



**Elaboração de paté de lapa, *Patella* spp. com adição de medronho, *Arbutus unedo*: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial e avaliação da estabilidade oxidativa**

**Sidónio Joaquim Carreira Rodrigues**

2015



**Elaboração de paté de lapa, *Patella spp.*, com adição de medronho, *Arbutus unedo*: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial e avaliação da estabilidade oxidativa**

**Sidónio Joaquim Carreira Rodrigues**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da  
Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Professor Doutor Rui Manuel Maneta Ganhão e coorientação do Professor Doutor Paulo Jorge de Sousa Maranhão

2015

Título: Elaboração de paté de lapa, *Patella* spp., com adição de medronho, *Arbutus unedo*: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial e avaliação da estabilidade oxidativa

Copyright © Sidónio Joaquim Carreira Rodrigues

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2015

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Este estudo teve enquadramento no projeto: “LAPA” Lapa para aquacultura e para paté”.LAPA-31-04-01-FEP-199, com financiamento do PROMAR/GACoeste, acção nº 3.5, Julho de 2012, eixo de Promoção e valorização gastronómica dos produtos da pesca.





## AGRADECIMENTOS

Durante o tempo que desenvolvi este trabalho muitos foram aqueles que me ajudaram e incentivaram ao longo das várias fases, ajudando a superar todas as dificuldades que foram surgindo. Desta forma quero agradecer:

- Ao meu orientador, Professor Doutor, Rui Ganhão, pelo apoio e confiança depositada, pela disponibilidade e acompanhamento que sempre me dispensou nas inúmeras solicitações e por todos os comentários, sugestões e críticas.
- Ao meu coorientador, Professor Doutor, Paulo Maranhão, por todo o acompanhamento despendido em matérias de carácter marinho e pela disponibilidade que sempre me dispensou nas inúmeras solicitações.
- À Professora Doutora, Susana Mendes, pelo apoio e acompanhamento no tratamento estatístico dos resultados.
- A todo o painel de provadores (Rui Ganhão, Paulo Maranhão, Júlio Coelho, Teresa Mouga, Susana Mendes, Isabel Pinheiro, Pedro Correia, Cristina Salas, Pedro Ramalho, Ana Augusto, Sofia Esteves da Silva e André Horta) pelo empenho e motivação demonstrados durante todas as provas sensoriais.
- Aos técnicos de laboratório pelo auxílio prestado nos laboratórios sempre que necessitei.
- Ao grupo MARE- Centro de Ciências do Mar e do Ambiente por todo o apoio prestado, críticas e sugestões. Em especial, à Ana Augusto pela ajuda prestada nas análises da textura e gordura, ao André Horta por todo o auxílio na análise microbiológica e à Joana Silva e Susete Pinteus pela ajuda dispensada na caracterização antioxidante.

A todos um muito obrigado.



## RESUMO

---

As lapas do género *Patella* são moluscos gastrópodes em crescente utilização na alimentação humana, sendo um petisco muito apreciado em várias regiões costeiras de Portugal. De acordo com a fileira do pescado, o consumo de produtos da pesca ricos em ácidos gordos polinsaturados têm vindo a substituir os produtos de origem animal terrestre através dos produtos filetados, reestruturados e pré-cozinhados. A oxidação dos alimentos é a causa mais importante na deterioração da qualidade nutricional e sensorial dos produtos da pesca. Assim nos últimos anos, tem-se verificado um interesse crescente na utilização de antioxidantes naturais de origem vegetal (frutas e vegetais) em detrimento de antioxidantes sintéticos, aquando da elaboração de produtos reestruturados de origem animal (hambúrgueres, salsichas e patés). Para além deste efeito antioxidante, existe uma relação benéfica entre o consumo de frutas e vegetais, ricos em compostos fenólicos e a prevenção de certas doenças. Este trabalho pretende produzir e caracterizar ao nível físico-químico, sensorial e microbiológico um paté elaborado a partir de lapas, com adição do fruto silvestre medronho, bem como a valorização destas matérias-primas ao proporcionar uma mais-valia nutricional/funcional e económica com o desenvolvimento de um produto inovador (paté). Por outro lado, avaliou-se a estabilidade oxidativa do paté em armazenamento refrigerado durante 90 dias bem como a aceitabilidade do mesmo. Sendo assim, produziram-se três tipos de patés inovadores: i) paté de lapa com BHT (PCON), ii) paté de lapa com 3% de medronho (PAU3) e iii) paté de lapa com 6% de medronho (PAU6). Os resultados da avaliação da estabilidade oxidativa (PAU6>PAU3>PCON) confirmam a elevada capacidade do extrato de medronho rico em compostos fenólicos como inibidor eficaz na oxidação lipídica do paté de lapa e com boa aceitação sensorial.

**Palavras-chave:** lapa, medronho, paté, inovação, oxidação lipídica e antioxidantes



## ABSTRACT

---

Limpets *Patella* are gastropods mollusks with an increasing use in human food, being a popular food too much appreciated in several coastal regions of Portugal. According to the chain of seafood, the consumption of fishery products rich in polyunsaturated fatty acids, has replaced the products of terrestrial animals through the filleted products, restructured products and precooked products. Food oxidation is the most important cause in the deterioration of nutritional and sensory quality of fish products. So, in recent years, there has been an increasing utilization of natural antioxidants of vegetable origin (fruits and vegetables) in substitution of the synthetic antioxidants in the preparation of restructured products of animal origin (burgers, sausages and pâtés). In addition to this antioxidant effect, there is a beneficial relationship between the consumption of fruit and vegetable rich in phenolic compounds in the prevention of certain diseases. So this project intends to produce and characterize physical-chemical properties, sensorial analysis and microbiological analysis in one pâté elaborate with limpets and with addition of arbutus wild fruit, as well as valorization of these raw materials to providing the nutritional/functional and economic value to the development of an innovative product (pâté). Furthermore, we evaluated the oxidative stability of pâté in refrigeration for 90 days and its acceptability. Thus, we produced three types of innovative pâtés: i) *Patella* spp. pâté with BHT (PCON), ii) *Patella* spp. pâté with 3% of the *Arbutus unedo* (PAU3) and iii) *Patella* spp. pâté with 6% of the *Arbutus unedo* (PAU6). The results of the evaluation of oxidative stability (PAU6>PAU3>PCON) confirm the high-performance of the *Arbutus unedo* extract rich in phenolic compounds as effective inhibitor in lipid oxidation of the *Patella* spp. pâté and with good sensory acceptability.

**Keywords:** Limpets, *Arbutus unedo*, pate, innovation, lipid oxidation and antioxidants



## ÍNDICE GERAL

---

|   |      |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS .....                            | v    |
| RESUMO .....                                    | vii  |
| ABSTRACT .....                                  | ix   |
| ÍNDICE GERAL .....                              | xi   |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                         | xv   |
| ÍNDICE DE TABELAS .....                         | xvii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....            | xix  |
| 1- INTRODUÇÃO .....                             | 1    |
| 1.1 Qualidade e produtos da pesca.....          | 1    |
| 1.2 Lapa, <i>Patella</i> spp. ....              | 2    |
| 1.3 Oxidação de produtos alimentares .....      | 4    |
| 1.4 Antioxidantes .....                         | 7    |
| 1.4.1 Mecanismos de ação.....                   | 8    |
| 1.4.2 Antioxidantes sintéticos e naturais ..... | 9    |
| 1.4.3 Frutos silvestres “Berries” .....         | 10   |
| 1.4.3.1 Medronho, <i>Arbutus unedo</i> .....    | 11   |
| 2- ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS .....              | 13   |
| 2.1 Enquadramento .....                         | 13   |
| 2.2 Objetivos .....                             | 13   |
| 3- MATERIAIS E MÉTODOS .....                    | 15   |
| 3.1 Desenho experimental.....                   | 15   |
| 3.2 Materiais .....                             | 16   |
| 3.2.1 Reagentes e equipamentos .....            | 16   |
| 3.2.2 Lapas .....                               | 17   |
| 3.2.3 Medronho .....                            | 17   |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.4 Outras matérias-primas .....  | 18 |
| 3.3 Métodos .....   | 18 |
| 3.3.1 Preparação do extrato de medronho .....                                 | 18 |
| 3.3.2 Caraterização físico-química das matérias-primas.....                   | 18 |
| 3.3.2.1 Humidade .....  | 19 |
| 3.3.2.2 Proteína Bruta .....  | 19 |
| 3.3.2.3 Cinzas .....  | 20 |
| 3.3.2.4 Gordura Total .....   | 20 |
| 3.3.2.5 Fibra Total .....   | 21 |
| 3.3.2.6 Acidez.....   | 22 |
| 3.3.2.7 Cor–Medida instrumental .....   | 22 |
| 3.3.2.8 pH .....  | 23 |
| 3.3.2.9 Concentração de sólidos solúveis .....                                | 23 |
| 3.3.2.10 Quantificação de polifenóis totais .....                             | 23 |
| 3.3.2.11 Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil .....  | 24 |
| 3.3.2.12 Capacidade de redução dos radicais de oxigénio .....                 | 26 |
| 3.3.2.13 Hidratos de Carbono.....   | 27 |
| 3.3.3 Elaboração do paté de lapa com adição de medronho .....                 | 27 |
| 3.3.4 Caraterização físico-química dos patés .....                            | 29 |
| 3.3.4.1 Fibra Total .....   | 29 |
| 3.3.4.2 Cor-Medida instrumental.....  | 30 |
| 3.3.4.3 Avaliação da textura .....  | 30 |
| 3.3.4.4 Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....           | 30 |
| 3.3.4.5 Valor calórico .....  | 31 |
| 3.3.5 Análises Microbiológicas .....  | 31 |
| 3.3.5.1 Preparação dos diluentes, meios de cultura e das suspensões-mãe ..... | 32 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.3.5.2 | Microorganismos totais e degradativos .....   | 32 |
| 3.3.5.3 | <i>Escherechia coli</i> .....   | 32 |
| 3.3.5.4 | Enterobacterias .....   | 33 |
| 3.3.5.5 | <i>Listeria monocytogenes</i> .....   | 34 |
| 3.3.5.6 | <i>Salmonella</i> spp.....  | 34 |
| 3.3.6   | Análise Sensorial.....  | 35 |
| 3.3.6.1 | Prova Descritiva-Perfil Sensorial .....   | 35 |
| 3.3.6.2 | Provas Hedónicas (testes de ordenação de preferência e de aceitabilidade) .....     | 36 |
| 3.3.7   | Análise estatística.....  | 36 |
| 4-      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 39 |
| 4.1     | Análises físico-químicas das matérias-primas .....                                  | 39 |
| 4.2     | Otimização do diagrama de fabrico do paté de lapa com adição de medronho.....       | 46 |
| 4.3     | Análises físico-químicas do paté .....  | 46 |
| 4.4     | Avaliação da estabilidade dos patés.....  | 49 |
| 4.5     | Avaliação dos parâmetros da cor nos patés .....                                     | 56 |
| 4.6     | Análises microbiológicas dos patés .....  | 57 |
| 4.7     | Perfil sensorial-Avaliação dos descritores sensoriais dos patés ao longo do tempo . | 59 |
| 4.8     | Perfil sensorial-Avaliação dos descritores dos diferentes patés por tempo .....     | 60 |
| 4.9     | Teste de preferência sensorial .....  | 62 |
| 4.10    | Testes de aceitabilidade sensorial .....  | 63 |
| 5-      | CONCLUSÃO .....   | 67 |
| 6-      | PERSPETIVAS FUTURAS.....  | 69 |
| 7-      | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 71 |
|         | ANEXOS .....  | 77 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.1– Aspeto exterior das lapas, <i>Patella</i> spp. ....   | 3  |
| Figura 1.2– Distribuição geográfica das lapas na costa nacional .....   | 4  |
| Figura 1.3- Fases do processo de oxidação lipídica .....  | 6  |
| Figura 1.4- Oxidação de um ácido gordo insaturado ao longo do tempo.....  | 6  |
| Figura 1.5- Aspeto exterior do medronho, <i>Arbutus unedo</i> .....   | 11 |
| Figura 1.6- Distribuição geográfica do medronho, <i>Arbutus unedo</i> , no continente europeu 11  |    |
| Figura 3.1- Desenho experimental do trabalho .....  | 15 |
| Figura 3.2- Ingredientes para a preparação do paté de lapa com adição de medronho .....   | 29 |
| Figura 4.1- Diagrama de fabrico otimizado para a produção do paté de lapa com adição de medronho .....  | 46 |
| Figura 4.2a- Avaliação da estabilidade dos patés ao longo do tempo.....   | 50 |
| Figura 4.2b- Avaliação da estabilidade dos patés ao longo do tempo.....   | 51 |
| Figura 4.3- Diagrama da análise de componentes principais (PCA) dos patés ao longo do tempo de armazenamento refrigerado .....  | 56 |
| Figura 4.4- Avaliação dos descritores do paté ao longo do tempo.....  | 59 |
| Figura 4.5- Avaliação do Tbars (parâmetro físico-químico) e flavor a ranço (descriptor sensorial – painel de provadores) dos patés ao longo do tempo de armazenamento refrigerado ..... | 60 |
| Figura 4.6- Avaliação dos descritores dos diferentes patés por tempo .....  | 61 |
| Figura 4.7- Avaliação sensorial da preferência dos patés .....  | 63 |
| Figura 4.8- Avaliação da aceitabilidade sensorial dos patés .....   | 64 |



## ÍNDICE DE TABELAS

---

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1.1- Tipos de antioxidantes.....   | 8  |
| Tabela 4.1- Propriedades físico-químicas do medronho .....  | 39 |
| Tabela 4.2- Atividade antioxidante do medronho efetuado a partir de um extrato aquoso.              | 41 |
| Tabela 4.3- Caracterização química da lapa.....   | 44 |
| Tabela 4.4- Caracterização físico-química dos patés no tempo 0 .....                                | 47 |
| Tabela 4.5- Avaliação instrumental da evolução dos parâmetros de cor ao longo do tempo .....        | 57 |
| Tabela 4.6- Análises microbiológicas dos patés ao longo do tempo de armazenamento refrigerado ..... | 58 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

Acid- Acidez total  
Ads- Adesividade  
aprox. - aproximadamente  
BHA- butil-hidroxi-anisol  
BHT- Butil-hidroxilo-tolueno  
Brx- Concentração de sólidos solúveis  
Cal- Valor calórico  
Cin- Cinzas  
DPPH- Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
Dz- Dureza  
FT- Fibra total  
GT- Gordura total  
HC- Hidratos de carbono  
Hum- Humidade  
O<sub>2</sub>- Oxigénio atmosférico  
ORAC- Capacidade de redução dos radicais de oxigénio  
PAU3- Paté de lapa com adição de medronho a 3% (fruto/produto final)  
PAU6- Paté de lapa com adição de medronho a 6% (fruto/produto final)  
PB- Proteína bruta  
PCON- Paté de lapa com adição de butil-hidroxilo-tolueno  
ROO\*- Radicais livres  
ROOH- Reação de transferência de hidrogénio  
ROS- Espécies reativas de oxigénio  
Tbars- Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TPC- Quantificação de polifenóis totais



---

## 1- INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Qualidade e produtos da pesca

Em Portugal, os produtos da pesca e aquacultura têm uma enorme importância, uma vez que é o país da União Europeia que consome mais pescado, atingindo um consumo *per capita* de aproximadamente 57,1 kg/habitante/ano (DGPA, 2007).

A população mundial, em especial nos países mais desenvolvidos opta cada vez mais por adicionar e/ou substituir a proteína animal terrestre pela proteína a partir do pescado por ser mais saudável devido à composição química do pescado, em particular pela presença de ácidos gordos insaturados que são considerados saudáveis para o organismo humano (Trondsen et al., 2004; Domingues & Penteado, 2011; FAO, 2014). Apesar de alguns recursos marinhos escassearem (e.g. lagostim, linguado, bacalhau, pescada, sardinha), estes ainda permitem oferecer ao consumidor uma vasta gama de novos produtos alimentares saudáveis e de fácil preparação, contudo é necessário que a sua valorização/utilização seja eficiente sem pôr em risco o ecossistema (DGPA, 2007). Neste contexto surge assim a necessidade de aproveitar outros recursos marinhos menos explorados, por forma a facilitar a garantia da sustentabilidade e a integridade do meio marinho (DGPA, 2007; Ramirez et al., 2011). Este fato permite considerar uma nova gama de produtos (transformados/restruturados) como uma ótima oportunidade de negócio, valorizando assim, os produtos endógenos e contribuindo para a obtenção de produtos de maior valor acrescentado, possibilitando assim outras alternativas de consumo.

O desenvolvimento de novos produtos alimentares é frequentemente utilizado pelas empresas como estratégia para proporcionar o seu sucesso e consequente expansão, daí que esta estratégia permite ir ao encontro das novas exigências dos consumidores. Este processo de inovação é eficaz com produtos pouco explorados industrialmente e que serão uma alternativa a outros produtos no mercado. Contudo no desenvolvimento de novos produtos não basta apenas ter a ideia, é também necessário delinear todas as fases de conceção, otimizar o processo e caracterizar os produtos em relação às suas propriedades nutricionais, microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, bem como definir o “tempo de prateleira”. Paralelamente é necessário mostrar receptividade e flexibilidade na expansão e evolução do mesmo na cadeia de consumo (Rudolph, 1995; Moskowitz et al., 2009).

De acordo com a fileira do pescado, o consumo de produtos da pesca tem vindo a aumentar através dos produtos filetados, reestruturados e pré-cozinhados (DGPA, 2007).

Esta tendência surge devido às diferentes alterações socioeconômicas que originam um novo estilo de vida, em que as pessoas têm menos tempo para cozinhar e também porque as gerações mais novas estão cada vez mais habituadas ao consumo de alimentos “prontos a consumir” (Moskowitz et al., 2009).

Por outro lado o peixe é um alimento muito perecível (deterioração microbiológica e química) apresentando um “tempo de prateleira” muito curto, surgindo assim a necessidade de aumentar o prazo de validade desta matéria-prima. Uma das possibilidades é através do fabrico de produtos reestruturados e pré-cozinhados, no entanto é necessário manter a qualidade sensorial nutricional e assegurar a segurança alimentar (Moskowitz et al., 2009).

A formulação da receita constitui um passo fundamental já que os ingredientes e respetivas proporções determinarão a qualidade, assim como a prevenção da deterioração do mesmo. Mas, por outro lado, a receita não terá valor se não for aceite organoleticamente pelo público-alvo.

A qualidade alimentar refere-se a um conjunto de atributos relevantes para o consumidor que tornam determinado produto alimentar preferido quando comparado com outros dentro do mesmo género (Leite, 2010). As reações de oxidação de produtos alimentares são um dos fatores mais determinantes na qualidade dos alimentos, principalmente nos de origem animal, pelo que representam uma grande preocupação para a indústria alimentar (Estévez et al., 2006). Os industriais do setor conscientes deste fato têm recorrido à incorporação de antioxidantes na formulação dos diversos alimentos para minimizar estas alterações de qualidade.

Nos últimos anos, tem-se verificado uma crescente utilização de antioxidantes naturais de origem vegetal, aquando da elaboração de produtos reestruturados de origem animal (hambúrguer, salsichas, filetes e patés), uma vez que existe uma relação benéfica, entre o consumo de frutas e vegetais ricos em compostos fenólicos e a prevenção de doenças cancerígenas e cardiovasculares (Ramanathan & Das, 1992; Rice-Evans et al., 1997; Huang et al., 2005; Heinonen, 2007).

## **1.2 Lapa, *Patella* spp.**

As lapas são moluscos do género gastrópode que pertencem à família Patellidae (Brazão et al., 2003). O seu aspeto externo pode observar-se na figura 1.1. Ao nível morfológico, as lapas têm um pé mediano que permite a sua aderência às rochas, possuem

uma concha com função protetora das ondas e de predadores, têm a rádula que funciona como veículo de alimentação das algas marinhas existentes no substrato rochoso da costa e têm as gónadas que funcionam como sistema reprodutor (Lindner, 2000; Domingues & Penteadó, 2011).

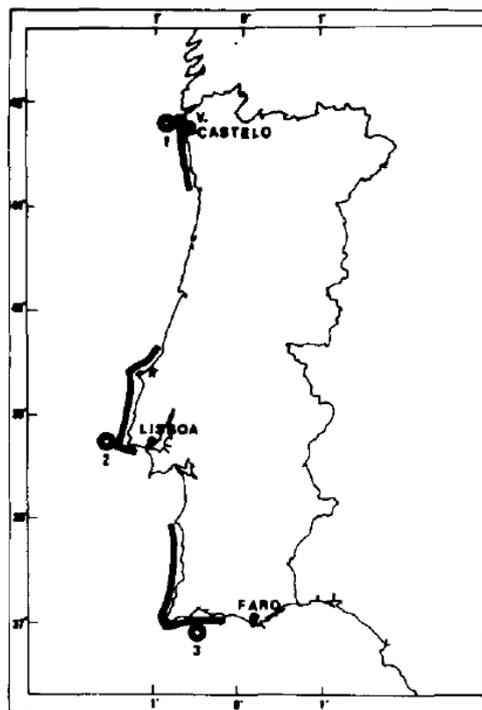


**Figura 1.1**– Aspeto exterior das lapas, *Patella* spp.

Nas praias da costa portuguesa existem quatro espécies diferentes de lapas da família Patellidae: a *Patella depressa* que é a espécie em maior abundância, a *Patella ulyssiponensis*, a *Patella vulgata* e a *Patella rustica* (Boaventura et al., 2002). Estas encontram-se fixas às rochas durante o dia, mas durante a noite movimentam-se para zonas rochosas com abundância em algas (Lindner, 2000; Domingues & Penteadó, 2011). Geralmente, têm preferência por algas vermelhas e verdes como por exemplo a alga verde *Ulva* spp., porém nas primeiras fases de crescimento preferem a alga castanha *Fucus* spp. (Gibson et al., 2001).

A nível gastronómico são muito apreciadas como petisco em várias regiões costeiras de Portugal incluindo arquipélagos (Domingues & Penteadó, 2011). Por este motivo é de todo o interesse realizar um maior número de estudos acerca da caracterização deste molusco, uma vez que há uma tendência de aumento no consumo alimentar. Na costa nacional continental as lapas encontram-se distribuídas de acordo com a figura 1.2 (Guerra & Gaudencio, 1986; Brazão et al., 2003).

A nível nutricional, nomeadamente lípidos, polissacáridos, proteínas, entre outros, apresentam variabilidade devido a vários fatores externos resultantes do meio onde vivem como, tipo de alga na alimentação, época/estação do ano e temperatura ambiente (Morais et al., 2003; Domingues & Penteadó, 2011). Ao nível interno existe variação nutricional nomeadamente devido ao tamanho, sexo, idade e durante a maturação das gónadas (Brazão et al., 2003; Morais et al., 2003; Domingues & Penteadó, 2011).



**Figura 1.2**– Distribuição geográfica das lapas na costa nacional continental (Guerra & Gaudencio, 1986)

O seu conteúdo lipídico tem elevada importância nutricional devido à presença de ácidos gordos polinsaturados ricos em ómega 3, ómega 6 e ómega 9 que produzem vários efeitos benéficos para o consumidor uma vez que não podem ser sintetizados pelo corpo humano, portanto apenas provêm da dieta alimentar e auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares, entre outras (Brazão et al., 2003; Domingues & Penteado, 2011).

### 1.3 Oxidação de produtos alimentares

A oxidação dos principais componentes dos produtos da pesca é a causa mais importante na deterioração da qualidade nutricional e sensorial dos mesmos. Estas reações oxidativas causam alterações irreversíveis na cor, sabor (ranço), flavor e na textura, diminuindo consecutivamente o seu tempo de vida útil, limitando a aceitabilidade por parte do consumidor e podendo originar riscos ao nível de segurança alimentar (Ames et al., 1993; Medina et al., 2009; Sampels, 2013).

No caso de produtos da pesca ricos em ácidos gordos insaturados existe maior suscetibilidade de oxidação devido às ligações insaturadas, daí ser necessário haver condições específicas de utilização de ingredientes, de processamento e de armazenamento. Neste caso, os principais substratos do processo de oxidação são os ácidos

gordos, nomeadamente os insaturados, uma vez que as ligações duplas são centros ativos que podem reagir com o oxigénio atmosférico, daí que o número de ligações duplas e o tamanho da cadeia lipídica influenciam a velocidade do processo oxidativo (Rahman, 2007; Sampels, 2013). Outros substratos, como os carotenoides e a vitamina A, também podem sofrer processos oxidativos, que estão associados à perda de cor e do valor nutritivo, como consequência da perda de ácidos gordos essenciais (Pereda, 2005).

