The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4, 353-362.

World Health Organization (WHO) (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *Technical Report Series 916 Geneva: WHO*. 1-104

Yildiz, F. (2010). Chapter 1 – Overview of Yogurt and Other Fermented Dairy Products. In: \_\_. Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products. CRC Press. Florida. 1-46.