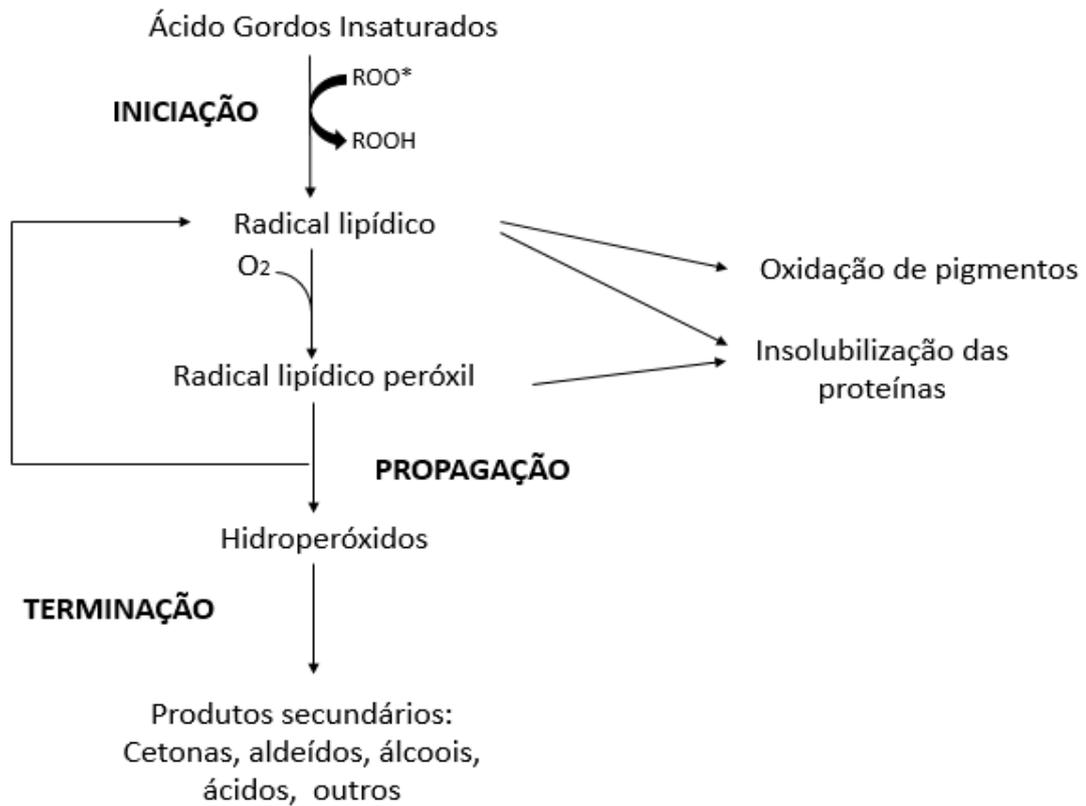
A utilização adequada de metodologias de processamento e armazenamento dos produtos da pesca leva a que haja um aumento do seu consumo uma vez que a adição de antioxidantes a substratos ricos em ácidos gordos insaturados é eficaz, oferecendo assim ao consumidor um produto seguro, nutritivo e que ajuda na prevenção de doenças cardiovasculares (Ramanathan & Das, 1992; Gray et al., 1996; Kamal-Eldin & Pickova, 2008; Medina et al., 2009; Nielsen & Jacobsen, 2013).

Os principais fatores que promovem a oxidação lipídica são a quantidade e o tipo de óleo adicionado, a temperatura de armazenamento, a exposição do produto a oxigénio e à luz, a presença de iões metálicos, as propriedades intrínsecas da própria matéria-prima (grau de insaturação e tipo de ácido gordo), a atividade da água do produto e a ausência de antioxidantes (Nielsen & Jacobsen, 2013).

A autooxidação é considerada a principal via de oxidação lipídica em alimentos e é uma combinação de várias reações em cadeia que consistem em três etapas básicas: iniciação, propagação e terminação (figura 1.3), que se desenvolvem simultaneamente excetuando o passo inicial (Fennema, 1996; Frankel, 1998).

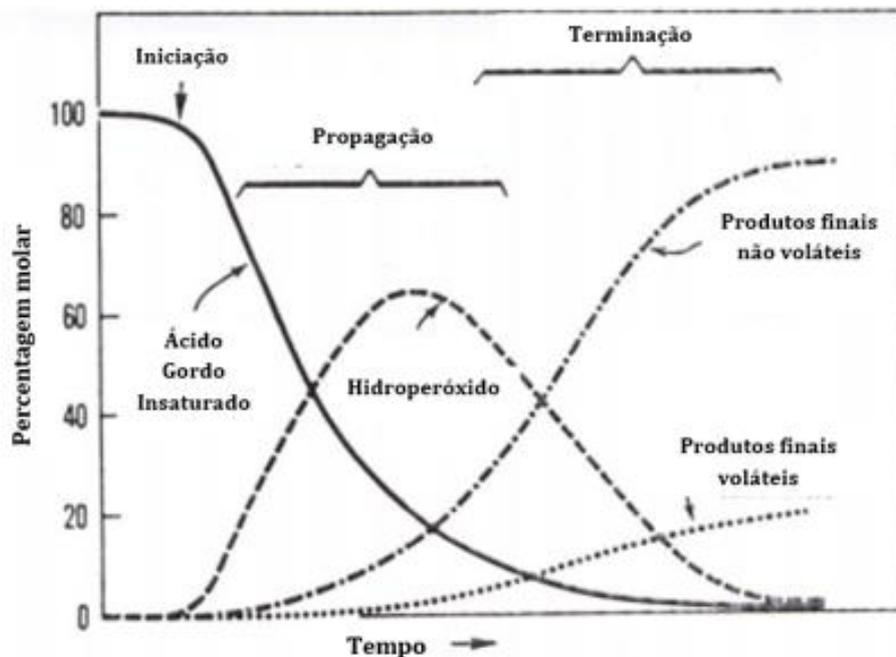
Na iniciação os ácidos gordos insaturados são facilmente oxidados pelas espécies reativas de oxigénio (ROS), ou seja, radicais livres combinados com oxigénio e formam produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) conferindo alterações da cor no produto. Na propagação, os radicais livres funcionam como propagadores da reação e aceleram a formação dos peróxidos/hidroperóxidos. Neste passo a maior parte dos ácidos gordos insaturados são oxidados (Pastoriza et al., 1980; Huang et al., 2005).

Por fim, na fase de terminação os radicais livres derivados da decomposição dos produtos primários combinam-se e formam produtos secundários (estáveis) como ácidos carboxílicos, alcanos, aldeídos, álcoois e cetonas, originando sabores e odores desagradáveis indicando a presença de ranço (Pastoriza et al., 1980; Frankel, 1998; Huang et al., 2005; Ganhão et al., 2010).



**Figura 1.3-** Fases do processo de oxidação lipídica (baseado em Pastoriza et al., 1980 e Frankel, 1998)

A figura 1.4 evidencia a oxidação lipídica de um ácido gordo insaturado ao longo do tempo.



**Figura 1.4-** Oxidação de um ácido gordo insaturado ao longo do tempo (baseado em Sampels, 2013)

Para assegurar a qualidade dos produtos da pesca e seus derivados durante o seu processamento/armazenamento recorre-se à utilização de antioxidantes, que embora não aumentem a qualidade, mantêm-na, ao prevenir a oxidação de compostos lipídicos e proteicos, contudo o poder antioxidante depende da concentração e do tipo de antioxidantes (Viljanen et al., 2004; Apak et al., 2007; Heinonen, 2007; Medina et al., 2009; Ganhão et al., 2010; Sampels, 2013).

Normalmente, para avaliar a oxidação lipídica dos produtos alimentares são realizados alguns testes: índice de peróxidos, índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, avaliação da cor, análise de compostos voláteis derivados dos lípidos, entre outros (Estévez et al., 2007; Sánchez-Zapata et al., 2011; Ganhão et al., 2011).

#### **1.4 Antioxidantes**

Os antioxidantes representam substâncias presentes nos alimentos de forma natural ou que são adicionados intencionalmente por forma a retardar fenómenos de oxidação, mantendo intatas as características sensoriais e funcionais do produto (Huang et al., 2005; Koleva, 2007; Heinonen, 2007).

A concentração de antioxidantes no alimento é de grande interesse, já que na maior parte dos casos exercem proteção quanto maior for a sua concentração. Outros alimentos, porém, têm concentração ótima, acima da qual os antioxidantes comportam-se como agentes pro-oxidantes (exercem stress oxidativo), portanto o poder antioxidante nos produtos alimentares depende de uma série de fatores como a concentração do antioxidante, os ingredientes a utilizar, o meio envolvente, a presença de óleos, o processamento, entre outros (Heinonen, 2007; Rahman, 2007).

Na indústria alimentar a quantidade de antioxidante sintético adicionada situa-se em torno de 0,01% em relação à gordura do alimento e de 0,025% quando se utiliza uma mistura de antioxidantes, na qual nenhum dos componentes deve ultrapassar os 0,01% (Rahman, 2007).

A incorporação dos antioxidantes deve ser feita no início da oxidação, pois, se a quantidade de peróxidos for relativamente elevada, o efeito protetor é anulado. Tal efeito é limitado quando o alimento é rico em iões/catalisadores metálicos (Pereda, 2005; Huang et al., 2005; Heinonen, 2007). Os antioxidantes que se adicionam aos alimentos devem cumprir uma série de requisitos: não causar efeitos fisiológicos negativos, não alterar

cores, odores nem sabores anómalos, serem eficazes a baixas temperaturas, lipossolúveis e resistentes a outros tratamentos a que o alimento seja submetido, além disso, devem ser de fácil obtenção, ativos em baixas concentrações e económicos (Pereda, 2005; Huang et al., 2005; Heinonen, 2007).

Geralmente, para avaliar a capacidade antioxidante são realizados dois tipos de testes: a quantificação de polifenóis totais e a avaliação da atividade antioxidante (capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e a capacidade de redução dos radicais de oxigénio (ORAC), entre outros) (Heinonen, 2007; Malheiro et al., 2012).

#### 1.4.1 Mecanismos de ação

A ação dos antioxidantes nos produtos deve-se fundamentalmente à proteção de macromoléculas suscetíveis a processos de oxidação.

No caso da macromolécula dos lípidos, nomeadamente os ácidos gordos insaturados, os antioxidantes funcionam como agentes de prevenção da oxidação lipídica, protegendo os lípidos do contacto com precursores do processo oxidativo, paralisando a fase de propagação (Rahman, 2007). Relativamente ao mecanismo de ação os antioxidantes podem se classificar de acordo com a tabela 1.1.

**Tabela 1.1-** Tipos de antioxidantes (baseado em Rice-Evans et al., 1997; Kahkonen et al., 2001; Pereda, 2005; Rahman, 2007).

| Grupo de compostos      | Mecanismo de ação                                    | Exemplos   |
|-------------------------|--|--|
| Primários               | Reação com radicais livres                           | Galato de propilo, tocoferóis, compostos fenólicos |
| Agentes biológicos      | Remoção de peróxidos                                 | Glutathione peroxidase                             |
| Sinergistas             | Regeneração dos antioxidantes                        | Palmitato ascorbilo, ácido ascórbico               |
| Supressores de oxigénio | Transformação do oxigénio simples em oxigénio triplo | Carotenos  |
| Agentes quelantes       | Ligação de metais pesados a complexos inativos       | Polifosfatos, ácido cítrico                        |

Os antioxidantes primários são de origem natural e correspondem maioritariamente a compostos fenólicos que ajudam na inativação dos radicais livres provenientes das fases de iniciação e propagação da oxidação lipídica, através da cedência de átomos de hidrogénio, inibindo o processo de oxidação e formando radicais inertes (Rahman, 2007).

Os antioxidantes biológicos correspondem a enzimas que removem compostos altamente reativos da matriz do alimento. Os antioxidantes sinergistas são compostos como o ácido ascórbico, que combinados geralmente com antioxidantes primários por forma a estimular a atividades dos últimos (Rice-Evans et al., 1997; Kahkonen et al., 2001). Os antioxidantes supressores de oxigénio são compostos, como os carotenos, que sequestram o oxigénio presente no meio, tornando-o indisponível para processos de oxidação. Os agentes quelantes efetuam a ligação de metais pesados, como o ferro e o cobre, a complexos inativos, inibindo a disponibilidade destes para realizar processos de oxidação lipídica. Grande parte dos agentes quelantes são provenientes de antioxidantes naturais, como os frutos silvestres que têm na sua composição ácido cítrico que funciona como um composto que promove a ligação dos metais pesados (ferro, cobre, entre outros) a substâncias inertes prevenindo a oxidação lipídica (Rice-Evans et al., 1997; Pereda, 2005; Rahman, 2007).

#### **1.4.2 Antioxidantes sintéticos e naturais**

Na indústria alimentar são utilizados antioxidantes sintéticos e naturais, no entanto nas últimas décadas tem existido uma preocupação crescente com a utilização de antioxidantes sintéticos. Os antioxidantes sintéticos correspondem àqueles que são sintetizados industrialmente através de processos químicos, onde os mais utilizados na indústria alimentar são: o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxil-tolueno (BHT) e o galato de propilo. Vários estudos indicam que estes antioxidantes são considerados como tóxicos, uma vez que contêm propriedades cancerígenas e provocam o risco de alergias (Rice-Evans et al., 1997; Rahman, 2007).

Devido a estes fatores, estes antioxidantes têm vindo a ser substituídos na indústria alimentar por antioxidantes naturais, em particular por antioxidantes de origem vegetal que ajudam a inibir ou controlar a oxidação lipídica, uma vez que provêm de forma natural e são seguros para o consumidor pois não são tóxicos e apresentam uma ação benéfica a nível de saúde e bem-estar, contribuindo em alguns casos como ingredientes funcionais

(Ganhão et al., 2010). Por outro lado, a preferência dos consumidores por ingredientes naturais é hoje evidente, já que os considera mais seguros, mais saudáveis e menos sujeitos a perigos para a saúde quando comparados com os produtos de síntese (Rice-Evans et al., 1997; Pereda, 2005; Estévez et al., 2007; Ganhão et al., 2010). Grande parte dos antioxidantes naturais utilizados na indústria alimentar derivam de plantas como o alecrim, o rosmaninho e salva, porém existem outras fontes ricas em antioxidantes como os citrinos e os frutos silvestres (Estévez et al., 2006).

Contudo os antioxidantes naturais podem apresentar algumas desvantagens nomeadamente devido à possibilidade de atribuir cor ou odor ao alimento e, dependendo do tipo de compostos, pode ser necessário realizar várias extrações para que estes sejam eficientes (Koleva, 2007).

### **1.4.3 Frutos silvestres “Berries”**

Os frutos silvestres (frutos vermelhos ou “berries”) são uma das mais importantes fontes de compostos fenólicos na nossa dieta, especialmente de antocianinas, flavonoides, catequinas e taninas, porém a sua composição varia com uma série de fatores como o seu estado de maturação, localização, clima, luz e humidade. Por outro lado a eficiência da extração de cada composto fenólico depende do tipo de solvente e método utilizado na extração do mesmo (Kahkonen et al., 2001; Heinonen, 2007; Ganhão et al., 2010; Malheiro et al., 2012).

Na indústria alimentar os solventes mais utilizados na extração de compostos são a água e o etanol, porém este último requer posteriormente uma etapa de evaporação.

Os compostos fenólicos apresentam uma ampla variedade de efeitos biológicos benéficos como poder antioxidante, anti-microbiano, anti-inflamatório, entre outros (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Kahkonen et al., 2001; Heinonen, 2007; Barros et al., 2010).

Segundo Kahkonen et al. (2001), os frutos silvestres exercem elevado poder antioxidante em lípidos envolvidos em meio hidrofílico como o caso das emulsões. Diferentes estudos científicos demonstraram que a sua utilização permite prolongar o “tempo de prateleira” em grande parte de produtos perecíveis, sendo que alguns frutos que exercem este poder são, por exemplo a framboesa, mirtilo, morango, cerejas, azaroleiro, rosa-do-cão, estribo-bravo, abrunho-bravo, amora e medronho (Heinonen, 2007; Ganhão et al., 2010).

### 1.4.3.1 Medronho, *Arbutus unedo*

O medronho, *Arbutus unedo*, pertence ao grupo dos frutos silvestres e encontra-se dentro da família das Ericaceae. Normalmente apresenta um diâmetro aproximado de 2 cm, são granulados, apresentam um tom avermelhado quando estão maduros (figura 1.5) e são saborosos (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Pallauf et al., 2008; Malheiro et al., 2012; Alves, 2012).



**Figura 1.5-** Aspeto exterior do medronho, *Arbutus unedo*

Em Portugal encontra-se praticamente em todas as zonas do país daí ser um produto regional, tradicional e cultural. Na Europa predominam abundantemente junto ao Mar Mediterrâneo (figura 1.6).



**Figura 1.6-** Distribuição geográfica do medronho, *Arbutus unedo*, no continente europeu (Alves, 2012)

A sua utilização, preservação e valorização no país é considerada fundamental uma vez tratar-se de um produto cultural e social, e é utilizado na elaboração de produtos tradicionais como a “aguardente de medronho”, por ser um produto regional a sua produção é fulcral e deve ser incentivada geração após geração por forma a evitar a sua perda (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Alves, 2012; Malheiro et al., 2012).

Na indústria alimentar os medronhos são utilizados na produção de bebidas alcoólicas destiladas, uma vez que apresentam um aroma e flavor agradável, contudo também são utilizados noutros produtos como marmeladas, doces, ou até mesmo em iogurtes (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Heinonen, 2007; Barros et al., 2010; Alves, 2012; Malheiro et al., 2012).

Ao nível nutricional, o medronho apresenta baixo teor de gordura, porém é bastante rico em ácidos gordos polinsaturados, onde os mais abundantes são: o ácido linolénico (ômega 3) e o ácido linoleico (ômega 6), todavia também se encontram presentes alguns ácidos gordos saturados, como o ácido palmítico (Helbig, 2008; Barros et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Alves, 2012). Os ácidos gordos polinsaturados são essenciais e não são sintetizados pelo organismo humano, portanto a sua ingestão é fundamental, uma vez que diminuem teores de colesterol no sangue e reduzem o risco de doenças cardiovasculares (Barros et al., 2010).

Estudos recentes indicam que o medronho apresenta elevada capacidade antioxidante quando adicionado a alimentos de origem animal uma vez que apresentam elevada composição de compostos fenólicos, vitaminas A e C, carotenoides, ácido cítrico, entre outros (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Ozcan & Haçiseferogullar, 2007; Pallauf et al., 2008; Barros et al., 2010; Ganhão et al., 2010; Alves, 2012).

## 2- ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

---

### 2.1 Enquadramento

Este trabalho desenvolveu-se no âmbito do projeto “LAPA– Lapa para aquacultura e para paté” apoiado pelo PROMAR/GACoeste, acção nº 3.5, Julho de 2012, eixo de Promoção e valorização gastronómica dos produtos da pesca. O projeto “LAPA” divide-se em dois itens diferentes: (1) produção das lapas *Patella* spp., em cativeiro e (2) elaboração de paté de lapa, *Patella* spp. com adição de medronho, *Arbutus unedo*. No projeto “LAPA” ambos os itens foram desenvolvidos em simultâneo, uma vez que seria de todo o interesse encontrar uma alternativa viável para a produção da matéria-prima principal envolvida no desenvolvimento do novo produto de modo a evitar a degradação do ecossistema e ao mesmo tempo proporcionar ao consumidor uma proposta inovadora na gama dos patés e cremes de barrar.

O medronho é utilizado como antioxidante natural em substituição do sintético (BHT) uma vez que também retarda/previne a oxidação e apresenta benefícios ao nível de saúde humana.

### 2.2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi a elaboração e a caracterização de um paté elaborado a partir de lapas, *Patella* spp., com adição de frutos vermelhos nomeadamente o medronho, *Arbutus unedo*. Isto permitirá também valorizar as lapas e o medronho, para assim proporcionar uma mais-valia nutricional/funcional e económica com o desenvolvimento de um produto inovador (paté).

Por forma a atingir o objetivo principal estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- Caracterização físico-química das matérias-primas principais: lapas e medronho;
- Otimização da formulação do paté de lapa com adição de duas concentrações de medronho;
- Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial dos patés;
- Avaliação da estabilidade oxidativa dos patés ao longo do tempo de armazenamento.



### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho experimental

A figura 3.1 representa o procedimento geral realizado durante o presente trabalho.

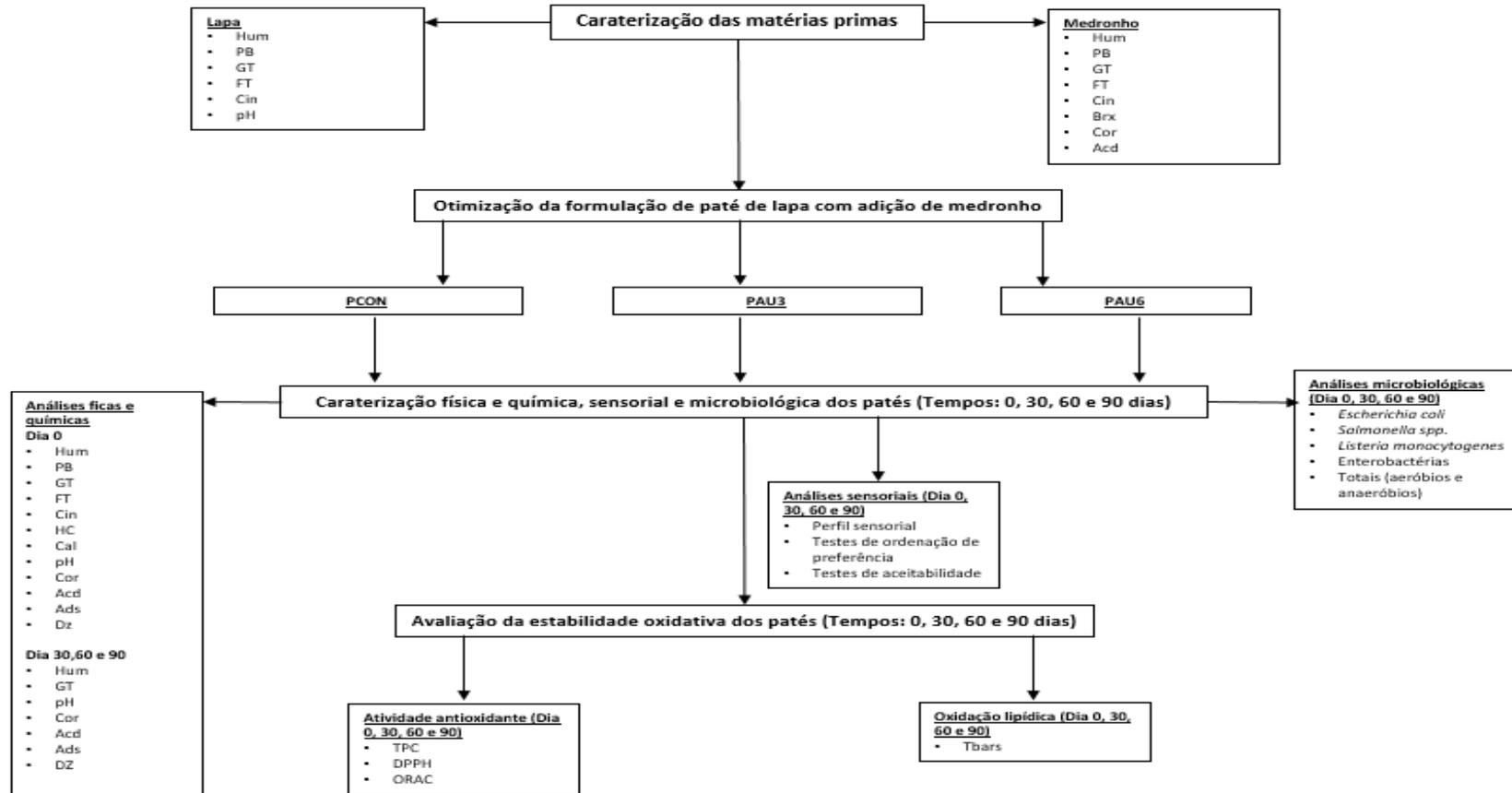


Figura 3.1- Desenho experimental do trabalho

Na realização das análises do paté referentes à “caracterização física e química, sensorial e microbiológica dos patés” referidas na figura 3.1, houve a necessidade de seguir uma sequência específica de modo a não pôr em causa a saúde dos provadores, evitar perdas de amostra e influência de condições externas após abertura dos frascos. Assim, realizaram-se primeiro as análises microbiológicas, depois as físico-químicas e por último as sensoriais.

## 3.2 Materiais

Esta secção engloba todos os reagentes, equipamentos e matérias-primas utilizadas ao longo deste trabalho.

### 3.2.1 Reagentes e equipamentos

Os reagentes utilizados durante o presente trabalho possuem grau de pureza exigida para não interferir nas análises (p.a.) e são das seguintes marcas: Pronalab (Portugal), Panreac (Espanha), Merck (Alemanha), Scharlau (Espanha), Fisher Scientific (Inglaterra), VWR Prolabo Chemicals (Bélgica), ACROS Organics (Bélgica), Sigma-Aldrich (Estados Unidos), Bio-Rad (Estados Unidos) e Oxoid (Inglaterra).

Os equipamentos utilizados foram os seguintes:

- Agitador vortex (Velpr Científica)
- Autoclave (Steam Sterlizer, Raypa)
- Balança analítica (Explorer Pro- EP213, OHAUS) (incerteza – 0,001 g)
- Banho termostático (GD 120, Grant Instruments)
- Bomba de vácuo (Neuberger)
- Centrifugadora (Centrifuge 5804R, Eppendorf)
- Colorímetro (Chroma Meter CR-400, Konic Minolta)
- Contador de unidades formadoras de colónias (Colony Counter SC6, Stuart)
- Cuba (ENS Mini Cuve 3,5L R8E, Robot coupe)
- Cutter (R8 V.V, Robot coupe)
- Destilador (Foss Kjeltex 2010, Tecator Technology)
- Digestor (Digestor 2006 Foss, Tecator Technology)
- Espectrofotómetro (Helios  $\alpha$ , Thermo Electron Corporation)
- Estufa de secagem (WTB 7200, Binder)

- Estufas para microbiologia (Hot line, Binder)
- Evaporador rotativo de vácuo (Laborota 4000, Heidolph)
- Fogão elétrico (Booster, Ariston)
- Forno elétrico misto 400V/50Hz (MM 100 E Ecomix, Foinox)
- Refrigerador (CS 234020, Beko)
- Homogeneizador (Bagmixer 400P, Stomacher)
- Leitor de fluorescência (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek)
- Liofilizador (Scanvac, Coolsafe)
- Manta de aquecimento para balões de 500 ml (Fibroman-C, SELECTA)
- Medidor de pH (SP70P, SympHony)
- Muffla (Controller B170, Nabertherm)
- Placa de agitação magnética com aquecimento (Velp Scientifica)
- Refratômetro (Handheld Refractometer 0-32% Brix (ATC), VWR International)
- Sonda cilíndrica (10mm Cyl. Debrin, Stable MicroSystems)
- Texturômetro (TA.XT.Plus Texture Analyser, Stable MicroSystems)
- Ultracongelador (Forma -86C Ult Freezer, Thermo Electron Corporation)

### 3.2.2 Lapas

As lapas foram recolhidas na praia do Portinho da Areia Norte em Peniche, Portugal, durante o mês de Junho de 2014. Para as remover das rochas utilizou-se uma espátula e posteriormente foram transportadas sob condições de refrigeração para o laboratório onde foram preparadas.

A sua preparação inclui uma série de etapas sequenciais: lavagem com água salgada, remoção da casca com auxílio de uma faca, remoção de possíveis partículas (fragmentos de casca e areia) com o passador, nova lavagem com água salgada, escorrimento do miolo durante aproximadamente 30 segundos com o passador, pesagem, embalagem a vácuo e armazenamento em ultracongelação a -80°C até sua posterior utilização.

### 3.2.3 Medronho

O medronho foi colhido durante os meses de Outubro e Novembro na região Oeste (Caldas da Rainha) de Portugal. A apanha foi realizada com bastante cuidado, por forma a não danificar o fruto e evitar a presença de corpos estranhos como folhas e terra.

Os frutos foram levados para o laboratório sob condições de refrigeração, onde se procedeu à remoção de frutos danificados e limpeza de pequenos fragmentos como terra e folhas. De seguida os frutos foram pesados e colocados em sacos para embalagem a vácuo, finalmente foram armazenados em ultracongelação a  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

### **3.2.4 Outras matérias-primas**

Durante a elaboração do paté foram utilizadas outras matérias-primas como: óleo de girassol da marca *Fula* e flocos de puré de batata da marca *Maggi* e butil-hidroxil-tolueno (BHT) da marca *ACROS Organics*.

## **3.3 Métodos**

Nesta secção está incluída toda a metodologia relativa a análises físico-químicas, sensoriais e microbiológicas, assim como todo o processamento dos patés.

### **3.3.1 Preparação do extrato de medronho**

O extrato de medronho foi preparado de acordo com o método utilizado por Ganhão et al. (2010), com algumas modificações. Em resumo, cortou-se e triturou-se os frutos em pequenos pedaços, pesou-se 30 g de fruto, dispôs-se em tubos falcon e deixou-se a liofilizar durante 2 dias. Posteriormente procedeu-se à homogeneização da amostra seca (pesada) em 300 ml de solvente (água) com auxílio do vortex, o homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm, durante 10 minutos a  $6^{\circ}\text{C}$  e, o sobrenadante foi filtrado por papel de filtro nº4. O *pellet* foi reutilizado para nova extração seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Finalmente, juntou-se todo o filtrado, isto é as duas quantidades de sobrenadante, armazenou-se em condições de refrigeração e analisou-se em menos de 24 horas após sua preparação. Este extrato foi preparado para determinar o TPC e a atividade antioxidante *in vitro*, DPPH e ORAC.

### **3.3.2 Caracterização físico-química das matérias-primas**

As matérias-primas analisadas durante o presente estudo foram a lapa e a medronho. No caso do medronho os parâmetros físico-químicos analisados foram a Humidade, Proteína Bruta, Gordura Total, Fibra Total, Cinzas, Concentração de Sólidos Solúveis, pH, Cor, Acidez, Capacidade de Redução do Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, Capacidade de Redução dos Radicais de Oxigénio e Quantificação de Polifenóis Totais.

Quanto à lapa foram analisados a Humidade, Proteína Bruta, Gordura Total, Cinzas e Hidratos de Carbono.

### 3.3.2.1 Humidade

O teor de humidade (Hum) das amostras foi realizado segundo o método descrito em AOAC (2000). O procedimento consistiu na pesagem aproximada de 5 g de amostra fresca triturada em um cadinho de porcelana (previamente seco na estufa a 60°C durante 5 horas). De seguida, as amostras foram secas na estufa a 105°C por um período de 8 horas. Após a secagem, as amostras foram colocadas no exsicador e pesadas até obtenção de peso constante. O teor de humidade é determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{Hum} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100 \quad (\%)$$

m1- massa da toma da amostra, em g

m2- massa da amostra seca, em g

### 3.3.2.2 Proteína Bruta

O teor de proteína bruta (PB) foi determinado através do método de Kjeldhal, segundo a NP 4488 (2009). O método consistiu na pesagem de 2 g de amostra fresca triturada para um tubo de digestão juntamente com 25 ml de ácido sulfúrico concentrado e 2 pastilhas de catalisador Kjeldhal. Os tubos foram colocados no digestor por forma a ocorrer a completa digestão da amostra, para tal primeiro a temperatura foi regulada para 220°C durante 30 minutos e depois 400°C durante 90 minutos e deixou-se arrefecer os tubos à temperatura ambiente, após esta etapa o líquido resultante apresentou-se transparente.

Após o arrefecimento, são adicionados 50 mL de água destilada à amostra digerida, é colocada no destilador de Kjeldhal, ajusta-se o equipamento para que o volume de NaOH a 40% (m/V) a adicionar seja de 50 ml e procede-se à destilação por um período de 6 minutos com uma solução recetora de ácido bórico a 40% (m/V), onde foram adicionadas algumas gotas dos indicadores (vermelho de metilo e verde de bromocresol), o pH desta solução é acertado para 4.8.

Finalmente, foi realizada a titulação do destilado com uma solução padrão de HCl a 0,1N, ou seja até aparecimento da cor azul-acinzentado. Em paralelo, é realizado o ensaio em branco seguindo a mesma técnica, porém sem a amostra. O volume de titulante gasto por cada

ensaio é utilizado para a determinação do teor de azoto total. O fator de conversão utilizado para a sua conversão em proteína bruta é de 6,25. O teor de proteína bruta é determinado pela seguinte equação:

$$\%PB = \frac{0,014 * (V1 - V2) * N}{m} * 100 \quad (\%)$$

V1- volume de HCl gasto na titulação da amostra, em ml

V2- volume de HCl gasto na titulação do ensaio branco, em ml

N- normalidade da solução de HCl

m- massa da toma da amostra, em g

### 3.3.2.3 Cinzas

O teor de cinzas (Cin) foi determinado de acordo com a NP 2032 (1988). O método consistiu na pesagem de 5 g de amostra fresca triturada para cadinhos de porcelana (previamente secos na estufa a 60°C durante 5 horas), de seguida foram colocados na mufla à temperatura de 525°C por um período de 5 horas (a amostra não foi imediatamente sujeita a 525°C, primeiro foi realizada uma curva de aquecimento suave até 525°C durante aproximadamente 3 horas para evitar o choque térmico da amostra). Por fim, as amostras foram arrefecidas no exsiccador até obtenção de peso constante. O teor de cinzas é dado pela equação seguinte:

$$\%cin = \frac{m3 - m1}{m2 - m1} * 100 \quad (\%)$$

m1- massa do cadinho vazio, em g

m2- massa do cadinho com toma da amostra, em g

m3- massa do cadinho com amostra incinerada, em g

### 3.3.2.4 Gordura Total

O teor de gordura total (GT) foi determinado de acordo com o método de Bligh & Dyer (1959), com algumas modificações. Resumidamente, o método consistiu na dissolução de 5 g de amostra fresca triturada com uma mistura de 15 ml de metanol/clorofórmio à proporção de (2:1) em vortex até a mistura apresentar um aspeto esbranquiçado. De seguida, a esta mistura é adicionada uma solução saturada de cloreto de sódio e procede-se a nova agitação, depois

foram adicionados 5 ml de água ultrapura e 5 ml de clorofórmio e voltou-se a agitar e, finalmente efetuou-se a centrifugação a uma temperatura de 4°C durante 10 minutos, a velocidade de 6000 rpm.

Posteriormente, o sobrenadante (fase aquosa) foi removido cuidadosamente e descartado. Quanto à fase orgânica foi transferida e filtrada por uma micropipeta contendo algodão e sulfato de sódio anidro para balões periformes previamente tarados. Por fim, o solvente foi removido com auxílio do rotavapor a 40°C sob sistema de vácuo, restando apenas a gordura da amostra. A evaporação é completa quando a amostra resultante se aparentar viscosa. O teor de gordura é dado pela seguinte equação:

$$\% \text{GT} = \frac{m1 - m2}{m3} * 100 \quad (\%)$$

m1- massa do balão periforme contendo amostra final, em g

m2- massa do balão periforme vazio, em g

m3- massa da toma da amostra, em g

### 3.3.2.5 Fibra Total

A determinação do teor de fibra total (FT) foi realizada de acordo com o método descrito em AOAC (2000). Para este método é necessário que a amostra se encontre previamente seca (etapa realizada na estufa a 105°C durante 8 horas) e sem gordura (caso o teor de gordura seja superior a 5%, no caso do medronho como o seu teor de gordura é inferior a 5% não houve a necessidade de realizar esta etapa).

De seguida, pesou-se 1 g de amostra seca e moída, foram adicionados 150 ml de ácido sulfúrico a 1,25%, procedeu-se à digestão ácida numa placa de aquecimento com agitação durante 30 minutos após início da ebulição e filtrou-se o líquido resultante com auxílio da bomba de vácuo por um papel de filtro nº4.

Depois foi realizada a digestão em meio alcalino com 150 ml de hidróxido de sódio a 1,25% do resíduo resultante da digestão ácida também durante 30 minutos após início da ebulição e voltou-se a filtrar o líquido resultante, porém neste caso a filtração foi realizada no cadinho filtrante de porosidade 8 µm.

Posteriormente, as amostras foram secas na estufa a 105°C durante aproximadamente 8 horas e colocadas no exsiccador até obtenção de peso constante, por fim estas são incineradas

na mufla a 505°C durante aproximadamente 5 horas até obtenção de um aspeto tipo cinza e colocadas no exsiccador até peso constante. O teor de fibra total é dado pela seguinte equação:

$$\%FT = \frac{m1 - m2}{m3} * 100 \quad (\%)$$

m1- massa da amostra seca na estufa, em g

m2- massa da amostra incinerada, em g

m3- massa da toma da amostra, em g

### 3.3.2.6 Acidez

O teor de acidez (Acd) foi determinado através do método titrimétrico de acordo com a NP 903 (1987). A técnica consistiu na dissolução de 6 g de amostra triturada em um volume de 150 ml de uma mistura dissolvente constituída por éter etílico e etanol à proporção 1:1, neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1N.

De seguida, adicionou-se algumas gotas de uma solução de fenolftaleína e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 N, ou seja até aparecimento de cor rosado persistente. O teor de acidez é dado pela seguinte equação:

$$\%Acd = \frac{5,611 * V}{m} \quad (\%)$$

V- volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, em ml

m- massa da toma da amostra, em g

### 3.3.2.7 Cor–Medida instrumental

A medição da cor foi realizada diretamente pela leitura do sistema de coordenadas Cielab (L\*, a\* e b\*) recorrendo ao aparelho de medição de cor, colorímetro, cuja área que permite efetuar a leitura da amostra tem 8 mm de diâmetro.

Antes de efetuar a leitura das amostras foi necessário calibrar o equipamento com uma cerâmica branca. A coordenada L\* representa a luminosidade e varia de 0 (preto) a 100 (claro), a coordenada a\* varia de -80 (verde) a +100 (vermelho) e a coordenada b\* varia de -50 (azul) a +70 (amarelo). De seguida, a amostra fresca triturada foi espalhada numa caixa de Petri onde foram realizadas as três medições à temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) com iluminante D<sub>65</sub> e a um ângulo de inclinação de 0°C.

### 3.3.2.8 pH

O pH foi medido diretamente na amostra sem qualquer diluição da mesma com auxílio do medidor de pH. O método consistiu na colocação cuidadosa da amostra fresca triturada numa célula específica de modo a evitar bolsas de ar para posterior medição do pH.

### 3.3.2.9 Concentração de sólidos solúveis

A concentração de sólidos solúveis (Brx) foi realizada com auxílio do refratômetro manual. O método consistiu na elaboração de um sumo de medronho recorrendo a um espremedor manual, no qual foram colocadas algumas gotas no refratômetro para efetuar as leituras.

### 3.3.2.10 Quantificação de polifenóis totais

A quantificação de polifenóis totais (TPC) foi realizada de acordo com o método de Follin-Ciocalteu, segundo Yu et al. (2002), com algumas modificações. Para tal é necessário realizar a extrapolação da amostra com uma curva padrão de ácido gálico efetuada a partir de 5 concentrações definidas.

Quanto à amostra, esta provém do extrato de medronho realizado no ponto 3.3.1, cuja amostra proveniente é dissolvida em água destilada a uma concentração definida (por forma a que os valores da amostra estejam dentro da curva padrão de ácido gálico).

Resumidamente, o método consiste na adição de 790 µl de água destilada, 10 µl de amostra e 50 µl de reagente de Follin-Ciocalteu num eppendorf protegido da luz para posterior homogeneização da mistura em vortex.

Após 2 minutos, são adicionados 150 µl de carbonato de sódio a 20% (m/V) e realiza-se nova homogeneização. De seguida, incubou-se a mistura no escuro por um período aproximado de uma hora.

Ao mesmo tempo deve ser realizada uma mistura semelhante à anterior substituindo o reagente de Follin-Ciocalteu por água destilada de modo a verificar qual o valor da absorvância que deriva da cor da amostra.

Tendo todas as soluções feitas, procedeu-se às suas leituras da absorvância no espectrofotómetro a comprimento de onda de 755 nm. A determinação dos polifenóis totais é dado pelos seguintes passos:

1º Realização da curva padrão de ácido gálico, onde:

$$y = mx + b$$

y- absorvância da solução

x- concentração de polifenóis totais, em mm de ácido gálico/g de solução

2º Descontar absorvância proveniente da cor das amostras

$$\text{Abs} = \text{abs1} - \text{abs2}$$

Abs- absorvância real da amostra

abs1- absorvância da amostra com reagente de Follin-Ciocalteu

abs2- absorvância proveniente da cor da amostra (sem Follin-Ciocalteu)

3º Determinação da concentração de polifenóis totais da amostra

$$\text{TPC} = \frac{\left(\frac{y-b}{m}\right) * d1 * 100}{d2} \quad (\text{mg de ácido gálico}/100 \text{ g de fruto fresco})$$

y- absorvância real da amostra

m- declive da reta da curva padrão de ácido gálico

b- erro associado da reta da curva padrão de ácido gálico

d1- fator de diluição do extrato para realização do teor de polifenóis totais

d2- rendimento da extração

### 3.3.2.11 Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

A capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi realizado segundo Duffy & Power (2001), com algumas modificações. As amostras provêm do extrato de medronho realizado no ponto 3.3.1 onde depois são diluídas em água a uma concentração definida (por forma a que os valores da absorvância da amostra estejam abaixo da solução de DPPH).

Inicialmente, foi necessário preparar uma solução de DPPH a 0,1mM em etanol. Posteriormente, adicionou-se 10 µl de amostra e 990 µl da solução de DPPH num eppendorf, agitou-se em vortex e deixou-se repousar no escuro durante aproximadamente 30 minutos. Ao mesmo tempo, deve ser realizada uma mistura semelhante à anterior substituindo a solução de DPPH por água destilada de modo a verificar qual o valor da absorvância que deriva da cor da

amostra. Tendo todas as preparações feitas, procedeu-se às leituras no espectrofotómetro a comprimento de onda de 517 nm.

Por forma a medir a concentração de amostra que reduz 50% da atividade inicial do radical livre DPPH, ( $EC_{50}$ ), foi realizado uma curva-padrão que relaciona a percentagem de inibição do DPPH e a concentração do padrão, por interpolação gráfica. O padrão utilizado foi o BHT.

A capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil é dada pelos seguintes passos:

1º Descontar absorvância proveniente da cor da amostra

$$Abs = abs1 - abs2$$

Abs- absorvância real da amostra

abs1- absorvância da amostra com solução de DPPH

abs2- absorvância proveniente da cor da amostra (sem DPPH)

2º Determinação da capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazi, em % de inibição

$$\% \text{inibição do DPPH} = \frac{Abs}{Abs1} * 100 \quad (\% \text{ de inibição})$$

Abs- absorvância real da amostra

abs1- absorvância da solução de DPPH (controlo)

3º Realização da curva padrão com BHT, onde:

$$y = mx + b$$

y- percentagem de inibição do radical de DPPH do padrão BHT

x- concentração do padrão BHT, em  $\mu\text{g/ml}$

4º Determinação da capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazi, em  $EC_{50}$

$$EC_{50} = \frac{\left(\frac{y-b}{m}\right) * d1}{d2} \quad (\mu\text{g/g de fruto fresco})$$

y- percentagem de inibição do radical de DPPH da amostra

m- declive da reta da curva padrão de BHT

b- erro associado da reta da curva padrão de BHT

d1- fator de diluição do extrato para realização do DPPH

d2- rendimento da extração

### 3.3.2.12 Capacidade de redução dos radicais de oxigênio

A capacidade de redução dos radicais de oxigênio (ORAC) foi realizada de acordo com Guerreiro et al. (2013), com algumas modificações. Para tal é necessário realizar a intrapolação da amostra com uma curva padrão de trolox dissolvido em tampão fosfato 75mM, efetuada a partir de 6 concentrações definidas. Quanto à amostra, esta provém do extrato de medronho realizado no ponto 3.3.1, cuja amostra é dissolvida em tampão fosfato 75 mM a uma concentração definida (por forma a que os valores da amostra estejam dentro da curva padrão de trolox).

Posto isto, o método consiste na adição de 20 µl de amostra e dos padrões a cada poço numa placa de 96 poços, juntamente com 120 µl de fluoresceína. Ao mesmo tempo deve ser realizada uma mistura semelhante à da amostra, substituindo a fluoresceína por tampão fosfato a 75mM e adicionar 20 µl desta mistura a cada poço da placa de 96 poços de modo a verificar qual o valor da absorvância que deriva da cor da amostra.

De seguida, realizar a pré-incubação a 37°C no leitor de fluorescência a um comprimento de onda de excitação 485 nm e de emissão 528 nm, durante 15 minutos com leitura de 1 em 1 minuto. Finalmente, após a última leitura adicionar 60 µl de APPH e ler novamente à mesma fluorescência e comprimento de onda de excitação e de emissão durante 4 horas e 15 minutos. A capacidade de redução dos radicais de oxigênio é dado pelos seguintes passos:

1º Realização da curva padrão de trolox, onde:

$$y = mx + b$$

y- absorvância da solução

x- concentração em µmol equivalentes de trolox/g de solução

2º Descontar absorvância proveniente da cor das amostras

$$\text{Abs} = \text{abs1} - \text{abs2}$$

Abs- absorvância real da amostra

abs1- absorvância da amostra com fluoresceína

abs2- absorvância proveniente da cor da amostra (sem fluoresceína)

3º Determinação da capacidade de redução dos radicais de oxigênio

$$\text{ORAC} = \frac{\left(\frac{y-b}{m}\right) * d1 * 100}{d2} \quad (\mu\text{mol equivalentes de trolox}/100 \text{ g de fruto fresco})$$

y- absorvância real da amostra

m- declive da reta da curva padrão de trolox

b- erro associado da reta da curva padrão de trolox

d1- fator de diluição do extrato liofilizado em tampão fosfato a 75mM para realização do

ORAC

d2- rendimento da extração

### 3.3.2.13 Hidratos de Carbono

O teor de hidratos de carbono (HC) foi determinado segundo o método descrito em FAO (2003). Este é calculado por diferença com os outros macronutrientes constituintes do produto (proteína bruta, gordura total, humidade e cinzas).

$$\% \text{HC} = 100 - (\text{PB} + \text{GT} + \text{Hum} + \text{Cin}) \quad (\%)$$

PB- teor de proteína bruta

GT- teor de gordura total

Hum- teor de humidade

Cin- teor de cinzas

### 3.3.3 Elaboração do paté de lapa com adição de medronho

Numa primeira etapa foram desenvolvidos testes preliminares com o objetivo de selecionar as matérias-primas e suas dosagens adequadas, assim como o tipo de processamento mais apropriado.

Após estes testes foram estabelecidas 3 formulações: (1) paté com adição de BHT-PCON; (2) paté com adição de 3% de medronho - PAU3; e (3) paté com adição de 6% de medronho - PAU6. A receita base foi apoiada em alguns autores (Estévez et al., 2007; Fuentes-Zaragoza et al., 2009; Sánchez-Zapata et al., 2011; Nielsen & Jacobsen, 2013), porém como se pretendia desenvolver um produto novo, durante a produção do paté alguns ingredientes e respetivas dosagens foram ajustados ou substituídos conforme as características do produto e resultados da avaliação sensorial (Anexo 1).

As três formulações foram desenvolvidas à escala piloto considerando os mesmos parâmetros de processamento e de composição, exceto o tipo e concentração do antioxidante (BHT a 0,01% (massa/massa do produto final)), extrato de medronho a 3% (massa de fruto fresco para realização do extrato/massa do produto final) e extrato de medronho a 6% (massa do fruto fresco para realização do extrato/massa do produto final)) que foram adicionados ao mix de fécula de batata (o mix de fécula de batata foi elaborado segundo a seguinte receita por 100 gramas de produto: 39,89 ml de extrato de antioxidante, 33,71 ml de leite meio gordo, 22,47 g de flocos de fécula de batata, 3,93 g de margarina vegetal, 0,01 g de sal, 0,005 g de pimenta branca e 0,005 g de noz-moscada).

A escolha dos antioxidantes teve por base a comparação da eficácia da utilização do antioxidante sintético BHT com o antioxidante vegetal (medronho) e em simultâneo avaliar o efeito do aumento de concentração deste último.

No caso do antioxidante sintético (BHT) foi utilizada a concentração máxima permitida por lei 0,0001% para emulsões (Regulamento (UE) 1129, 2011), a concentração do antioxidante natural (medronho) de 3% provém de trabalhos realizados por outros autores como Ganhão et al. (2010), que demonstraram a eficácia deste em produtos de origem animal.

A formulação base dos patés foi realizada de acordo com a seguinte composição: 62% de lapa (miolo inteiro), 30% de mix de fécula de batata (antioxidante incorporado) e 8% de óleo de girassol.

Primeiro, o miolo de lapa foi submetido a um processo de cozedura a vapor em forno elétrico a 100°C durante 10 minutos. De seguida o miolo das lapas foi picado na *cutter* utilizando uma lâmina de rugosidade fina sob duas diferentes condições: 1500 rpm durante 3 minutos e posteriormente 2000 rpm por mais 3 minutos. Posteriormente, o mix de fécula de batata e o óleo de girassol foram adicionados e misturados com o miolo de lapa (picado) na *cutter* (3000 rpm durante 5 minutos) até se obter uma pasta homogénea (figura 3.2), obtendo-se 1,5 Kg de paté por lote.

Depois os patés foram embalados em frascos de vidro (aproximadamente 110 g de paté/frasco e 14 frascos/lote) e sujeitos a tratamento térmico por imersão em banho termostático a 80°C durante 30 minutos. De seguida, os patés foram arrefecidos à temperatura ambiente durante 15 minutos por forma a evitar o choque térmico do produto quando este for refrigerado a 5°C. No presente trabalho os 3 patés estiveram em refrigeração durante 4 períodos de tempo (0, 30, 60 e 90 dias). O dia de produção foi considerado como o dia 0.



**Figura 3.2-** Ingredientes para a preparação do patê de lapa com adição de medronho

### 3.3.4 Caracterização físico-química dos patés

Os parâmetros físico-químicos (Hum, PB, GT, FT, Cin, HC, Cal, pH, Cor, Acd, Ads, Dz, TPC, DPPH, ORAC e Tbars) foram analisados no dia 0, enquanto que apenas os parâmetros físico-químicos (GT, pH, Cor, Acd, Ads, Dz, TPC, DPPH, ORAC e Tbars), analisaram-se também aos dias 30, 60 e 90.

Após cada período de refrigeração, as amostras foram retiradas e armazenadas em ultracongelamento ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) até à realização das respetivas análises laboratoriais (menos de duas semanas).

Os parâmetros Hum, PB, Cin, GT, Acd, pH, TPC, DPPH, ORAC e HC determinados nos patés foram realizados da mesma forma que os das matérias-primas.

#### 3.3.4.1 Fibra Total

O teor de FT foi determinado de acordo com o método descrito no ponto 3.3.2.5, contudo esta análise requer uma etapa prévia de remoção da gordura uma vez que os patés apresentam

um teor de gordura superior a 5%. Esta etapa consistiu na extração da gordura da amostra com éter de petróleo recorrendo ao aparelho de extração de Soxhlet, onde foram realizadas 3 extrações por amostra.

#### **3.3.4.2 Cor-Medida instrumental**

As leituras das coordenadas ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) das amostras foram realizadas de acordo com o método descrito no ponto 3.3.2.7., porém as leituras nos patés foram efetuadas na parte superior do frasco destapado logo após sua abertura.

#### **3.3.4.3 Avaliação da textura**

A avaliação da textura foi realizada de acordo com Estévez et al. (2005a), com algumas modificações. Para tal, foi utilizado o software TA.XT.Plus Texture Analyser, uma célula de 30 kg e a sonda cilíndrica de 10 mm de diâmetro. O texturómetro foi calibrado antes de realizar as medições, de seguida os frascos com os patés foram colocados no centro do suporte de apoio das amostras (os pontos de perfuração da sonda foram realizados junto à extremidade do frasco) onde foram realizadas as leituras.

Os parâmetros do teste foram os seguintes: distância de penetração após contato com a amostra (8 mm) e velocidade de perfuração (1,5 mm/s). As análises de textura foram realizadas à temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). Este teste pretende determinar os seguintes atributos de textura: dureza (definida como força máxima durante a perfuração da amostra) e a adesividade (definida como a área do gráfico (força vs tempo) durante a subida da sonda).

#### **3.3.4.4 Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico**

O índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Tbars) foi determinado de acordo com o método descrito por Rosmini et al. (1996), com algumas modificações. O método consistiu na extração do aldeído malónico das amostras, para tal dissolveu-se 15 ml de amostra com uma mistura de 7,5% de ácido tricloroacético, galato de propilo e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e filtrou-se as amostras em papel de filtro nº4. De seguida, ao filtrado são adicionados 5 ml de ácido tiobarbitúrico, é agitado e incubado em banho termostático a 100°C durante 40 minutos, ou seja o aldeído malónico da amostra reage com o ácido tiobarbitúrico formando um complexo corado rosa, cuja absorvância é medida a comprimento de onda de 530 nm recorrendo ao espectrofotómetro.

Em paralelo às amostras, são realizadas 5 concentrações diferentes da solução padrão de 1,1,3,3- tetraetoxipropano (TEP) igualmente incubadas a 100°C durante 40 minutos e cuja absorvância é medida nas mesmas condições, permitindo obter uma equação da reta que possibilita a intrapolação das amostras. O índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é dado pelos seguintes passos:

1º Realização da curva padrão de 1,1,3,3- tetraetoxipropano, onde:

$$y = mx + b$$

y- absorvância da solução

x- concentração de aldeído malónico, em  $\mu\text{mol}$

2º Determinação do índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

$$Tbars = \frac{72 * c}{m * v} \left( 30 + \frac{m * H}{100} \right) \quad (\text{mg de aldeído malónico/Kg de produto})$$

c- concentração do aldeído malónico, em  $\mu\text{mol}$

m- massa da toma da amostra, em g

v- volume de cada produto a incubar no banho termostático, em ml

H- humidade da amostra, em %

### 3.3.4.5 Valor calórico

O valor calórico (Cal) foi determinado segundo o método descrito em FAO (2003). Para tal, é necessário considerar alguns fatores de conversão: 4Kcal/g de proteína bruta, 4Kcal/g de hidrato de carbono e 9Kcal/g de gordura total. A determinação do valor calórico é dado pela seguinte equação:

$$\text{Cal} = (\%PB * 4) + (\%HC * 4) + (\%GT * 9) \quad (\text{Kcal/100 g})$$

%PB- teor de proteínas

%HC- teor de hidratos de carbono

%GT- teor de gordura total

### 3.3.5 Análises Microbiológicas

Os parâmetros microbiológicos foram realizados nos dias 0, 30, 60 e 90 após elaboração dos patés e consistiram na análise dos microrganismos totais e degradativos (aeróbios e anaeróbios), *Escherechia coli*, Enterobactérias, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Estes microrganismos foram selecionados uma vez que o Regulamento (UE) 1441 (2007) indica que estes poderão estar presentes em produtos da pesca processados e que, embora lentamente, podem se desenvolver em condições de refrigeração apesar de se desenvolverem a temperaturas ótimas de 25-30°C (Chairman, 1997).

Toda a preparação envolvendo a pesquisa de microrganismos foi realizada sob condições de assepsia como, trabalhar à chama, utilização de material estéril, processo marcha em frente e superfícies de contato desinfetadas com etanol à concentração de 70% (v/v).

### 3.3.5.1 Preparação dos diluentes, meios de cultura e das suspensões-mãe

Todos os diluentes e meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes e foram esterilizados na autoclave a 121°C, durante aproximadamente 15 minutos.

A suspensão mãe para os microrganismos totais e degradativos, *Escherechia coli* e Enterobactérias foi efetuada de acordo com a NP 3005 (1985), enquanto que para a *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. foi realizada de acordo com a ISO 6887 (1999).

### 3.3.5.2 Microrganismos totais e degradativos

A pesquisa de microrganismos totais e degradativos foi realizada de acordo com a NP 4405 (2002). Depois de preparada a suspensão mãe e realizadas as diluições decimais sucessivas foram transferidos 2 ml de cada diluição sucessiva para placas de Petri contendo meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA), em duplicados. De seguida, as placas foram incubadas a 20 ± 1°C durante 72 ± 6 horas. Depois procedeu-se à contagem das colónias de 2 diluições sucessivas que apresentem entre 25 e no máximo 250 colónias. Para calcular o número de microrganismos por grama (N) deve-se usar a seguinte equação:

$$N = \frac{\text{Soma de C}}{(n1 + 0,1 * n2) * d} \quad (\text{ufc/g de produto})$$

Soma de C- soma de colónias contadas nas duas placas consideradas

n1- número de placas consideradas na 1ª diluição

n2- número de placas consideradas na 2ª diluição

d- fator de diluição correspondente à 1ª diluição considerada

### 3.3.5.3 *Escherechia coli*

A pesquisa de *E. coli* foi realizada de acordo com a ISO 16649-2 (2001). Depois de preparada a suspensão mãe e realizadas as diluições decimais sucessivas foram transferidos 2

ml de cada diluição sucessiva para as placas de Petri com meio TBX agar, em duplicados. De seguida, as placas foram incubadas em duas diferentes condições: primeiro a 37°C durante 4 horas e depois a 44°C entre 18 a 20 horas. Depois, procedeu-se à contagem das colónias de duas diluições sucessivas que apresentem entre 15 e no máximo 300 colónias. Para calcular o número de microrganismos por grama (N) deve-se usar a seguinte equação:

$$N = \frac{\text{Soma de C}}{V * ((n1 + 0,1 * n2) * d)} \quad (\text{ufc/g de produto})$$

Soma de C- soma de colónias contadas nas duas placas consideradas

V- volume de inóculo, em ml

n1- número de placas consideradas na 1ª diluição

n2- número de placas consideradas na 2ª diluição

d- fator de diluição correspondente à 1ª diluição considerada

#### 3.3.5.4 Enterobacterias

A pesquisa de Enterobactérias foi realizada de acordo com a ISO 7218 (1996). Depois de preparada a suspensão mãe e realizadas as diluições decimais sucessivas foram transferidos 2 ml de cada diluição sucessiva para as placas de Petri com meio VRBG a 44-47°C, em duplicados. Depois as placas foram incubadas a 37°C durante 24 ± 2 horas e procedeu-se à contagem das colónias de duas diluições sucessivas que apresentem entre 15 e no máximo 150 presumíveis colónias. Caso estas estejam supostamente presentes deve-se efetuar a sua confirmação através do isolamento de 5 presumíveis colónias em meio Nutrient Agar e incubar a 37°C durante 24 ± 2 horas. Para calcular o número de microrganismos por grama (N) deve-se usar a seguinte equação:

$$N = \frac{\text{Soma de C}}{V * ((n1 + 0,1 * n2) * d)} \quad (\text{ufc/g de produto})$$

Soma de C- soma de colónias contadas nas duas placas consideradas

V- volume de inóculo, em ml

n1- número de placas consideradas na 1ª diluição

n2- número de placas consideradas na 2ª diluição

d- fator de diluição correspondente à 1ª diluição considerada

### 3.3.5.5 *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada de acordo com a ISO 11290-2 (1998), com algumas modificações. Depois de preparada a suspensão mãe e realizadas as diluições decimais sucessivas foram transferidos 0,1 ml de cada diluição sucessiva para as placas de Petri com meio Rapid L.mono (BASE), em duplicados. De seguida as placas foram incubadas a 35-37°C durante 48 horas. Para confirmar a presença de *L. monocytogenes* picou-se em 5 presumíveis colónias de placas com menos de 150 presumíveis colónias e colocou-se em placas contendo meio tripton agar de soja com extrato de levedura e incubou-se as placas a 35-37°C durante 18-24 horas e verificou-se se houve crescimento. Caso haja crescimento, procedeu-se à contagem das colónias de duas diluições sucessivas que apresentem no mínimo 15 colónias confirmadas. Para calcular o número de microrganismos por grama (N) deve-se usar a seguinte equação:

$$N = \frac{\text{Soma de C}}{V * ((n1 + 0,1 * n2) * d)} \quad (\text{ufc/g de produto})$$

Soma de C- soma de colónias contadas após confirmação nas duas placas consideradas

V- volume de inóculo, em ml

n1- número de placas consideradas na 1ª diluição

n2- número de placas consideradas na 2ª diluição

d- fator de diluição correspondente à 1ª diluição considerada

### 3.3.5.6 *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada de acordo com a ISO 6579 (2002). Depois de preparada a suspensão mãe, a amostra foi incubada a 37 ± 1°C durante 24-26 horas. Após esse período 0,5 ml de amostra foi transferida para um tubo com 10 ml de caldo Salmonella Express (SX) e incubada a 41,5 ± 1°C durante 24-26 horas. Posteriormente, o tubo foi aquecido em banho-maria a 95-100°C durante 15 minutos e transferiu-se 1 ml de cada tubo nas barretes para realizar o teste VIDAS. Caso o teste seja positivo (presença de presumíveis colónias de *Salmonella*), deve-se confirmar a presença das mesmas, ou seja, repicar as presumíveis colónias em meio XLD e SMID 2 e incubar as placas a 37°C durante 24 horas. Se o teste for negativo continuar a incubação por mais 24 horas à mesma temperatura e transferir 0,5 ml do conteúdo do tubo para 10 ml de RVS e incubar a 41,5 ± 1°C durante 18-24 horas.

Posteriormente efetuar o isolamento do caldo RVS para meios XLD e SMID 2 a 37°C durante 24-48 horas, finalmente recuperar e purificar em Nutrient agar e tubos Kligler uma colônia típica ou suspeita de cada um dos meios. Se a confirmação for negativa deve-se isolar posteriormente 4 colônias por meio e incubar a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  horas e realizar os testes de Gram e oxidase e utilizar o API 20E para confirmar a presença de colônias de *Salmonella* segundo as instruções do fabricante. Os resultados são expressos em presença/ausência em 25 gramas de produto.

### **3.3.6 Análise Sensorial**

A análise sensorial realizada aos patés foi realizada nos dias 0, 30, 60 e 90 após elaboração do paté, e consistiu na avaliação do perfil sensorial (prova descritiva), em testes de ordenação de preferência e em testes de aceitabilidade (provas afetivas), segundo Meilgaard et al. (2007). No dia 0 foi realizada uma reunião com o painel de provadores por forma a assegurar a compreensão dos descritores sensoriais definidos, assim como para fornecer uma breve explicação da folha de prova (anexo 2) e da folha de apoio à prova (anexo 3). As provas sensoriais foram realizadas por um painel de provadores treinado composto por 12 provadores com idades entre os 20 e os 50 anos representativos do meio académico da ESTM e com conhecimentos adquiridos em provas sensoriais anteriores. O painel de provadores foi também sujeito a uma formação contínua através de provas de identificação de sabores básicos, provas triangulares para deteção de diferenças e provas de ordenação, com o objetivo de aumentar a consistência das respostas. A análise sensorial dos patés foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial nas instalações da ESTM. As provas sensoriais realizaram-se em cabines individualizadas de prova, onde os provadores respeitaram todas as condições necessárias à sua realização. As amostras foram preparadas pelo coordenador do painel na sala de preparação das amostras para análise sensorial. Os patés (amostras) foram barrados em pequenas tostas de espessura fina por forma a realçar os atributos sensoriais dos patés, cada prova consistiu em 3 repetições por paté, distribuídos por 3 análises em separado, ou seja cada análise (prato) foi constituída pelos 3 diferentes patés.

#### **3.3.6.1 Prova Descritiva-Perfil Sensorial**

A avaliação do perfil sensorial consistiu na avaliação de descritores relativos à aparência (cor e textura superficial), flavor (flavor a mar, flavor a frutos silvestres, flavor a ranço e

flavor residual após 20 segundos) e textura (aderência, cremosidade e oleosidade) através de uma avaliação de uma escala de intensidades, classificada de 1 a 5 pontos (anexo 2).

### 3.3.6.2 Provas Hedônicas (testes de ordenação de preferência e de aceitabilidade)

Os testes de ordenação de preferência consistiram na avaliação da preferência global das amostras numa escala definida de 1 a 3, sendo que o 1 representa o “mais preferido”, o 2 o “preferido intermédio” e 3 o “menos preferido” (anexo 2).

Os testes de aceitabilidade permitiram avaliar a aceitação das amostras segundo os provadores de acordo com uma escala hedônica de 9 pontos com as seguintes âncoras: 1- extremamente desagradável, 2-muito desagradável, 3-moderadamente desagradável, 4- ligeiramente desagradável, 5-indiferente, 6-ligeiramente agradável, 7-moderadamente agradável, 8-muito agradável e 9-extremamente agradável (anexo 2).

### 3.3.7 Análise estatística

Todas as análises físico-químicas e sensoriais foram realizadas em triplicados, sendo que as análises microbiológicas foram efetuadas apenas em duplicado. Para o estudo das análises físico-químicas dos produtos ao longo do tempo (0, 30, 60 e 90 dias) e entre produtos (PCON, PAU3 e PAU6) no mesmo tempo realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com um fator, de efeitos fixos (Zar, 2010). Todos os pressupostos inerentes (homogeneidade de variância e normalidade dos dados) à realização do método foram devidamente validados. Sempre que tais requisitos foram violados, realizou-se o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* (Zar, 2010). Sempre que adequado realizaram-se os testes de comparações múltiplas, nomeadamente o teste de *Tukey HSD (Honestly Significant Difference)* (Zar, 2010) e as correlações de Pearson. Os resultados são apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio-padrão (SD). Em todos os resultados obtidos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 0,05 (isto é, sempre que  $p\text{-value} < 0,05$ ). Todos os cálculos foram realizados mediante a utilização do Software IBM SPSS Statistics 22.

Adicionalmente, e de forma a visualizar e interpretar a relação dos parâmetros físico-químicos com os produtos em estudo, realizou-se uma análise de componentes principais (PCA). O modelo de PCA permitiu a deteção de padrões entre as diferentes amostras (PCON, PAU3 e PAU6 nos diferentes tempo, isto é, 0, 30, 60 e 90 dias), bem como a identificação das principais associações entre variáveis que são responsáveis pela variabilidade total dos dados

estudados. O PCA foi construído sobre a média dos dados de medição, sendo a validação cruzada utilizada para corroborar o modelo. Embora apenas os resultados relativos às duas primeiras componentes sejam aqui apresentadas (CP1 e CP2), todas as outras foram igualmente analisadas. Todos os cálculos e gráficos produzidos para o estudo do PCA, foram realizados mediante o Software CANOCO for Windows 4.5 (ter Braak & Smilauer, 1998)

Para o estudo do perfil sensorial dos patés ao longo do tempo realizou-se o teste não-paramétrico de *Friedman* (Siegel & Castellan, 1988). Este teste adequa-se para o estudo em causa, uma vez que se está perante um delineamento emparelhado, dado que os provadores que integraram o painel terem sido sujeitos a quatro ocorrências experimentais (0, 30, 60 e 90 dias). Por conseguinte, para o mesmo provador foram obtidos resultados em todas as ocorrências, sendo por isso possível comparar os resultados de cada indivíduo em cada uma delas (Siegel & Castellan, 1988).

Adicionalmente, para a avaliação da associação do perfil sensorial dos diferentes produtos com os diferentes tempos, procedeu-se ao teste não-paramétrico de independência do Qui-Quadrado (Siegel & Castellan, 1988). Este é um teste suficientemente robusto quanto aos pressupostos que impõe e adequado para o estudo de variáveis de natureza qualitativa, pelo que justifica a sua aplicação nos dados em análise. Desta forma, foi possível verificar a existência de associações significativas entre os patés e os descritores sensoriais. De igual modo, o procedimento realizado pelo teste não-paramétrico de independência do Qui-Quadrado foi efetuado para a análise da preferência dos patés ao longo do tempo. Em todos os resultados obtidos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 0,05 (isto é, sempre que  $p\text{-value} < 0,05$ ). Todos os cálculos foram realizados mediante a utilização do software IBM SPSS Statistics 22.



## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises físico-químicas das matérias-primas

O medronho e a lapa foram as principais matérias-primas utilizadas na elaboração do paté. As suas características são estudadas para perceber de que forma enriquecem o novo produto.

As propriedades físico-químicas do medronho analisadas durante o presente trabalho encontram-se de acordo com o obtido por outros autores (Ganhão et al., 2011; Ruiz-Rodríguez et al., 2011; Alves, 2012) (tabela 4.1). As diferenças encontradas são provavelmente devido a um conjunto de fatores edafo-climáticos, como a colheita ser realizada em locais e/ou anos diferentes (condições de crescimento e atmosféricas diferentes), ou diferenças do estado de maturação (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Heinonen, 2007; Cavaco, 2007; Ganhão et al., 2010; Ruiz-Rodríguez et al., 2011).

**Tabela 4.1-** Propriedades físico-químicas do medronho

|         | Presente trabalho <sup>1</sup> (Zona Oeste, Portugal) | Referências bibliográficas             |   |                                    |
|---------|---|--|---|------------------------------------|
|         |   | Ganhão et al., 2010 (Cáceres, Espanha) | Ruiz-Rodríguez et al., 2011 (Madrid, Espanha) | Alves, 2012 (Zona Norte, Portugal) |
| Hum (%) | 67,04 ± 0,25  | 71,43 ± 0,76                           | 53,22 ± 2,99                                  | 56,6 ± 2,44                        |
| PB (%)  | 0,85 ± 0,11   | 0,77 ± 0,12                            | 0,93 ± 0,04                                   | 0,90 ± 0,11                        |
| GT (%)  | 0,46 ± 0,02   | 0,31 ± 0,08                            | 0,58 ± 0,04                                   | 0,60 ± 0,09                        |
| FT (%)  | 15,38 ± 0,82  |  | 10,79 ± 0,63                                  | 16,20 ± 1,88                       |
| Cin (%) | 0,69 ± 0,07   | 0,33 ± 0,08                            | 0,87 ± 0,18                                   | 0,86 ± 0,07                        |
| Brx (%) | 20,48 ± 0,23  |  | 18,84 ± 1,31                                  |                                    |
| Acd (%) | 0,81 ± 0,02   | 0,62 ± 0,06                            |   |                                    |
| pH      | 3,44 ± 0,01   | 3,74 ± 0,06                            | 3,47 ± 0,12                                   |                                    |
| L*      | 53,48 ± 2,99  |  |   | 53,87 ± 2,27                       |
| a*      | 10,72 ± 0,83  |  |   | 13,37 ± 1,78                       |
| b*      | 52,07 ± 1,65  |  |   | 53,42 ± 3,27                       |

<sup>1</sup> Resultados expressos como média e desvio padrão de triplicados de amostras (matéria fresca)

Segundo os autores Ruiz-Rodríguez et al. (2011), Alves (2012) e Isbilir et al. (2012), os parâmetros Hum, FT, Cin, Acd e pH podem apresentar variabilidade devido a fatores edafo-climáticos (colheita realizada em locais e/ou anos diferentes). Outros parâmetros como a PB e o Brx que estão de acordo com os autores Ruiz-Rodríguez et al. (2011) e Alves (2012), variam principalmente com o estado de maturação do

medronho, sendo que a GT é o único parâmetro que segundo os mesmos autores, varia devido a fatores ambientais e com o estado de maturação do fruto.

A Hum é o parâmetro com maior variabilidade uma vez que é o componente maioritário no fruto e varia com a exposição do fruto a diferentes condições ambientais que contribuem para a desidratação dos frutos uma vez que é uma espécie sensível à carência hídrica e de período reprodutivo bastante longo (Ruiz-Rodríguez et al., 2011; Alves, 2012).

Relativamente ao teor de FT, os medronhos são uma interessante fonte de fibras alimentares solúveis e insolúveis, por exemplo o teor de fibras solúveis como as pectinas apresentam concentrações superiores aos de outros frutos ricos neste composto como as maçãs, citrinos, damascos, pêssegos, entre outros (Ruiz-Rodríguez et al., 2011).

O teor de Acd quantifica todos os ácidos orgânicos que desempenham papel importante na manutenção da qualidade e valor nutritivo de diferentes frutos. No caso do medronho segundo Alarcão-E-Silva et al. (2001) e Ruiz-Rodríguez et al. (2011), os que se encontram em maior proporção são o ácido málico (maior quantidade), ácido oxálico, ácido fumárico e o ácido ascórbico.

Relativamente às coordenadas Cielab ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) registaram-se os seguintes valores,  $53,48 \pm 2,99$ ,  $10,72 \pm 0,83$  e  $52,07 \pm 1,65$ , respetivamente estando de acordo com o referenciado por Alves (2012). De acordo com este autor, a variabilidade destas coordenadas deve-se ao estado de maturação, pois frutos maduros apresentam maiores valores de  $a^*$  e menores valores de  $b^*$  e de  $L^*$ , isto ocorre tanto ao nível interno como externo do fruto, apresentando externamente uma cor mais acentuada devido à exposição solar e conseqüente menor hidratação da película protetora. As coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  estão correlacionadas com alguns compostos antioxidantes como, os  $\beta$ -carotenos e as antocianinas, entre outros, por exemplo o aumento do estado de maturação do fruto (passagem da cor amarela para vermelha) aumenta as proporções das antocianinas, quanto aos  $\beta$ -carotenos exibem maiores valores na fase de maturação intermédia (verde para amarelo). Muitos destes antioxidantes são utilizados na indústria alimentar como corantes (Alves, 2012).

As propriedades relacionadas com a atividade antioxidante do medronho avaliadas durante o presente estudo encontram-se dentro dos valores determinados por outros autores (tabela 4.2). Porém, alguma variabilidade da atividade antioxidante que exista

resulta de um conjunto de fatores como, processo de extração dos antioxidantes, condições atmosféricas, crescimento do fruto e suas diferenças do estado de maturação (Heinonen, 2007; Ganhão et al., 2010).

**Tabela 4.2-** Atividade antioxidante do medronho efetuado a partir de um extrato aquoso

|                   | Presente trabalho <sup>1</sup> (Zona Oeste, Portugal) | Referências bibliográficas             |   |                                  |
|-------------------|---|--|---|----------------------------------|
|                   |   | Ganhão et al., 2010 (Cáceres, Espanha) | Ruiz-Rodríguez et al., 2011 (Madrid, Espanha) | Wu et al., 2004 (Estados Unidos) |
| TPC <sup>2</sup>  | 567,27 ± 27,01  | 472,00 ± 65,00                         | 952,00 ± 49,00                                |                                  |
| DPPH <sup>3</sup> | 0,55 ± 0,12   | 0,70 ± 0,37                            |   |                                  |
| ORAC <sup>4</sup> | 13325,08 ± 103,00                                     |  |   | 14000,00 ± 2000,00               |

<sup>1</sup> Resultados expressos como média e desvio padrão de triplicados de amostras (matéria fresca)

<sup>2</sup> Resultado expresso em mg de ácido gálico/100 g de fruto fresco

<sup>3</sup> Resultado expresso em EC<sub>50</sub>

<sup>4</sup> Resultado expresso em µmol equivalentes de trolox/100 g de fruto fresco

A eficácia do processo de extração dos antioxidantes depende do tipo de solvente, do método e da matéria-prima (matriz). Segundo Ganhão et al. (2010), a atividade antioxidante no medronho é influenciada predominantemente pela quantidade de compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos.

Em geral, a fração polar da matéria-prima contém a maior parte dos compostos fenólicos (maioritariamente polares), portanto quanto maior for a polaridade do solvente (água, etanol, metanol, entre outros) maior será a extração dos mesmos (Apak et al., 2007).

Os resultados do TPC estão em concordância com o referido por Ganhão et al. (2010), apresentando no entanto diferenças com o encontrado por Rodríguez et al. (2011).

A variabilidade deste parâmetro pode dever-se a diversos fatores. Em primeiro lugar, relativamente à preparação do extrato usando a água como solvente, este poderá apresentar menores concentrações de TPC e conseqüentemente menor capacidade antioxidante do que em extratos preparados com solventes orgânicos (mais polares), contudo segundo Malheiro et al. (2012), uma das formas de obter uma maior quantidade de compostos fenólicos usando como solvente a água é através da preparação do extrato sob condições controladas de refluxo. Em segundo lugar o solvente aquoso, tal como os outros podem extrair outras substâncias hidrossolúveis e polares (açúcares, ácidos

orgânicos e proteínas) que podem reagir com o reagente de Follin-Ciocalteu originando aparentemente maiores valores de TPC, embora não se traduzam num aumento do potencial antioxidante (Prior et al., 2005; Magalhães et al., 2008; Ganhão et al., 2010; Malheiro et al., 2012). Em terceiro lugar, pode haver extração de outros compostos que apesar de não serem contabilizados como compostos fenólicos aumentam o potencial antioxidante como as vitaminas, alguns ácidos orgânicos, triterpenóides, carotenoides, entre outros, (Ayaz et al., 2000; Alarcão-E-Silva et al., 2001; Barros et al., 2010). Por fim, e em quarto lugar, diferentes compostos fenólicos presentes no medronho podem responder de forma diferente dependendo do seu número de grupos fenóis, logo este método pode não incorporar necessariamente todos os compostos fenólicos que estejam presentes no extrato (Ganhão et al., 2010).

Na maior parte das vezes nos frutos silvestres, a quantidade de TPC é diretamente correlacionável com a atividade antioxidante *in vitro* do fruto, segundo Ganhão et al. (2010), existe correlação entre o TPC e o DPPH ( $R^2=-0,62$ ,  $p\text{-value}<0,01$ ), contudo por todos estes fatores descritos anteriormente por vezes esta correlação não se verifica.

No medronho, os compostos fenólicos predominantes são as procianidinas (aproximadamente 52% dos compostos fenólicos totais), seguido das catequinas, antocianinas, entre outros (Hakkinen et al., 1999; Shahidi & Wanasundara, 2002; Ganhão et al., 2010).

Quando comparado o TPC do medronho com outros frutos silvestres cuja técnica de extração seja semelhante verifica-se que o medronho é dos que possui maiores proporções de polifenóis, sendo semelhante ao estripo-bravo e à amora e superior ao azaroleiro e à serveira-dos-passarinhos (Ganhão et al., 2010).

No presente estudo, a atividade antioxidante *in vitro* de medronho foi analisada através dos métodos de DPPH e ORAC. Em ambos, verificou-se que existe elevada atividade antioxidante. O resultado do DPPH foi de  $0,55 \pm 0,12$  em  $EC_{50}$ , ou seja esta é a concentração necessária para reduzir 50% da atividade inicial do radical DPPH, portanto valores de  $EC_{50}$  menores correspondem a maior poder antioxidante (Olsson & Gustavsson, 2004; Ganhão et al., 2010; Malheiro et al., 2012). Este valor está em concordância com o referido por Ganhão et al. (2010), além disso é relativamente bastante mais baixo que outros frutos silvestres com elevado potencial antioxidante como o estripo-bravo, o azaroleiro, o abrunho-bravo e a serveira-dos-passarinhos, entre

outros (Ganhão et al., 2010), assim como outros alimentos de origem vegetal, como a pimenta preta, noz-moscada, canela e orégãos (Su et al., 2007).

Quanto ao resultado determinado pelo método ORAC,  $13325,08 \pm 103,00$ , verifica-se que está igualmente em concordância com o indicado por Wu et al. (2004). Este método permite medir a atividade antioxidante do medronho através da sua capacidade em captar os radicais livres que possuem grupos peróxilo (Tavares et al., 2010). Ao comparar o ORAC do medronho com outros frutos silvestres verifica-se que tem maior atividade antioxidante que os mirtilos, entre outros e atividade semelhante às framboesas e às amoras (Tavares et al., 2010). Quando comparado com outros produtos de origem vegetal com elevada atividade antioxidante comprovada, como a laranja, tomate, kiwi e maçã, constata-se que o medronho apresenta maiores valores de ORAC (Wang et al., 1996).

Relativamente ao medronho, alguns autores, Oliveira et al. (2011) e Malheiro et al. (2012) evidenciaram que quanto maior o seu grau de maturação, menores são os valores de TPC e do ORAC e maiores são os valores de  $EC_{50}$ , consequentemente menor é a atividade antioxidante, logo medronhos verdes apresentam maior atividade antioxidante, isto porque demonstraram que o TPC geralmente é correlacionável com a atividade antioxidante *in vitro* (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Oliveira et al., 2011; Malheiro et al., 2012).

Por outro lado, Oliveira et al. (2011) concluiu que o medronho numa fase de maturação intermédia (cor amarelada) apresenta maior atividade antioxidante (maiores valores de TPC e ORAC e menores valores de  $EC_{50}$ ).

Valores de DPPH ( $EC_{50}$ ) mais baixos no medronho são correlacionáveis com a elevada presença de compostos fenólicos como os flavonóides e o ácido hidroxinamico (Kahkonen et al., 2001; Ganhão et al., 2010), quanto ao ORAC alguns estudos indicam que existe uma forte correlação positiva entre este parâmetro e a presença de antocianinas e de outros compostos antioxidantes que não são compostos fenólicos como o ácido ascórbico e os  $\beta$ -carotenos entre outros (Kahkonen et al., 2001; Zulueta et al., 2009).

A outra matéria-prima fundamental na elaboração do produto é a lapa, *Patella* spp. A tabela 4.3 mostra os seus parâmetros químicos analisados.

**Tabela 4.3-** Caraterização química da lapa

|         | Presente trabalho <sup>1</sup><br>(Peniche, Portugal) | Referências bibliográficas                           |                                 |
|---------|---|--|---------------------------------|
|         |   | Domingues &<br>Penteado, 2011<br>(Peniche, Portugal) | Blackmore, 1969<br>(Inglaterra) |
| Hum (%) | 73,51 ± 0,20  |  | 79,50 ± 5,14                    |
| PB (%)  | 17,00 ± 0,51  |  | 13,51 ± 4,20                    |
| GT (%)  | 1,68 ± 0,18   | 1,37 ± 0,25  | 6,00 ± 2,41                     |
| Cin (%) | 2,36 ± 0,16   |  | 3,92 ± 1,55                     |
| HC (%)  | 5,45 ± 0,32   |  | 3,30 ± 1,91                     |

<sup>1</sup> Resultados expressos como média e desvio padrão de triplicados de amostras (matéria fresca)

Presentemente existem poucos estudos acerca da composição química destas lapas, sendo que maioritariamente os estudos focam-se fundamentalmente no teor lipídico porque é um importante parâmetro para o sistema reprodutor das lapas em sistemas de aquacultura (Domingues & Penteado, 2011).

A caracterização química das lapas analisadas neste estudo são concordantes com os resultados referidos por outros autores (Blackmore, 1969; Domingues & Penteado, 2011). Alguma variabilidade que exista deve se a um conjunto de fatores como o meio envolvente (região, condições atmosféricas e época do ano), sexo, idade e tamanho (Blackmore, 1969; Domingues & Penteado, 2011).

Há semelhança de qualquer produto de origem marinha, os constituintes em maior destaque da lapa são a água, as proteínas e os lípidos, existem ainda outros como os hidratos de carbono, os minerais e as vitaminas que embora se apresentem em menores quantidades apresentam relativa importância (Bandarra et al., 2004).

No presente trabalho, o teor de Hum,  $73,51 \pm 0,20$ , é o componente maioritário na lapa. Este varia fundamentalmente com a época do ano (condições atmosféricas), pois durante o Inverno e princípio da Primavera é quando apresenta maiores valores, no Verão estes valores são reduzidos cerca de 10% (Blackmore, 1969).

O teor de PB determinado foi de  $17,00 \pm 0,51$ , e encontra-se acima do valor determinado por Blackmore (1969), a variabilidade deste parâmetro pode dever-se à heterogeneidade dos sexos das lapas colhidas, isto porque, lapas do sexo feminino na fase de reprodução têm maiores teores de PB durante a maturação das gónadas (entre os meses de Abril e Outubro) (Blackmore, 1969).

Quando comparada a componente PB com a Hum e a GT, segundo Huss (1995), esta é mais estável ao longo do ano, contudo verifica-se que a privação de alimento por períodos de tempo longos provoca drástica diminuição da mesma.

O conteúdo de GT determinado na lapa foi de  $1,68 \pm 0,18$ , este valor é semelhante ao estudo realizado no mesmo local por Domingues & Penteado (2011), contudo inferior ao indicado por Blackmore (1969).

A variabilidade deste parâmetro deve-se a um conjunto de fatores como o sexo (lapas fêmeas apresentam teores de gordura mais elevados, isto porque necessitam da mesma durante a maturação das gónadas).

Segundo Brazão et al. (2003), é principalmente durante o mês de Outubro que ocorre este período, por outro lado há a influência do meio envolvente, isto é, se houver indisponibilidade de alimento, as lapas apresentam teores lipídicos mais baixos, sendo que geralmente as lapas apresentam maior tamanho/conteúdo lipídico nos meses de Abril até Outubro pois existe mais alimento.

Os moluscos apresentam valores de GT baixos, sendo este o componente que apresenta maior variabilidade nos produtos da pesca ao longo do ano (Bandarra et al., 2004).

O teor de Cin neste trabalho apresenta-se inferior ao referido por Blackmore (1969). A variabilidade deste deve-se essencialmente ao tipo e quantidade de algas/alimento que se encontram no meio envolvente.

No início do ano (Inverno) há um aumento das proporções deste componente devido ao crescimento de algas como a *Ulva* spp., no final do Verão à uma diminuição da quantidade de algas ocorrendo a redução do teor de Cin (Blackmore, 1969).

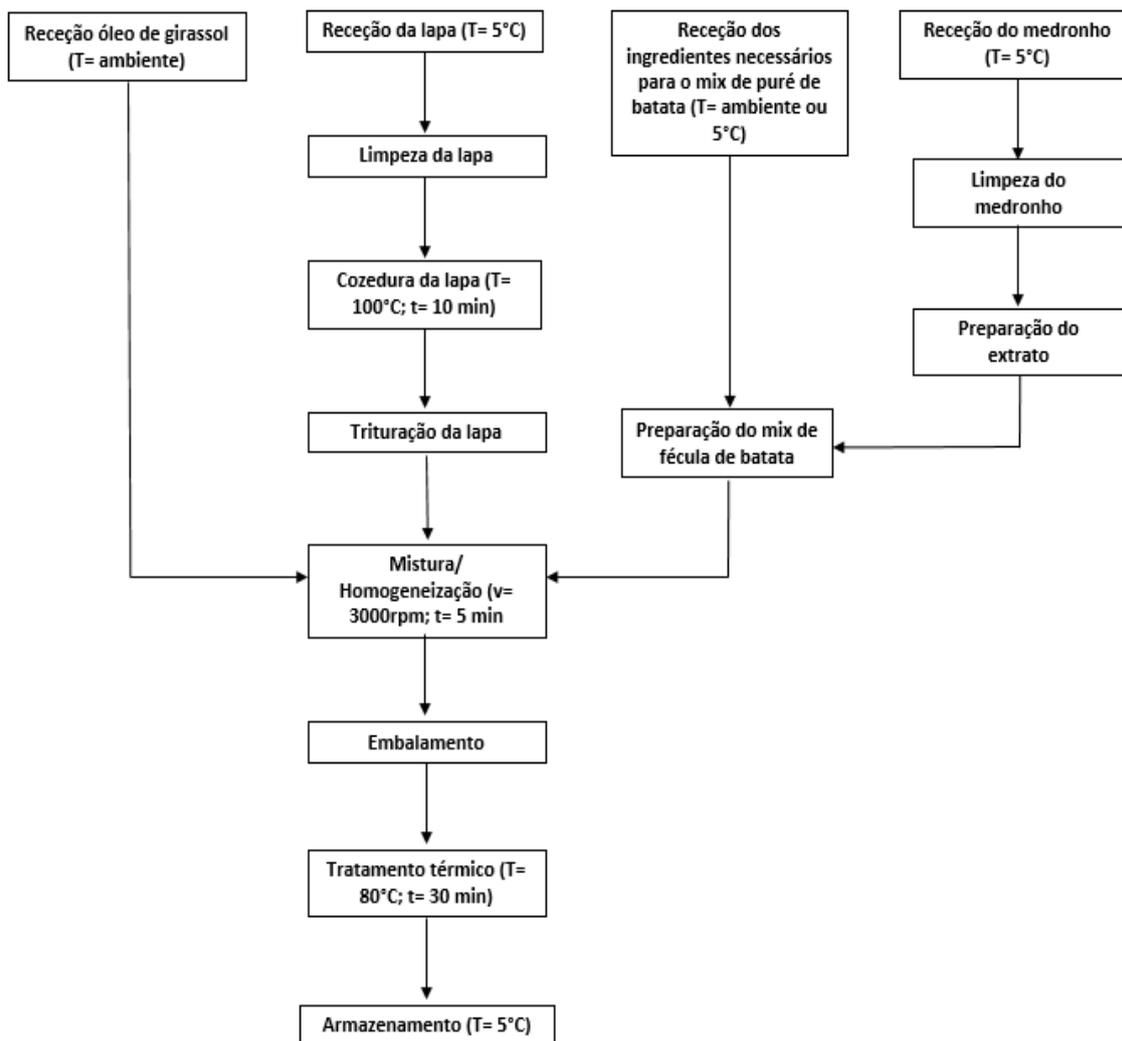
Os minerais mais comuns são potássio, magnésio, cálcio e fósforo. Assim como o iodo e o selénio, cujo teor nos produtos do mar é bastante superior aos dos produtos terrestres (Huss, 1995).

O conteúdo de HC determinado neste trabalho enquadra-se com o do autor Blackmore (1969). A variabilidade deste componente deve-se à temperatura da água do mar e à inibição/crescimento de algas.

Na Primavera e princípio de Verão o aumento da temperatura das águas e crescimento de algas aumenta a quantidade destes compostos, onde no mês de Julho ocorre o maior pico (Blackmore, 1969).

## 4.2 Otimização do diagrama de fabrico do paté de lapa com adição de medronho

Após a realização de testes preliminares e seleção das diferentes matérias-primas e respetivas dosagens, assim como otimização do tipo de processamento foi elaborado o fluxograma final de produção para as três formulações (1) PCON, paté com adição de BHT, (2) PAU3, paté com adição de 3% de medronho e (3) PAU6, paté com adição de 6% de medronho como se pode observar na figura 4.1.



**Figura 4.1-** Diagrama de fabrico otimizado para a produção do paté de lapa com adição de medronho

## 4.3 Análises físico-químicas do paté

A caracterização físico-química dos patés no dia da produção (tempo 0) pode-se observar na tabela 4.4. Em praticamente todos os parâmetros nutricionais (Hum, PB, GT, Cin e HC) não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ ) nos três patés, com exceção da FT. Estes parâmetros apresentam estes valores devido ao

conjunto de ingredientes adicionados e tipo de processamento, formando uma matriz alimentar semelhante ao nível nutricional.

De acordo com o esperado o parâmetro nutricional em maior quantidade em todos os patés é a Hum (aprox. 65%), seguido da GT (12-13%), PB (aprox. 11%), HC (7-8%) e Cin (aprox. 2%). As diferenças do teor de FT devem-se à presença do medronho e verifica-se que este parâmetro aumenta com a quantidade de medronho adicionada ao paté.

**Tabela 4.4-** Caracterização físico-química dos patés no tempo 0<sup>1</sup>

|                    | PCON                      | PAU3                       | PAU6                      |
|--------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Hum (%)            | 65,54 ± 0,15              | 65,50 ± 0,16               | 65,23 ± 0,07              |
| PB (%)             | 11,89 ± 0,03              | 11,82 ± 0,03               | 11,87 ± 0,07              |
| GT (%)             | 12,60 ± 0,23              | 12,67 ± 0,45               | 12,88 ± 0,39              |
| FT (%)             | 0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>  | 0,22 ± 0,02 <sup>b</sup>   | 0,80 ± 0,02 <sup>c</sup>  |
| Cin (%)            | 2,16 ± 0,20               | 1,92 ± 0,20                | 2,00 ± 0,20               |
| HC (%)             | 7,81 ± 0,40               | 8,07 ± 0,52                | 8,04 ± 0,60               |
| Cal (Kcal/100g)    | 192,19 ± 1,30             | 193,70 ± 2,53              | 195,49 ± 1,01             |
| Dz (N)             | 4,32 ± 0,04 <sup>c</sup>  | 3,75 ± 0,07 <sup>b</sup>   | 2,85 ± 0,06 <sup>a</sup>  |
| Ads (N.s)          | -2,08 ± 0,05 <sup>a</sup> | -1,38 ± 0,05 <sup>b</sup>  | -1,07 ± 0,05 <sup>c</sup> |
| pH                 | 6,81 ± 0,03 <sup>b</sup>  | 6,59 ± 0,03 <sup>a</sup>   | 6,55 ± 0,02 <sup>a</sup>  |
| Acd (%)            | 1,12 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 1,67 ± 0,00 <sup>b</sup>   | 1,66 ± 0,00 <sup>b</sup>  |
| L*                 | 34,47 ± 1,31 <sup>b</sup> | 33,15 ± 0,83 <sup>ab</sup> | 31,32 ± 0,91 <sup>a</sup> |
| a*                 | 1,31 ± 0,04               | 1,35 ± 0,12                | 1,21 ± 0,09               |
| b*                 | 28,44 ± 0,90              | 27,74 ± 0,94               | 29,26 ± 0,68              |
| TPC <sup>2</sup>   | 22,44 ± 1,87 <sup>c</sup> | 26,50 ± 1,28 <sup>b</sup>  | 30,65 ± 0,36 <sup>a</sup> |
| DPPH <sup>3</sup>  | 21,17 ± 1,38 <sup>a</sup> | 22,23 ± 1,05 <sup>a</sup>  | 28,83 ± 0,17 <sup>b</sup> |
| ORAC <sup>4</sup>  | 876,49 ± 60,50            | 1000,07 ± 194,42           | 1010,36 ± 154,97          |
| Tbars <sup>5</sup> | 1,17 ± 0,06 <sup>b</sup>  | 0,97 ± 0,03 <sup>a</sup>   | 0,89 ± 0,04 <sup>a</sup>  |

<sup>1</sup>Valores com letras diferentes (a-c) entre linhas correspondem a diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05); <sup>2</sup>Resultado expresso em mg de ácido gálico/100 g de fruto fresco; <sup>3</sup> Resultado expresso em percentagem de inibição de DPPH; <sup>4</sup> Resultado expresso em  $\mu$ mol equivalentes de trolox/100 g de fruto fresco; <sup>5</sup> Resultado expresso em mg de aldeído malónico/Kg de produto

O parâmetro Cal existente em todos os patés (191-196 Kcal/100 g) não apresenta diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value>0,05). As formulações tradicionais

de patés de origem animal, como paté de fígado de porco apresentam 249-334 Kcal/100 g (Echarte et al., 2004; Estévez et al., 2005a), enquanto que os patés de produtos da pesca, como salmão e anchova contêm 200-301 Kcal/100 g (Echarte et al., 2004), portanto os patés elaborados neste trabalho apresentam valor calórico semelhante ao dos produtos da pesca. Segundo Echarte et al. (2004), esta diversidade de resultados deve-se principalmente à proporção de gordura adicionada e ao teor de humidade do produto.

Relativamente aos parâmetros de textura, Dz e Ads, apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre todos os patés. O PCON ao dia 0 tem maior Dz e Ads que o PAU3 e o PAU6, sendo que o PAU6, apresenta os valores mais baixos nestes parâmetros de textura, logo a adição de medronho diminui os valores da Dz e da Ads. Nos patés, a Dz e a Ads, são parâmetros de qualidade que quando avaliados ao dia 0 (avaliação padrão) dependem da proporção gordura/humidade, teor de proteína, tipo de processamento e matriz do alimento (Estévez et al., 2006; Dinçer & Çakli, 2015).

Neste caso como os teores de gordura, humidade e de proteína e o tipo de processamento são semelhantes nos três patés, a explicação que se deve a estas variações dos parâmetros de Dz e Ads são devido à matriz alimentar dos três patés que é influenciada pela presença de medronho.

Como era de esperar os parâmetros pH e Acd apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre o PCON e os dois patés com adição de medronho (entre estes dois patés não há diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ )).

Isto sucede porque o pH e a acidez são parâmetros que estão fortemente ligados, ou seja, normalmente quanto maior for a quantidade de ácidos orgânicos do produto (efeito fruto) menor são os valores de pH.

A cor dos patés é medida através das coordenadas L\*, a\* e b\*. Apenas no L\* existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre o PCON (34,47±1,31) e o PAU6 (31,32±0,91), nas outras coordenadas não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ ). Isto indica que apenas a adição do extrato preparado à concentração de 6% (peso medronho/produto final) torna o paté mais escuro.

No parâmetro TPC existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre os 3 patés, verificando-se que ambos os patés com adição de extrato

de medronho contêm maior quantidade de compostos fenólicos do que o PCON (com adição de BHT), além de que o aumento da quantidade de medronho incrementa significativamente este parâmetro. Alguns autores como Ramanathan & Das (1992) e Ganhão et al. (2010) indicam que a adição de extratos envolvendo compostos fenólicos está correlacionada com o aumento da atividade antioxidante e previne eficazmente a oxidação lipídica dos produtos de origem animal processados. Sabendo que o TPC dá-nos uma estimativa da capacidade antioxidante é necessário consolidar esta avaliação da atividade antioxidante através do DPPH e do ORAC. No DPPH apenas existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre o PAU6 e os outros dois patés, ou seja, o PAU6 apresenta uma maior capacidade de inibir os radicais DPPH do que os outros dois patés.

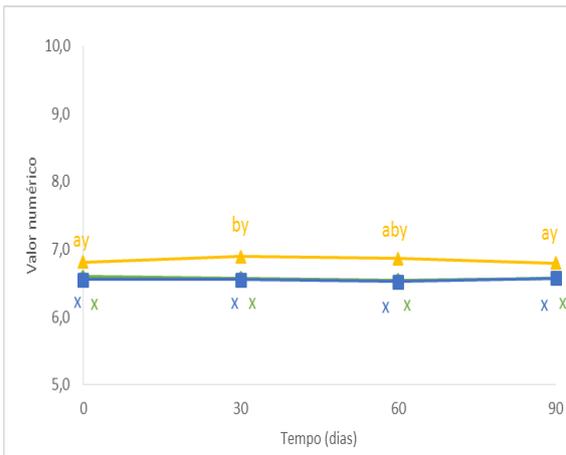
Quanto ao ORAC não se verificam diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ ), logo os três patés no dia 0 têm a mesma capacidade de inibição dos radicais de oxigénio. Através desta avaliação conjunta poderemos dizer que o PAU6 apresenta maior atividade antioxidante no tempo 0.

Finalmente, em relação ao parâmetro Tbars existem igualmente diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre o PCON e os outros dois patés. Uma vez que este parâmetro mede a oxidação lipídica do produto e apesar dos valores estarem dentro dos parâmetros de aceitabilidade segundo Al-Kahtani et al. (1996) para produtos da pesca (3mg de aldeído malónico/Kg de produto), o PCON apresenta um estado de oxidação lipídica mais avançada logo após a produção, ao contrário dos patés tratados com medronho que apresentam valores significativamente mais baixos de oxidação no mesmo instante. Este tipo de reação deve-se essencialmente à acumulação de produtos derivados da oxidação lipídica e formação de derivados lipídicos voláteis imediatamente após a produção dos patés (Estévez et al., 2007).

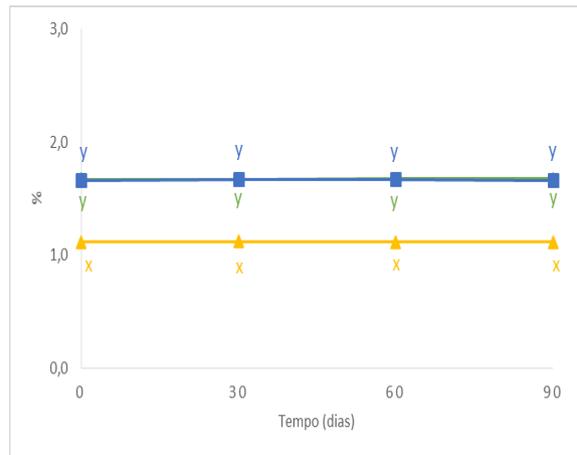
#### **4.4 Avaliação da estabilidade dos patés**

A avaliação da estabilidade dos patés ao longo do tempo de armazenamento em refrigeração (0, 30, 60 e 90 dias) está evidenciada nas figuras 4.2a e 4.2b e nos anexos 4 e 5. Para esta avaliação consideraram-se os seguintes parâmetros: pH, Acd, Dz, Ads, GT, TPC, DPPH, ORAC e Tbars.

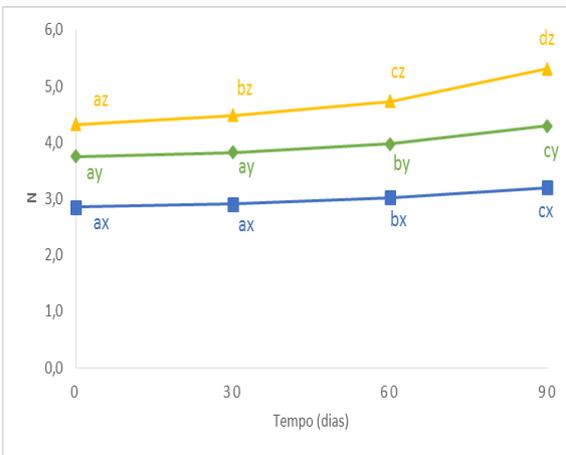
A) pH



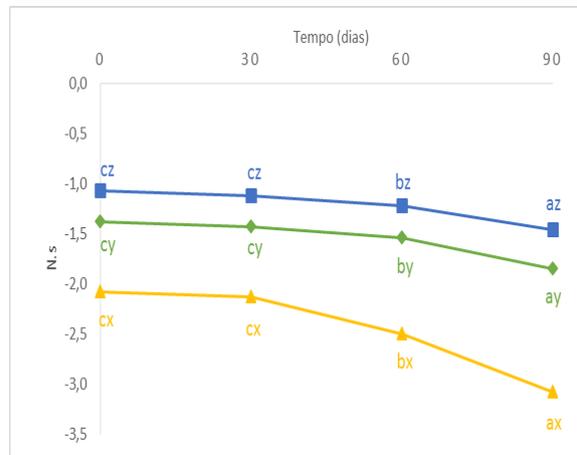
B) Acd



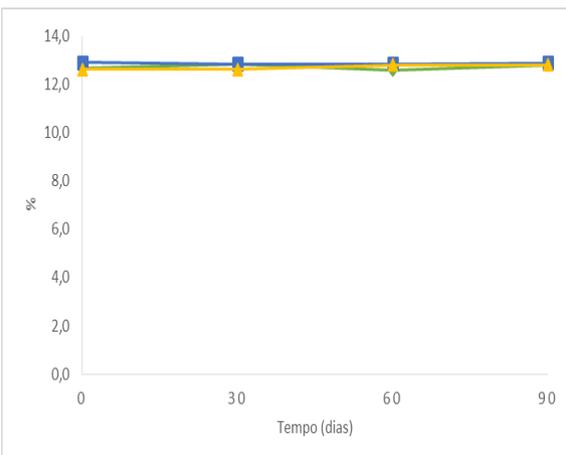
C) Dz



D) Ads

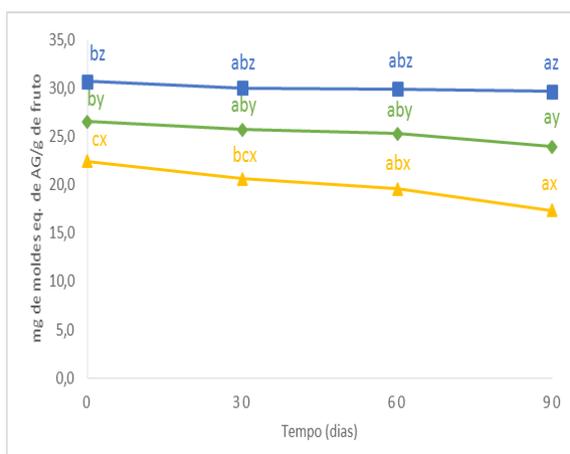


E) GT

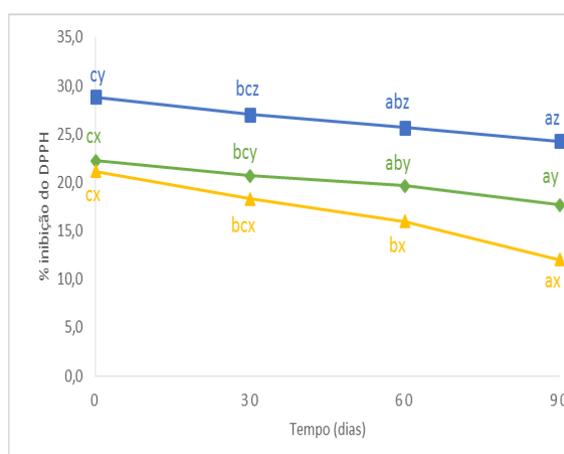


**Figura 4.2a-** Avaliação da estabilidade dos patês ao longo do tempo em armazenamento refrigerado (0, 30, 60 e 90 dias); Valores com letras diferentes entre linhas e colunas correspondem a diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value} < 0,05$ ), do mesmo produto ao longo do tempo (a-d) e do mesmo tempo em produtos diferentes (x-z), respectivamente.

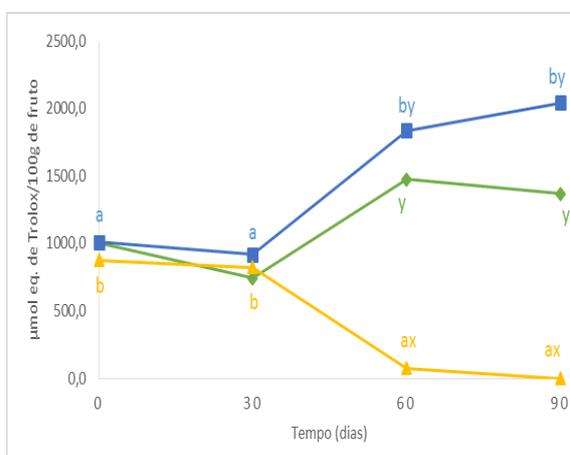
F) TPC



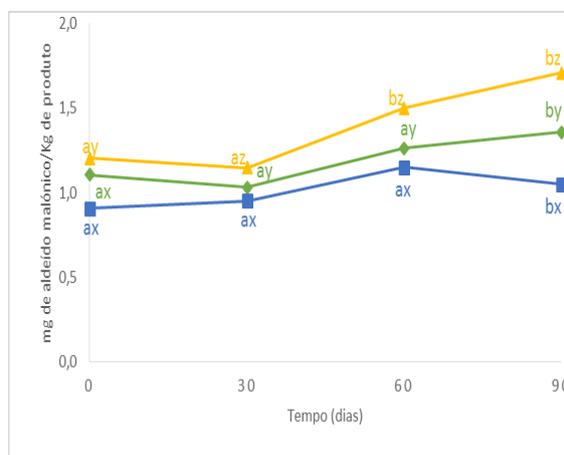
G) DPPH



H) ORAC



I) Tbars



◆ PAU3    ■ PAU6    ▲ PCON

**Figura 4.2b-** Avaliação da estabilidade dos patés ao longo do tempo em armazenamento refrigerado (0, 30, 60 e 90 dias); Valores com letras diferentes entre linhas e colunas correspondem a diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ), do mesmo produto ao longo do tempo (a-d) e do mesmo tempo em produtos diferentes (x-z), respectivamente.

Como se pode observar, nos parâmetros pH e Acd dos patés ao longo do tempo apenas existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) no PCON, apesar de no tempo 0 e 90 não se registarem essas diferenças, pode haver instabilidade do produto durante o período de armazenamento. Nos outros patés, PAU3 e PAU6, não existe variabilidade significativa ( $p\text{-value}>0,05$ ) o que pode indicar estabilidade do produto. Quando comparados os patés por tempo de armazenamento refrigerado verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) em

todos os tempos apenas entre o PCON e os outros dois patés, PAU3 e PAU6. Estes apresentam menores valores de pH que o PCON, devido à adição do medronho (rico em ácidos orgânicos) ao paté. A Acd apresenta praticamente a mesma tendência, ou seja dentro de cada tempo apenas há diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre o PCON e os dois patés (PAU3 e PAU6) devido às mesmas razões das diferenças no pH. Estes resultados ao nível de estabilidade oxidativa são positivos, pois a estabilização destes dois parâmetros ao longo do tempo é indicativa que pode não ter ocorrido alterações significativas dos ácidos gordos polinsaturados que poderia levar a perdas de qualidade do produto.

No parâmetro de Dz verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre os patés ao longo do tempo devido ao aumento da Dz a partir do dia 0, porém nos patés PAU3 e PAU6 a variabilidade significativa ocorre apenas a partir do dia 60, enquanto que no PCON é mais cedo, dia 30. Considerando a avaliação entre produtos para o mesmo tempo existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) em todos os tempos, isto porque o PAU3 e principalmente o PAU6 apresentam menor Dz. Estes resultados indicam que este parâmetro aumenta com o tempo de armazenamento e que a adição do medronho diminui os níveis de Dz do paté e inibe a variação deste parâmetro, isto porque houve um aumento desde o dia 0 até ao dia 90 de 18,64%, 12,59% e 10,94% nos patés PCON, PAU3 e PAU6, respetivamente. Segundo Fernández-López et al. (2004) e Estévez et al. (2006), o aumento da dureza nos patés deve-se à perda de humidade durante o período de armazenamento em refrigeração, polimerização dos lípidos e das proteínas e desestabilização da emulsão, ou seja a fração lipídica tende a separar-se da fração aquosa devido à oxidação das proteínas responsáveis pela ligação das mesmas.

Quanto à Ads existem igualmente diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) em todos os patés ao longo do tempo, indicada pelo aumento deste parâmetro a partir do dia 0 e tal como na Dz, na Ads verifica-se igualmente diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre os produtos em todos os tempos. Estes dados indicam que a variabilidade que decorreu ao longo do tempo deve-se ao tempo de armazenamento e os níveis de Ads são menores nos produtos com adição do medronho. Embora não tenha sido estudada a oxidação proteica ao longo do tempo, Estévez et al. (2005b), refere que esta é uma das principais razões que pode promover a variabilidade da Ads, pois a degradação das proteínas responsáveis por ligar a fração

lipídica com a fração aquosa das emulsões favorecem a desestabilização da emulsão e consequente variabilidade da Ads. Portanto a adição do medronho diminui mais eficazmente a variabilidade deste parâmetro e consequentemente reduz a quantidade de gordura à superfície dos produtos devido à degradação das proteínas responsáveis por ligar a fase aquosa à fase lipídica.

Como se pode observar, o parâmetro GT não exhibe diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ ) ao longo do tempo nem entre patés por tempo. Nos produtos de origem marinha existe elevada quantidade de ácidos gordos polinsaturados (Brazão et al., 2003). Apesar destes não terem sido quantificados ao longo do tempo, segundo Vareltzis et al. (1997), nos produtos da pesca processados com adição de antioxidantes de origem vegetal há uma diminuição da degradação dos ácidos gordos polinsaturados e consequentemente menores níveis de oxidação lipídica, quando comparado o mesmo produto sem adição de antioxidante ou com outros antioxidantes sintéticos, podendo assim explicar a não variabilidade do parâmetro de GT ao longo do tempo.

Relativamente ao parâmetro TPC verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) nos patés ao longo do tempo. De referir que, nos patés PAU3 e PAU6 a variabilidade ocorre apenas no dia 90, enquanto que no PCON é a partir do dia 60. Assim confirma-se que os patés com adição de medronho têm este parâmetro mais estabilizado, isto porque, houve um decréscimo deste parâmetro desde o dia 0 até ao dia 90 de 29,49%, 10,83% e de 3,48% nos produtos PCON, PAU3 e PAU6, respetivamente. Entre produtos no mesmo tempo, as diferenças comportam-se de igual forma nos quatro tempos, ou seja verificam-se diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) comprovando que o teor de polifenóis está relacionado diretamente com a adição de medronho. Verificando-se que os valores de TPC se apresentam na seguinte ordem PAU6>PAU3>PCON em todos os tempos. Assim é fulcral perceber se estes oferecem capacidade antioxidante ao produto e consequente diminuição da oxidação lipídica, pois poderá ter ocorrido a extração de outros compostos que reagindo com o reagente de Follin-Ciocalteau poderão ser contabilizados como compostos fenólicos sem o serem na realidade, portanto não exercem capacidade antioxidante ao produto. O contrário pode ocorrer, ou seja este método pode não quantificar todos os compostos fenólicos (apolares) presentes nos produtos e como estes estão presentes vai haver maior capacidade antioxidante (Ayaz et

al., 2000; Alarcão-E-Silva et al., 2001; Prior et al., 2005; Ganhão et al., 2010). No entanto vários estudos indicam que no caso dos produtos adicionados com medronho, este parâmetro é correlacionável com a atividade antioxidante (Ganhão et al., 2010).

Os parâmetros estudados neste trabalho que permitem avaliar a atividade antioxidante dos patés são o DPPH e o ORAC. No parâmetro DPPH existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) ao longo do tempo em todos os patés, isto porque os seus comportamentos a partir do dia 60 apresentam diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o dia 0, contudo de acordo com a figura 4.2b) existe maior tendência de percentagem de perda de capacidade antioxidante deste parâmetro no PCON quando comparados o dia 0 com o dia 90 (PCON 43,17%, PAU3 20,51% e PAU6 15,81%). Relativamente à comparação entre os produtos no mesmo tempo, no dia 0 apenas existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre o PAU6 e os outros dois patés (PCON e PAU3), porém nos tempos seguintes (dia 30, 60 e 90) há diferenças estatisticamente significativas entre os produtos nestes tempos, contudo os patés com adição de medronho exibem maiores valores de ” % de inibição de DPPH” (por exemplo no dia 90 o PAU6, PAU3 e PCON apresentam  $24,27 \pm 0,85$ ,  $17,67 \pm 0,45$  e  $12,03 \pm 1,06$ , respetivamente). A consistência entre os valores de TPC e o método do DPPH como metodologia de avaliação da atividade antioxidante neste tipo de matriz é suportada pela significativa correlação positiva ( $R^2= 0,915$ ,  $p\text{-value}<0,01$ ). Assim ao comparar os resultados do DPPH com o TPC (figura 4.2b) verifica-se que a diminuição da quantidade de compostos fenólicos traduz-se numa diminuição da capacidade de inibição do radical de DPPH. Em relação ao parâmetro ORAC, ao longo do tempo apenas há diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) no PCON e no PAU6 a partir do dia 60. No caso do PCON há um decréscimo deste parâmetro enquanto que no PAU6 ocorre um aumento do mesmo, sendo que Kahkonen et al. (2001) e Zulueta et al. (2009), indicam que os compostos fenólicos reagem com outros compostos antioxidantes sinérgicos como o ácido ascórbico (presente no medronho) permitindo aumentar/potenciar a capacidade antioxidante e esta poderá ser a razão por este aumento do parâmetro de ORAC no PAU6. Quando efetuado o estudo comparativo entre o TPC e ORAC foi encontrada uma correlação positiva, mas inferior ( $R^2= 0,682$ ,  $p\text{-value}<0,01$ ) à referida com o DPPH.

Quanto à variabilidade entre amostras para o mesmo tempo, nos dias 0 e 30 não se verificam diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ ), mas a partir do dia 60 verificam-se diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre o PCON e os patés com adição de medronho, estes últimos apresentam valores de ORAC muito superiores, demonstrando que o medronho possui maior capacidade antioxidante na inibição deste radical do que o BHT.

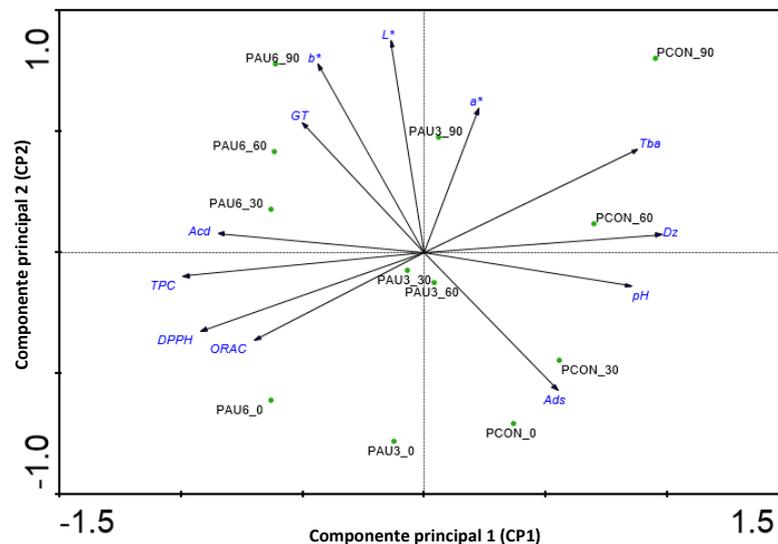
Por fim, no parâmetro Tbars verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre os patés ao longo do tempo, verificando-se o aumento deste a partir do dia 0, contudo nos patés PAU3 e PAU6 a variabilidade ocorre apenas no dia 90, enquanto que no PCON é a partir do dia 60.

Assim como neste trabalho o principal parâmetro que permite avaliar a oxidação lipídica é o Tbars, verifica-se que o PAU3 e o PAU6 são produtos com maior estabilidade oxidativa ao longo tempo quando comparados com o PCON, isto porque a percentagem de aumento deste parâmetro no PCON, PAU3 e PAU6 foi de 28,66%, 27,61% e 17,59%, respetivamente desde o dia 0 até ao dia 90. Entre produtos no mesmo tempo as diferenças comportam-se de igual forma nos dias 30, 60 e 90, ou seja verificam-se diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) nos três produtos dentro destes tempos.

Segundo Estévez et al. (2007), é previsível que o aumento da oxidação lipídica se deva à degradação dos ácidos gordos polinsaturados durante o armazenamento em refrigeração e conseqüente acumulação de produtos derivados da oxidação lipídica e formação de derivados lipídicos voláteis. Contudo verifica-se que dentro deste parâmetro e segundo Al-Kahtani et al. (1996), nenhum produto se encontra inaceitável para consumo, uma vez que não ultrapassaram o valor de 3 mg de aldeído malónico/Kg de produto.

Pelos resultados obtidos mediante a análise de componentes principais (figura 4.3), verifica-se que as duas primeiras componentes explicam 76% da variância total do conjunto de dados (52,6% e 23,4%, para CP1 e CP2, respetivamente). Deste modo, os parâmetros que são mais preponderantes para explicar a variabilidade total dos dados são: Tbars, Dz, DPPH, TPC,  $b^*$  e  $L^*$ , uma vez que se afastam mais do centro da figura 4.3, é também possível observar que o TPC e os parâmetros da atividade antioxidante (DPPH e ORAC) são inversamente proporcionais ao parâmetro da oxidação lipídica (Tbars), o que vem comprovar os resultados encontrados no estudo através da

correlação de Pearson entre o TBars e DPPH e o ORAC ( $R^2 = -0,921$ ,  $p\text{-value} < 0,01$  e  $R^2 = -0,569$ ,  $p\text{-value} < 0,01$ , respetivamente) isto é, produtos com menores níveis de oxidação lipídica exibem maior capacidade antioxidante como comprovado com outros autores (Estévez et al., 2007; Ganhão et al., 2011).



**Figura 4.3-** Diagrama da análise de componentes principais (PCA) dos patés ao longo do tempo de armazenamento refrigerado. PCON- Paté com adição de BHT; PAU3- Paté de lapa com adição de medronho a 3%; PAU6- Paté de lapa com adição de medronho a 6%; Acd- Acidez total; Ads- Adesividade; DPPH- Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; Dz- Dureza; GT- Gordura total; ORAC- Capacidade de redução dos radicais de oxigénio; Tba- Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TPC- Quantificação de polifenóis; L\*,a\*,b\*- Coordenadas da cor.

#### 4.5 Avaliação dos parâmetros da cor nos patés

Os parâmetros da cor são uma importante ferramenta de qualidade alimentar que pode influenciar o consumidor na escolha do produto alimentar. Ao observar a tabela 4.5 verifica-se que existem diferenças significativas no L\*, a\* e b\* no armazenamento refrigerado de cada paté durante os 90 dias.

Alguns fatores podem ajudar a explicar a variabilidade dos resultados e algumas tendências. De acordo com Fuentes-Zaragoza et al. (2009) e Sánchez-Zapata et al. (2011), onde ambos elaboraram um paté de produtos da pesca, a coordenada L\* tende a aumentar durante o tempo de armazenamento em refrigerado, o que se confirma em todos os patés elaborados no presente trabalho, segundo os mesmos, esta coordenada varia também com a capacidade de retenção de água e água disponível à superfície que pode ser influenciada pelo tempo de armazenamento em refrigeração, e que pode ser

explicado pelo aumento da Dz e da Ads demonstrada anteriormente. Em relação à coordenada a\* verifica-se que há uma tendência de aumento ao longo do tempo de armazenamento, segundo Pérez-Álvarez et al. (2004) e Sánchez-Zapata et al. (2011), os resultados esperados desta coordenada deveriam de diminuir ao longo do tempo devido à diminuição dos níveis de antioxidantes, como se provou na atividade antioxidante (DPPH e ORAC) que em geral diminuiu ao longo do tempo, porém estes resultados não se verificaram neste trabalho podendo ser explicados por diferentes comportamentos das matrizes dos alimentos, uma vez que estes autores efetuaram este estudo noutros produtos da pesca com composição bioquímica diferente das lapas. Os mesmos autores referem que os valores da coordenada b\* tendem também a aumentar ao longo do tempo de armazenamento, o que se verificou nos três patés em estudo.

**Tabela 4.5-** Avaliação instrumental da evolução dos parâmetros de cor ao longo do tempo<sup>1</sup>

|    |        | PCON                       | PAU3                        | PAU6                       |
|----|--------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| L* | Dia 0  | 34,47 ± 1,31 <sup>ay</sup> | 33,15 ± 0,83 <sup>axy</sup> | 31,32 ± 0,91 <sup>ax</sup> |
|    | Dia 30 | 42,73 ± 0,48 <sup>bx</sup> | 43,22 ± 0,53 <sup>bx</sup>  | 51,20 ± 0,41 <sup>by</sup> |
|    | Dia 60 | 42,55 ± 0,75 <sup>bx</sup> | 44,44 ± 0,63 <sup>by</sup>  | 52,32 ± 0,39 <sup>bz</sup> |
|    | Dia 90 | 46,96 ± 0,48 <sup>cx</sup> | 48,26 ± 0,70 <sup>cx</sup>  | 55,25 ± 0,68 <sup>cy</sup> |
| a* | Dia 0  | 1,31 ± 0,04 <sup>a</sup>   | 1,35 ± 0,12 <sup>a</sup>    | 1,21 ± 0,09 <sup>a</sup>   |
|    | Dia 30 | 1,42 ± 0,02 <sup>ay</sup>  | 1,65 ± 0,02 <sup>bz</sup>   | 1,30 ± 0,02 <sup>ax</sup>  |
|    | Dia 60 | 1,46 ± 0,11 <sup>abx</sup> | 1,74 ± 0,04 <sup>bcy</sup>  | 1,48 ± 0,02 <sup>bx</sup>  |
|    | Dia 90 | 1,59 ± 0,02 <sup>bx</sup>  | 1,84 ± 0,03 <sup>cy</sup>   | 1,59 ± 0,05 <sup>bx</sup>  |
| b* | Dia 0  | 28,44 ± 0,90 <sup>a</sup>  | 27,74 ± 0,94 <sup>a</sup>   | 29,26 ± 0,68 <sup>a</sup>  |
|    | Dia 30 | 27,11 ± 0,51 <sup>ax</sup> | 27,69 ± 0,24 <sup>ax</sup>  | 33,02 ± 0,16 <sup>by</sup> |
|    | Dia 60 | 28,76 ± 0,56 <sup>ax</sup> | 28,70 ± 0,56 <sup>ax</sup>  | 33,08 ± 0,27 <sup>by</sup> |
|    | Dia 90 | 31,61 ± 0,48 <sup>bx</sup> | 31,18 ± 0,35 <sup>bx</sup>  | 32,90 ± 0,48 <sup>by</sup> |

<sup>1</sup>Valores com letras diferentes entre colunas e linhas correspondem a diferenças significativas ( $p\text{-value} < 0,05$ ), do mesmo produto ao longo do tempo (a-c) e do mesmo tempo em produtos diferentes (x-z), respetivamente

#### 4.6 Análises microbiológicas dos patés

Os resultados das análises microbiológicas realizadas durante o presente trabalho encontram-se na tabela 4.6. Em todos os produtos e tempos apenas houve crescimento dos microrganismos totais (aeróbios e anaeróbios) a partir do dia 60. Nos microrganismos patogénicos *E.coli*, Enterobacterias, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* não se registou crescimento. Em ambos os microrganismos totais

(aeróbios e anaeróbios) ocorreu um aumento do crescimento a partir do dia 60, contudo registou-se maior tendência de crescimento no produto PCON do que nos produtos PAU3 e PAU6. Entre produtos com adição de medronho, o PAU6 teve a menor tendência de crescimento microbiano.

**Tabela 4.6-** Análises microbiológicas dos patés ao longo do tempo de armazenamento refrigerado

|  |      | <b>Dia 0</b> | <b>Dia 30</b> | <b>Dia 60</b>        | <b>Dia 90</b>        |
|--|------|--------------|---------------|----------------------|----------------------|
| Totais aeróbios <sup>1</sup>               | PCON | 0            | 0             | 4,55*10 <sup>4</sup> | 1,73*10 <sup>5</sup> |
|  | PAU3 | 0            | 0             | 1,92*10 <sup>4</sup> | 2,76*10 <sup>4</sup> |
|  | PAU6 | 0            | 0             | 1,54*10 <sup>4</sup> | 2,12*10 <sup>4</sup> |
| Totais anaeróbios <sup>1</sup>             | PCON | 0            | 0             | 6,73*10 <sup>4</sup> | 2,28*10 <sup>5</sup> |
|  | PAU3 | 0            | 0             | 2,45*10 <sup>4</sup> | 3,17*10 <sup>4</sup> |
|  | PAU6 | 0            | 0             | 1,55*10 <sup>4</sup> | 2,28*10 <sup>4</sup> |
| <i>E.coli</i> <sup>1</sup>                 | PCON | 0            | 0             | 0                    | 0                    |
|  | PAU3 | 0            | 0             | 0                    | 0                    |
|  | PAU6 | 0            | 0             | 0                    | 0                    |
| Enterobacterias <sup>1</sup>               | PCON | 0            | 0             | 0                    | 0                    |
|  | PAU3 | 0            | 0             | 0                    | 0                    |
|  | PAU6 | 0            | 0             | 0                    | 0                    |
| <i>Salmonella</i> spp.                     | PCON | Ausência     | Ausência      | Ausência             | Ausência             |
|  | PAU3 | Ausência     | Ausência      | Ausência             | Ausência             |
|  | PAU6 | Ausência     | Ausência      | Ausência             | Ausência             |
| <i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup> | PCON | 0            | 0             | 0                    | 0                    |
|  | PAU3 | 0            | 0             | 0                    | 0                    |
|  | PAU6 | 0            | 0             | 0                    | 0                    |

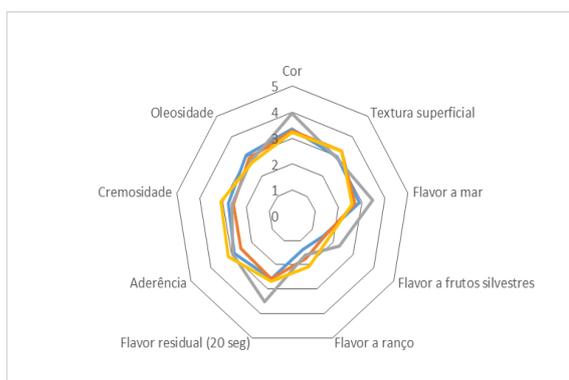
<sup>1</sup>Resultado expresso em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g).

Estes resultados devem-se ao tipo de processamento térmico (pasteurização) e armazenamento (refrigeração) dos patés, ao tipo de matriz alimentar e à adição de medronho nos patés, uma vez que os compostos fenólicos provenientes de frutos silvestres têm poder anti-microbiano em microrganismos como a *Salmonella* spp. e a *E.coli* (Puupponen-Pimia et al., 2005; Heinonen, 2007). Os mecanismos que promovem a inibição destes microrganismos baseiam-se na desestabilização da membrana citoplasmática, ações diretas no metabolismo microbiano e privação de substratos requeridos para o crescimento microbiológico (Puupponen-Pimia et al., 2005).

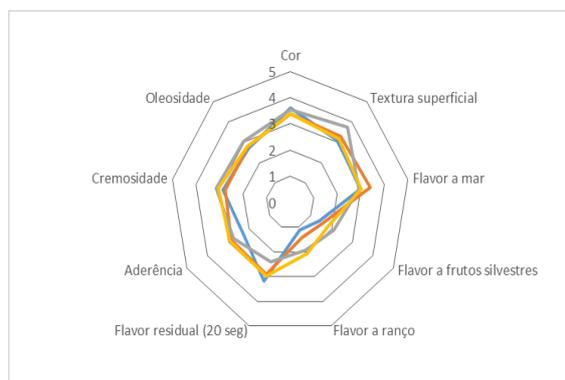
#### 4.7 Perfil sensorial-Avaliação dos descritores sensoriais dos patés ao longo do tempo

A análise do perfil sensorial dos patés relativamente à estabilidade ao longo do tempo encontra-se representada na figura 4.4. Quanto ao perfil sensorial verifica-se que nos descritores referentes à aparência (cor e textura superficial) e textura (aderência, cremosidade e oleosidade) não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ ) pelo painel de provadores ao longo do tempo em todos os produtos (PCON, PAU3 e PAU6). Relativamente aos descritores relacionados com o flavor, apenas não há diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ ) no flavor a mar. Nos restantes descritores (flavor a ranço, flavor a frutos silvestres e flavor residual) verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) em todos os patés a partir do dia 60 para valores superiores ou seja, as classificações atribuídas a estes descritores (entre 1 e 5) apresentaram alterações significativas. No flavor a frutos silvestres verifica-se que nos produtos PAU3 e PAU6, o aumento do tempo de armazenamento estimula a deteção deste descritor pelo painel de provadores.

A) PCON



B) PAU3



C) PAU6

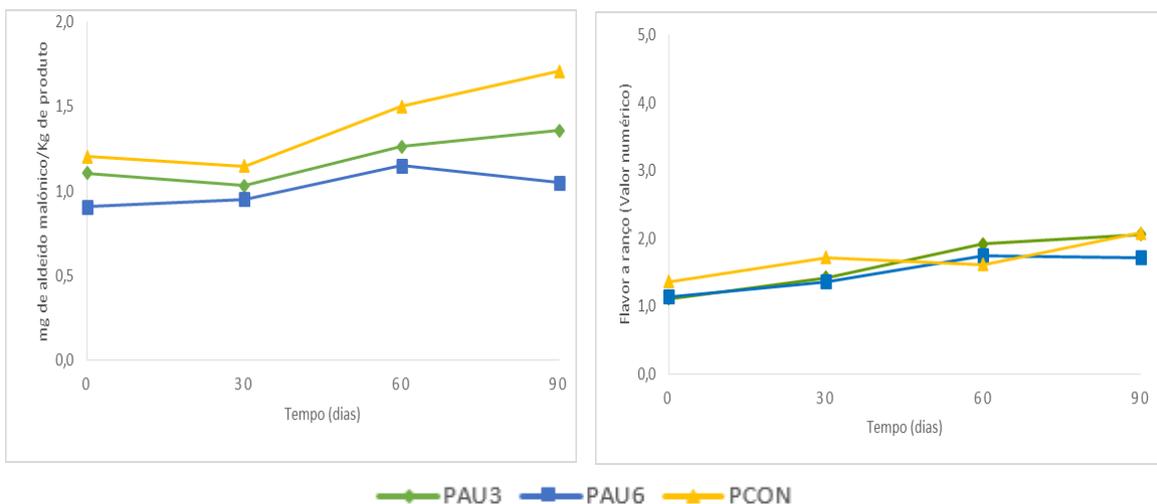


**Figura 4.4-** Avaliação dos descritores do paté ao longo do tempo

O flavor a ranço é um importante descritor indicativo da presença da oxidação lipídica. Na figura 4.5 pode-se observar que a tendência da evolução da oxidação lipídica (Tbars)/flavor a ranço (painel de provadores) ao longo do tempo de armazenamento refrigerado apresenta comportamento similar sendo que o PAU6 apresenta uma menor variação indicando que o mesmo será mais estável e terá melhor qualidade que os outros, sendo este também o paté que avaliado pelo painel de provadores apresenta menor flavor a ranço no final dos 90 dias de armazenamento.

A) Tbars (parâmetro-físico-químico)

B) Flavor a ranço (descriptor sensorial)



**Figura 4.5-** Avaliação do Tbars (parâmetro físico-químico) e flavor a ranço (descriptor sensorial – painel de provadores) dos patés ao longo do tempo de armazenamento refrigerado

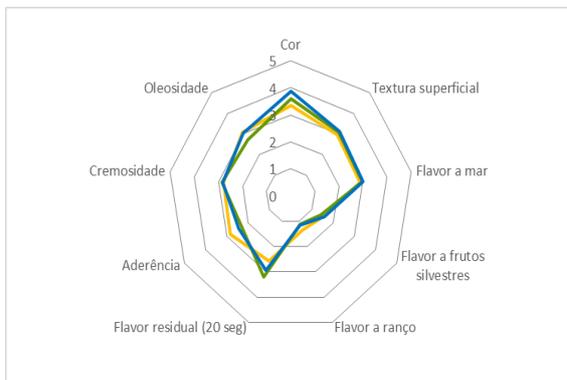
#### 4.8 Perfil sensorial-Avaliação dos descritores dos diferentes patés por tempo

A análise dos descritores (perfil sensorial) dos patés por tempo de armazenamento refrigerado encontra-se representada na figura 4.6.

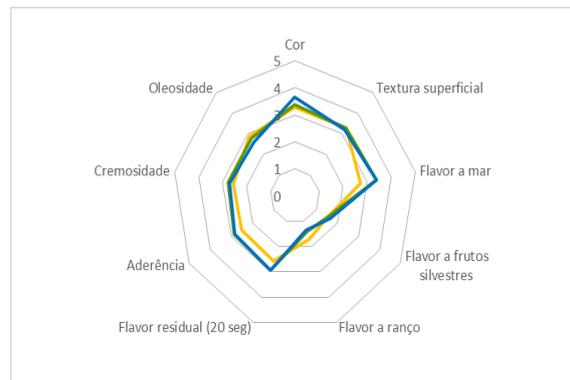
No dia 0 não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value} > 0,05$ ) dos descritores nos três produtos pelos provadores mostrando que os três produtos ao nível sensorial seriam semelhantes no dia 0. Relativamente ao dia 30 apenas foram detetadas diferenças estatisticamente significativas no flavor a mar ( $p\text{-value} < 0,05$ ) e flavor residual ( $p\text{-value} < 0,05$ ), logo o tipo de produto afeta a classificação dada ao descritor, ou seja, em ambos, nos produtos PAU3 e PAU6 os provadores detetaram maior intensidade dos mesmos quando comparados com o produto PCON.

No dia 60 foram detetadas diferenças estatisticamente significativas em vários descritores. Nos descritores relacionados com a aparência, ou seja cor e textura superficial foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os produtos ( $p\text{-value}<0,05$ ). Relativamente à cor os provadores indicaram que o PAU6 apresenta uma cor significativamente mais próxima do “verde-claro”, comparativamente com o PAU3 e PCON. Quanto à avaliação da textura superficial os provadores indicaram que o PAU6 apresentou um aspeto superficial mais heterogéneo que o PAU3 e PCON, respetivamente. Ainda no dia 60, nos descritores relacionados com o flavor, os provadores apenas detetaram diferenças estatisticamente significativas no flavor a frutos silvestres ( $p\text{-value}<0,05$ ) e flavor residual ( $p\text{-value}<0,05$ ).

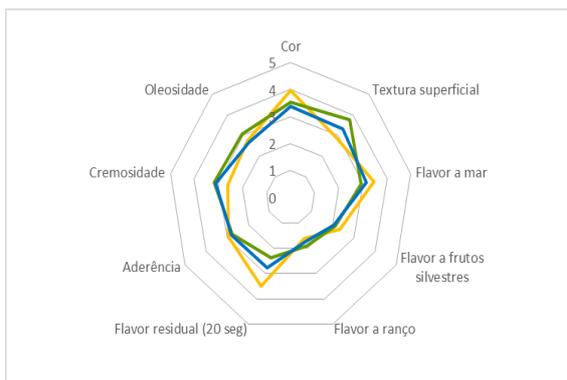
## A) TEMPO 0



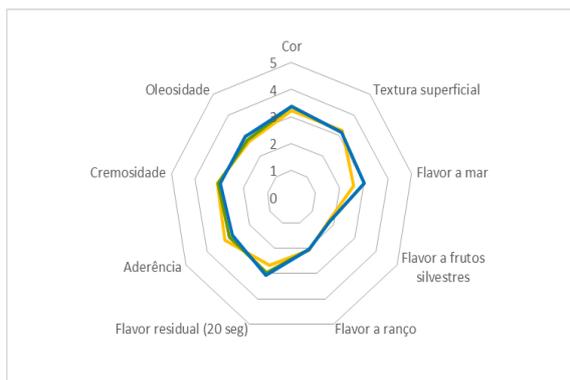
## B) TEMPO 30



## C) TEMPO 60



## D) TEMPO 90



— PAU3 — PAU6 — PCON

**Figura 4.6-** Avaliação dos descritores dos diferentes patés por tempo

Nos parâmetros relacionados com a textura no dia 60 foram detetadas diferenças estatisticamente significativas na aderência ( $p\text{-value}<0,05$ ) e na oleosidade ( $p\text{-value}<0,05$ ).

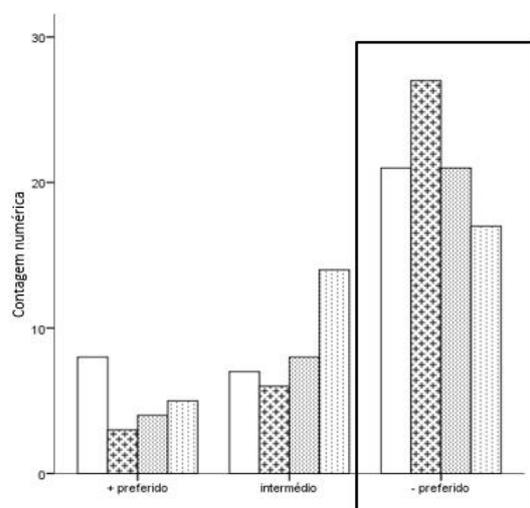
$value < 0,05$ ). Tal como no parâmetro físico-químico Ads, foi detetado maior aderência no PCON, seguido do PAU3 e PAU6, respetivamente, podendo este fator ter elevada importância na aceitabilidade do produto perante o painel de provadores. Relativamente à oleosidade o PAU3 apresentou-se mais húmido (maior aproximação da âncora “Manteiga de vaca”) do que o PAU6 e PCON. Neste descritor houve maior disparidade de resultados, sendo que o esperado seria o PAU3 e o PAU6 apresentarem-se mais húmidos do que o PCON, uma vez que no parâmetro físico-químico Dz estes apresentaram-se menos duros que o PCON. A avaliação sensorial neste dia é bastante importante, uma vez que em alguns parâmetros físico-químicos como o ORAC começaram a surgir diferenças estatisticamente significativas a partir do dia 60, verificando-se que a partir deste dia há maiores diferenças de grande parte dos parâmetros físico-químicos, como a Dz, Ads, TPC, DPPH e Tbars, sendo que ao nível de estabilidade o PAU6 apresenta-se mais estável do que o PAU3 e o PCON como o menos estável.

Finalmente, no tempo 90 apenas foram detetadas diferenças estatisticamente significativas no flavor a frutos silvestres ( $p-value < 0,05$ ), ou seja os provadores consideraram que o mesmo seria mais intenso significativamente no PAU6, seguido do PAU3 e PCON seria o menos intenso, como esperado. Apesar de não terem sido detetadas diferenças estatisticamente significativas em outros descritores como o flavor a ranço ( $p-value > 0,05$ ), neste há uma tendência para os provadores detetarem maior intensidade no PCON, seguido do PAU3 e do PAU6 (menos intenso). Contudo no dia 90 as diferenças entre produtos deveriam de seguir a mesma tendência ou até mesmo haver maior variabilidade do que no dia 60, uma vez que observando os gráficos 4.2a e 4.2b as diferenças entre produtos acentuam-se.

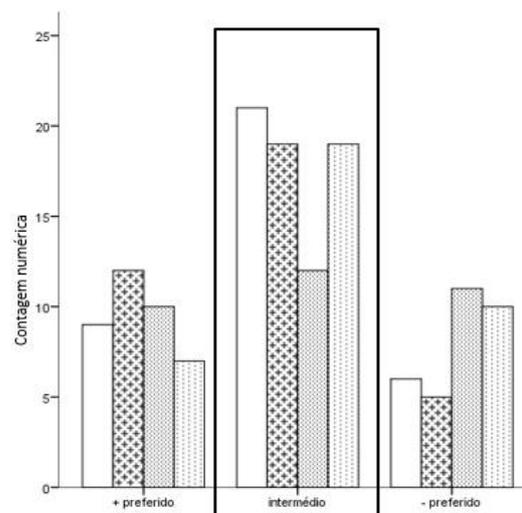
#### **4.9 Teste de preferência sensorial**

A avaliação da preferência dos patés encontra-se representada na figura 4.7. Relativamente à preferência verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $P-value > 0,05$ ) dos patés ao longo do tempo. Contudo, verifica-se tendencialmente que houve uma maior concentração de respostas avaliadas como “mais preferido” no PAU6 durante todos os tempos, “preferência intermédia” no PAU3 e “menos preferido” no PCON, demonstrando que o produto PAU6, também ao nível sensorial foi bem aceite e distinto dos outros dois, PAU3 e PCON.

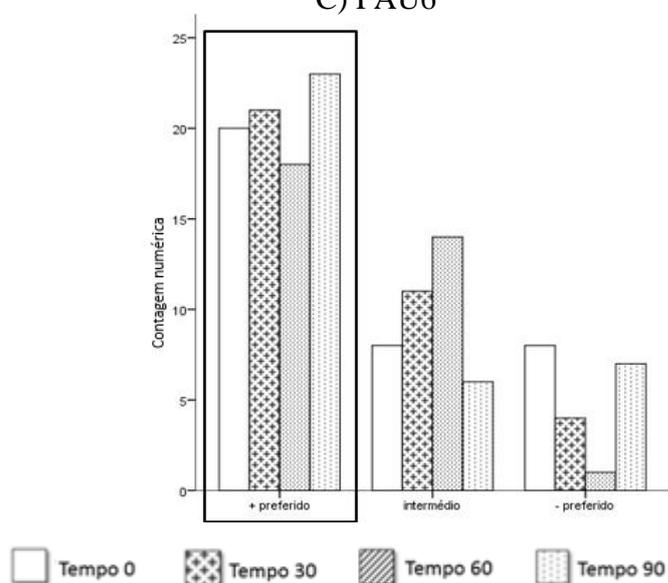
A) PCON



B) PAU3



C) PAU6

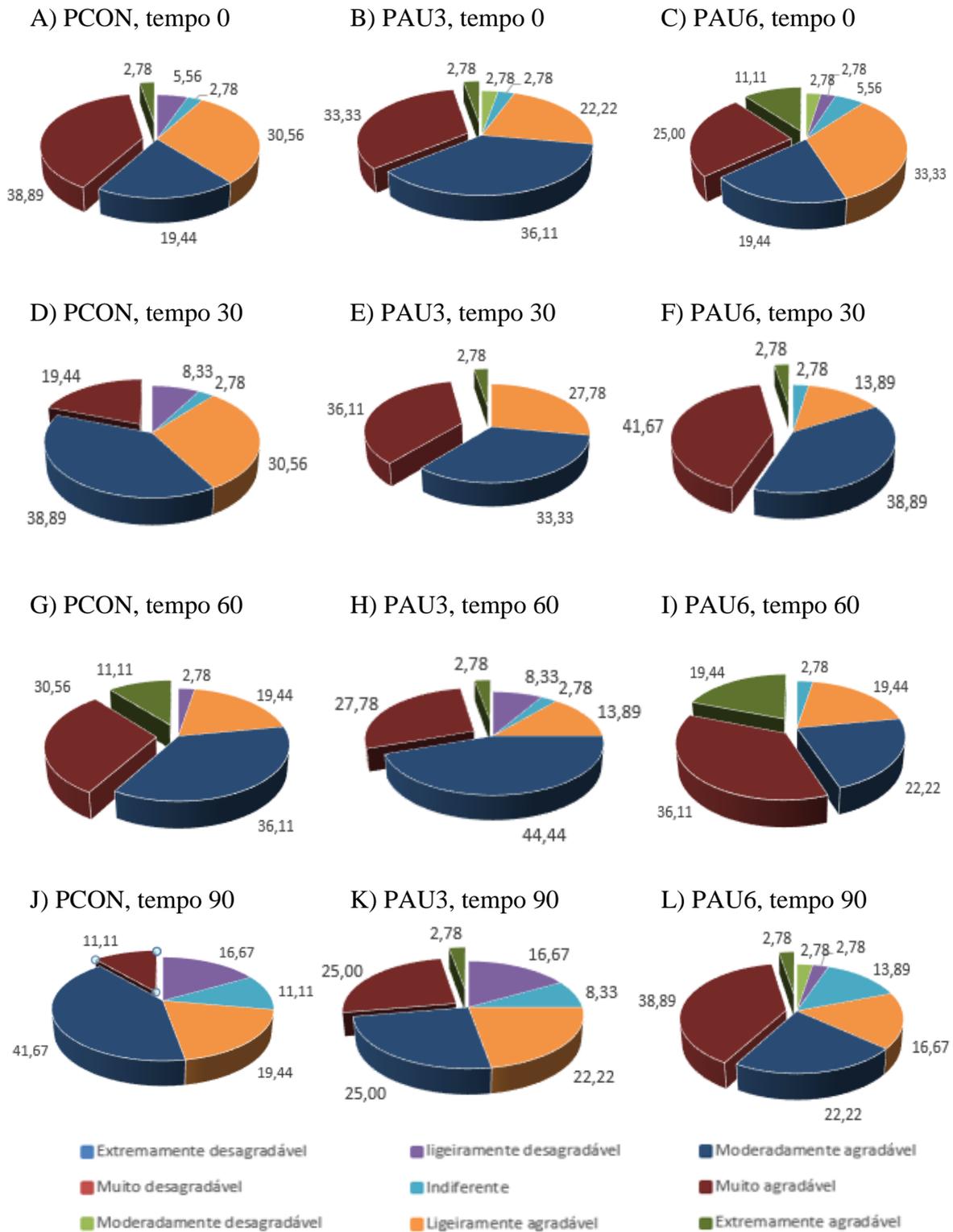


Tempo 0  
 Tempo 30  
 Tempo 60  
 Tempo 90

**Figura 4.7-** Avaliação sensorial da preferência dos patés

#### 4.10 Testes de aceitabilidade sensorial

Os testes de aceitabilidade são de natureza afetiva, transmitem emoções e funcionam como complemento de aceitação sensorial no desenvolvimento de novos produtos. Na figura 4.8 estão evidenciados os resultados da avaliação hedónica utilizando uma escala de nove pontos (Extremamente desagradável, Muito desagradável, Moderadamente desagradável, Ligeiramente desagradável, Indiferente, Ligeiramente agradável, Moderadamente agradável, Muito agradável e Extremamente agradável).



**Figura 4.8-** Avaliação da aceitabilidade sensorial dos patés (escala hedónica de nove pontos); Nos gráficos circulares apenas estão referidas as sete categorias de respostas efetivas dos provedores dentro das nove categorias da escala hedónica.

No tempo 0 verifica-se que os provadores qualificaram o somatório das duas escalas “Muito agradável” e “Extremamente agradável” de forma semelhante em todos os produtos. Nos dias 30 e 60 verifica-se que existe uma tendência para que o PAU6 se destaque do PCON e PAU3 para níveis de aceitabilidade superiores. Por fim, no tempo 90 ocorre maior diferenciação entre os três produtos, sendo que o produto com menor aceitabilidade foi o PCON, com aceitabilidade intermédia o PAU3 e com maior aceitabilidade por parte dos provadores o PAU6. Sendo assim, tal como no teste de preferência também neste teste existe maior tendência para os provadores selecionarem o PAU6 (antioxidante natural) como melhor produto, tornando-o como uma alternativa fiável ao PCON.



---

## 5- CONCLUSÃO

---

O desenvolvimento de um novo produto pode ser visto como uma oportunidade de introduzir no mercado um produto inovador que responda às necessidades do consumidor, que funcione como alternativa a outros produtos e que aproveite o uso de matérias-primas acessíveis e que valorizem a região.

As principais matérias-primas utilizadas no desenvolvimento deste novo produto (paté) são as lapas e o medronho. A nível físico-químico e funcional de acordo com este trabalho, as lapas caracterizam-se por ser um produto bastante rico a nível nutricional e o medronho por possuir elevada capacidade antioxidante.

A produção do paté de lapa envolveu um conjunto de ingredientes e etapas que foram otimizadas e padronizadas por forma a oferecer um produto adequado a nível de qualidade e de segurança alimentar. As etapas chave foram a cozedura a vapor das lapas, a mistura dos ingredientes com recurso à *Cutter*, o tratamento térmico final (pasteurização) e o armazenamento em refrigeração.

As análises físico-químicas dos patés ao dia 0 demonstraram que a maior parte dos parâmetros físico-químicos se apresentam semelhantes entre as 3 formulações, existindo apenas alguma variação em parâmetros funcionais como textura, atividade antioxidante, pH e Acd, devido à adição de medronho na matriz alimentar dos patés PAU3 e PAU6.

Ao verificar a estabilidade dos produtos ao longo do tempo constata-se que os patés com adição de medronho, PAU3 e, principalmente o PAU6, apresentam parâmetros mais estabilizados que o PCON, nomeadamente a oxidação lipídica (Tbars), que apresentou menor variação devido à capacidade antioxidante do medronho comprovada pelos parâmetros TPC, DPPH e ORAC.

A nível microbiológico os patés apresentam-se seguros a nível patogénico, havendo apenas algum crescimento de microrganismos totais aeróbios e anaeróbios a partir do dia 60, menos acentuado nos patés com adição de medronho. Isto está relacionado com todo o processamento dos patés e com o poder anti-microbiano a alguns microrganismos patogénicos que o medronho oferece.

O perfil sensorial dos patés apresentou-se semelhante até ao dia 30, a partir do mesmo houve maior estabilidade dos descritores sensoriais nos patés com adição de medronho, principalmente do PAU6.

Entre produtos no mesmo tempo de refrigeração ao nível sensorial, igualmente a partir do dia 60 registaram-se várias diferenças nos descritores sensoriais, sendo que o PAU6 apresentou valores de flavor a ranço, flavor a frutos silvestres, flavor residual e aderência mais adequados uma vez que nas avaliações sensoriais afetivas (preferência e aceitabilidade) houve uma tendência para que os provadores elegessem o PAU6 como o melhor a nível sensorial.

Como o PAU6 foi o produto com maior estabilidade tanto a nível físico-químico, microbiológico e sensorial, e a sua aceitabilidade por parte do painel foi maioritária, os objetivos foram largamente atingidos, permitindo oferecer um produto com muita qualidade, e ao mesmo tempo saudável ao consumidor.

## 6- PERSPETIVAS FUTURAS

---

Após a realização deste trabalho sugerem-se algumas linhas de investigação:

- Evidenciar ainda mais a elevada capacidade antioxidante do medronho, utilizando-se outros métodos que permitam avaliar o poder antioxidante de outros compostos presentes no medronho como o ácido ascórbico e os carotenoides, entre outros;
- Complementar a oxidação lipídica, deve ser efetuado o perfil lipídico dos ácidos gordos dos patés ao longo do tempo e fazer um estudo mais aprofundado sobre a avaliação da estabilidade da cor;
- Continuar a estudar a possível oxidação do produto/tempo de prateleira, para tal, avaliar a oxidação proteica ao longo do tempo;
- Efetuar a pesquisa microbiológica de *Staphylococcus aureus* por forma a completar toda a análise microbiológica em matéria de qualidade e segurança alimentar do produto, segundo o Regulamento (UE) 1441 (2007);
- Realizar testes de consumidor (por exemplo, inquéritos via online) na região ou até mesmo pelo país sobre o consumo de produtos do mesmo género por forma a tentar garantir a eficácia da entrada do paté de lapa com adição de medronho no mercado.



---

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Al-Kahtani, H.A., Abu-Tarboush, H.M., Bajaber, A.S. 1996. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in tilapia and spanish marckerel. *Journal of Food Science* 61: 729-733.
- Alarcão-E-Silva, M.L.C.M.M., Leitão, A.E.B., Azinheira, H.G., Leitão, M.C.A. 2001. The *Arbutus* Berry: Studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 27-35.
- Alves, M.J.T. 2012. Caracterização de *Arbutus unedo* L.: Estudo da maturação dos frutos na composição química e atividade antioxidante. Dissertação de mestrado. Instituto Politécnico de Bragança. Portugal.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7915-7922.
- AOAC, 2000. Official method of analysis 934.01. Association of Official Analytical Chemists Inc. 15ª edição. Maryland. Estados Unidos.
- Apak, R., Guçlu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Çelik, E., Bektasoglu, B., Berker, K., Ozyurt, D. 2007. Comparative evaluation of total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. *Molecule* 12: 1496–1547.
- Ayaz, F.A., Kucukislamoglu, M., Reunanem, M. 2000. Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 13: 171-177.
- Bandarra, N., Nunes, M., Oliveira, L., Batista, I., Calhau, A. 2004. Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. Publicações Avulsas do IPIMAR.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. 2010. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry* 120: 247-254.
- Blackmore, D.T. 1969. Studies of *Patella vulgata* L. I. Growth, reproduction and zonal distribution. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 3: 200-213.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology* 37: 911-917.
- Boaventura, D., Ré, P., da Fonseca L.C., Hawkins, S.J. 2002. Intertidal rocky shore communities of the continental portuguese coast: analysis of distribution patterns. *Marine Ecology* 23: 69-90.
- Brazão, S., Morais, S., Boaventura, D., Ré, P., Narciso, L., Hawkins, S.J. 2003. Spatial and temporal variation of the fatty acid composition of *Patella* spp. (Gastropoda: *Prosobranchia*) soft bodies and gonads. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 136: 425–441.
- Cavaco, T. 2007. Caracterização química e bioquímica dos frutos de *Arbutus unedo* L. e de *Rubus fruticosus* Agg.-Contribuição para a sua valorização. Dissertação de mestrado. Universidade do Algarve. Portugal.
- Chairman, C.S. 1997. Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today* 11: 137-176.

- Dinger, M.T., Çakli, S. 2015. Textural acceptability of prepared fish sausages by controlling textural indicators. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 39: 364-368.
- DGPA- Direção geral das pescas e aquicultura. 2007. Plano estratégico nacional para a pesca 2007-2013. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas.
- Domingues, A., Penteadó, D. 2011. Perfil lipídico de lapas (*Patella depressa*) cultivadas sob dois regimes alimentares. Projeto de licenciatura. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. Portugal.
- Duffy, C.F., Power, R.F. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some chinese plant extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17: 527-529.
- Echarte, M., Conchillo, A., Ansorena, D., Astiasarán, I. 2004. Evaluation of the nutritional aspects and cholesterol oxidation products of pork liver and fish patés. *Food Chemistry* 86: 47-53.
- Estévez, M., Ventanas, S., Cava, R. 2005a. Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. *Food Chemistry* 92: 449-457.
- Estévez, M., Ventanas, S., Cava, C. 2005b. Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: Effect on color and texture deterioration. *Journal of Food Science* 70: 427-432.
- Estévez, M., Ventanas, S., Cava, R. 2006. Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pâté. *Meat Science* 74: 396-403.
- Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S., Cava, R. 2007. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *Food Science and Technology* 40: 58-65.
- FAO. 2003. Food energy—Methods of analysis and conversion factors. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. 2014. The state of world fisheries and aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department.
- Fennema, O.R. 1996. Food Chemistry. CRC Press. 3ª edição. Nova Iorque. Estados Unidos.
- Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., Pérez-Alvarez, J.A. 2004. Quality characteristics of ostrich liver pâté. *Journal of Food Science* 69: 85-91.
- Frankel, E.N. 1998. Lipid oxidation. The Oily Press Lipid Library. 2ª edição. Dundee. Escócia.
- Fuentes-Zaragoza, E., Pérez-Álvarez, J.A., Sánchez-Zapata, E. 2009. Efecto de la concentración de aditivos e ingredientes sobre el color de pastas de merluza (*Merluccius australis*) tratadas termicamente. *Óptica Pura y Aplicada* 42: 9-21.
- Ganhão, R., Estévez, M., Kylli, P., Heinonen, M., Morcuende, D. 2010. Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 58: 8854-8861.
- Ganhão, R., Estévez, M., Morcuende, D. 2011. Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials. *Food Chemistry* 126: 772-778.
- Gibson, R., Hextall, B., Rogers, A. 2001. Photographic guide to the sea & shore life of Britain & North-west Europe. Oxford University Press Inc. Nova Iorque. Estados Unidos.

- Gray, J.I., Goma, E.A., Buckley, D.J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science* 43: 111-123.
- Guerra, M.T., Gaudencio, M.J. 1986. Aspects of ecology of *Patella* spp. on the portuguese coast. *Hydrobiologia* 142: 57-69.
- Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Miguel, M.G.C., Antunes, M.D.C. 2013. The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. *Scientia Horticulturae* 159: 96–102.
- Hakkinen, S.H., Karenlampi, S.O., Heinonen, I.A., Mykkanen, H.M., Torronen, A.R. 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 Edible Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2274-2279.
- Heinonen, M. 2007. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics-a Finnish perspective. *Molecular Nutrition and Food Research* 51: 684–691.
- Helbig, D., Böhm, V., Wagner, A., Schubert, R., Jahreis, G. 2008. Berry seed press residues and their valuable ingredients with special regard to black currant seed press residues. *Food Chemistry* 111: 1043-1049.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841–1856.
- Huss, H.H. 1995. Quality and quality changes on fresh fish. FAO Fisheries Technical paper-348.
- Isbilir, S.S., Orak, H.H., Yagar, H., Ekinici, N. 2012. Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 11: 223-237.
- ISO 6579. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs–Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization.
- ISO 6887. 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organization for Standardization.
- ISO 7218. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs-General rules for microbiological examinations. International Organization for Standardization.
- ISO 11290-2. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*-Part 2: Enumeration method. International Organization for Standardization.
- ISO 16649-2. 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*-Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. International Organization for Standardization.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4076–4082.
- Kamal-Eldin, A., Pickova, J. 2008. Balance between polyunsaturated fatty acids and antioxidants in nutrition. *Lipid Technology* 20: 80-83.

- Koleva, I. 2007. New methods for the screening of antioxidants in three *Sideritis* species. Tese de doutoramento. Wageningen University. Holanda.
- Leite, R.A.R. 2010. Análise das atitudes e comportamentos dos consumidores face à compra de produtos alimentares de marca do distribuidor. Dissertação de mestrado. Universidade de Fernando Pessoa. Portugal.
- Lindner, G. 2000. Moluscos y caracolas de los mares del mundo. Manual de identificación. Ediciones Omega. Espanha.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Lima, J.L.F.C. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 613: 1-19.
- Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., Pereira, J.A. 2012. *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products* 37: 473-478.
- Medina, I., Gallardo, J.M., Aubourg, S.P. 2009. Quality preservation in chilled and frozen fish products by employment of slurry ice and natural antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 1467-1479.
- Meilgaard, M.C., Civille, G.V., Carr, B.T. 2007. Sensory evaluation techniques. CRC Press. 4ª edição. Flórida. Estados Unidos.
- Morais, S., Boaventura, D., Narciso, L., Ré, P., Hawkins, S.J. 2003. Gonad development and fatty acid composition of *Patella depressa* Pennant (Gastropoda: Prosobranchia) populations with different patterns of spatial distribution, in exposed and sheltered sites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 294: 61– 80.
- Moskowitz, H.R., Saguy, I.S., Straus, T. 2009. An integrated approach to new food product development. CRC Press. Nova Iorque. Estados Unidos.
- Nielsen, N.S., Jacobsen, C. 2013. Oxidative stability of fish oil-enriched fish pâté. *Journal of Food Biochemistry* 37: 88–97.
- NP 903. 1987. Determinação do índice de acidez e da acidez em gorduras e óleos. Instituto Português da Qualidade. Portugal.
- NP 2032. 1988. Determinação do teor de cinza no pescado. Instituto Português da Qualidade. Portugal.
- NP 3005. 1985. Microbiologia alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade. Portugal.
- NP 4405. 2002. Microbiologia alimentar: Regras gerais para contagem de microrganismos, contagem de colónias a 30°C. Instituto Português da Qualidade. Portugal.
- NP 4488. 2009. Determinação do teor de azoto total e cálculo do teor de proteína bruta. Instituto Português da Qualidade. Portugal.
- Oliveira, I., Baptista, P., Albino, B., Pereira, J.A. 2011. *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *Journal of Food and Nutrition Research* 50: 73–85.
- Olsson, M. E., Gustavsson, K. E. 2004. Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7264–7271.

- Ozcan, M., Haçiseferogullar, H. 2007. The strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral content. *Journal Food Engineering* 78: 1022–1028.
- Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J.C., Castillo, M.D., Cano, M.P., Pascual-Teresa, S. 2008. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 273–281.
- Pastoriza, L., Gallardo, J.M., Franco, J.M., Sampedro, G. 1980. Oxidación de ácidos grasos procedentes de moluscos comestibles (vieira, almeja, berberecho y mejillón) durante su almacenamiento. Instituto de Investigaciones Pesqueras de Vigo. Espanha.
- Pereda, J.A.O. 2005. Tecnologia de alimentos. Biblioteca Artmed. 1ª edição. Espanha.
- Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Rosmini, M.R. 2004. Chemical and physical aspects of color in frozen muscle-based food. Handbook of Frozen Foods. Marcel Dekker Inc. 2ª edição. Nova Iorque. Estados Unidos.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4290-4302.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Alakomi, H.L., Oksman-Caldentey, K.M. 2005. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Application Microbiological Biotechnology* 67: 8–18.
- Rahman, M.S. 2007. Handbook of food preservation. CRC Press. 2ª edição. Nova Iorque. Estados Unidos.
- Ramanathan, L., Das, N.P. 1992. Studies on the control lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic natural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 17-21.
- Ramirez, J.A., Uresti, R.M., Velazquez, G., Vázquez, M. 2011. Food Hydrocolloids as additives to improve the mechanical and functional properties of fish products. *Food Hydrocolloids* 25: 1842-1852.
- Regulamento (UE) 1129. 2011. Estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. Jornal Oficial da União Europeia. União Europeia.
- Regulamento (UE) 1441. 2007. Que altera o Regulamento (UE) nº2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. União Europeia.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Review. *Trends Plant Science* 2: 152–159.
- Rosmini, M.R., Perlo, F., Pérez-Alvarez, J.A., Pagán-Moreno, M.J., Gago-Gago, A., López-Santoveña, F. 1996. TBA test by an extractive method applied to “Paté”. *Meat Science* 42: 103–110.
- Rudolph, M.J. 1995. The food product development process. *British Food Journal* 97: 3-11.
- Ruiz-Rodríguez, B.M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Molina, M., Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M. 2011. Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International* 44: 1244–1253.

- Sampels, S. 2013. Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork. In: Muzzalupo, I. (Ed.), Food industry. InTech. Rijeka. Croatia. pp. 115–144.
- Sánchez-Zapata, E., Zaragoza, E.F., de Vera C.N.R., Sayas, E., Sendra, E., López, J.F., Alvarez, J.F.P. 2011. Effects of tuna pâté thickness and background on CIEL\*a\*b\*color parameters and reflectance spectra. *Food Control* 22: 1226-123.
- Shahidi, F., Wanasundara, U.N. 2002. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In Food Lipids-Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. Marcel Dekker Inc. 2ª edição. Nova Iorque. Estados Unidos.
- Siegel, S., Castellan, N.J. 1988. Non-parametric statistics for the behavioral sciences. New York: McGraw-Hill Book Company. 2ª edição. Nova Iorque. Estados Unidos.
- Su, L., Yin, J., Charles, D., Zhou, K., Moore, J., Yu, L. 2007. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry* 100: 990–997.
- Tavares, L., Fortalezas, S., Carrilho, C., McDougall, G.J., Stewart, D., Ferreira, R.B., Santos, C.N. 2010. Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. *Journal of Berry Research* 1: 3–12.
- ter Braak, C.J., Smilauer, P. 1998. CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows: software for canonical community ordination (versão 4). Holanda.
- Trondsen, T., Braaten, T., Lund, E., Eggen, A.E. 2004. Consumption of seafood — the influence of overweight and health beliefs. *Food Quality and Preference* 15: 361-374.
- Vareltzis, K., Koufidis, D., Graviilidou, E., Papavergou, E., Vasiliadou, S. 1997. Effectiveness of a natural Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 205: 93-96.
- Viljanen, K., Kylli, P., Kivikari, R., Heinonen, M. 2004. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7419–7424.
- Wang, H., Cao, G., Prior R.L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 701–705.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4026-4037.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1619-1624.
- Zar, J.H. 2010. Biostatistical Analysis. Upper Saddle River- NJ: Pearson Prentice-Hall. 5ª edição. Nova Jérsei. Estados Unidos.
- Zulueta, A., Esteve, M.J., Frígola, A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114: 310-316.

## ANEXOS

## Anexo 1- Folha de prova sensorial para avaliar testes preliminares do paté

|   |  |
|---|--|
|  | <b>ELABORAÇÃO DE PATÉ DE<br/>LAPA COM ADIÇÃO DE<br/>MEDRONHO</b> |
| Prova nº1   | Folha de Prova – Avaliação da preferência                        |

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

1 - Avalie as amostras da esquerda para a direita e marque com um (X) a sua preferida.  
Não se esqueça de lavar a boca entre amostras.

|            |            |
|------------|------------|
| <b>724</b> | <b>599</b> |
|            |            |

2 – Indique duas razões (atributos) pelos quais influenciaram a sua escolha.

\_\_\_\_\_

3 - Observações:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Após terminar a prova certifique-se que deixa o local de prova limpo.  
Acenda a luz de presença para sinalizar que terminou a prova.**

## Anexo 2- Folhas de prova sensorial das formulações do paté

|   |  |  |
|---|--|--|
|  |  | <b>LAPA – Lapa para aquacultura e para paté</b>                                  |
| Folha de prova  |  | Perfil Sensorial, ordenação por preferência e aceitação global para paté de lapa |

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**1 - Caracterize a intensidade dos atributos das 3 amostras sugeridas, de paté de lapa.**

- a) Por favor lave a boca com água antes de iniciar a prova e entre amostras
- b) Avalie as amostras que estão disponíveis no seu tabuleiro de prova e assinale na tabela, qual a intensidade atribuída (de 1 a 5) a cada um dos atributos considerados.

| Amostra 881                | Intensidade |   |   |   |   |
|----------------------------|-------------|---|---|---|---|
|                            | 1           | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <b>Aparência</b>           |             |   |   |   |   |
| Cor                        |             |   |   |   |   |
| Textura superficial        |             |   |   |   |   |
| <b>Flavor</b>              |             |   |   |   |   |
| Flavor a mar               |             |   |   |   |   |
| Flavor a frutos silvestres |             |   |   |   |   |
| Flavor a ranço             |             |   |   |   |   |
| <b>Textura</b>             |             |   |   |   |   |
| Aderência                  |             |   |   |   |   |
| Creiosidade                |             |   |   |   |   |
| Oleosidade                 |             |   |   |   |   |
| <b>Residual</b>            |             |   |   |   |   |

|                                |  |  |  |  |  |
|--------------------------------|--|--|--|--|--|
| Flavor residual (após 20 seg.) |  |  |  |  |  |
|--------------------------------|--|--|--|--|--|

| Amostra 424                    | Intensidade |   |   |   |   |
|--------------------------------|-------------|---|---|---|---|
|                                | 1           | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <b>Aparência</b>               |             |   |   |   |   |
| Cor                            |             |   |   |   |   |
| Textura superficial            |             |   |   |   |   |
| <b>Flavor</b>                  |             |   |   |   |   |
| Flavor a mar                   |             |   |   |   |   |
| Flavor a frutos silvestres     |             |   |   |   |   |
| Flavor a ranço                 |             |   |   |   |   |
| <b>Textura</b>                 |             |   |   |   |   |
| Aderência                      |             |   |   |   |   |
| Creiosidade                    |             |   |   |   |   |
| Oleosidade                     |             |   |   |   |   |
| <b>Residual</b>                |             |   |   |   |   |
| Flavor residual (após 20 seg.) |             |   |   |   |   |

| Amostra 617                    | Intensidade |   |   |   |   |
|--------------------------------|-------------|---|---|---|---|
|                                | 1           | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <b>Aparência</b>               |             |   |   |   |   |
| Cor                            |             |   |   |   |   |
| Textura superficial            |             |   |   |   |   |
| <b>Flavor</b>                  |             |   |   |   |   |
| Flavor a mar                   |             |   |   |   |   |
| Flavor a frutos silvestres     |             |   |   |   |   |
| Flavor a ranço                 |             |   |   |   |   |
| <b>Textura</b>                 |             |   |   |   |   |
| Aderência                      |             |   |   |   |   |
| Creiosidade                    |             |   |   |   |   |
| Oleosidade                     |             |   |   |   |   |
| <b>Residual</b>                |             |   |   |   |   |
| Flavor residual (após 20 seg.) |             |   |   |   |   |

**AS SEGUINTE AVALIAÇÕES SÃO DE CARATER AFETIVO,  
EXPRESSANDO ASSIM AS SUAS EMOÇÕES**

2 - Ordene por ordem de preferência (global) as 3 amostras, ou seja a mais preferida corresponde ao algarismo 1 e a menos preferida corresponde ao algarismo 3

|            |            |            |
|------------|------------|------------|
| <b>881</b> | <b>424</b> | <b>617</b> |
|            |            |            |

**3** – Considerando todos os atributos avalie as amostras segundo a sua aceitação global, tendo em conta a seguinte escala: Extremamente desagradável, Muito desagradável, Moderadamente desagradável, Ligeiramente desagradável, Indiferente, Ligeiramente agradável, Moderadamente agradável, Muito agradável e Extremamente agradável

|                            | <b>881</b> | <b>424</b> | <b>617</b> |
|----------------------------|------------|------------|------------|
| Extremamente desagradável  |            |            |            |
| Muito desagradável         |            |            |            |
| Moderadamente desagradável |            |            |            |
| Ligeiramente desagradável  |            |            |            |
| Indiferente                |            |            |            |
| Ligeiramente agradável     |            |            |            |
| Moderadamente agradável    |            |            |            |
| Muito agradável            |            |            |            |
| Extremamente agradável     |            |            |            |

**Após terminar a prova certifique-se que deixa o local de prova limpo.**

**Acenda a luz de presença para sinalizar que terminou a prova.**

**Obrigado pela sua colaboração!**

**Obrigada pela sua colaboração!**

## Anexo 3- Folha de apoio às provas de análise sensorial das formulações de paté finais

|   |   |
|---|---|
|  | <b>LAPA – Lapa para aquacultura e para paté</b> |
|   | Perfil Sensorial – Referências de escala        |

Para o preenchimento da tabela de intensidades considere por favor as seguintes referências:

|                                 | Intensidade          |                       |                           |                        |                                     |
|---------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------------------|
|                                 | 1                    | 2                     | 3                         | 4                      | 5                                   |
| <b>Aparência</b>                |                      |                       |                           |                        |                                     |
| Cor                             | Verde-claro (alface) |                       |                           |                        | Verde-escuro (azeitona)             |
| Textura superficial             | Homogénea (gelatina) |                       |                           |                        | Heterogénea (wafer de arroz)        |
| <b>Flavor</b>                   |                      |                       |                           |                        |                                     |
| Flavor a mar (maresia, marisco) | Impercetível         | Levemente perceptível | Moderadamente perceptível | Fortemente perceptível | Extremamente perceptível            |
| Flavor a frutos silvestres      | Impercetível         | Levemente perceptível | Moderadamente perceptível | Fortemente perceptível | Extremamente perceptível            |
| Flavor a ranço                  | Impercetível         | Levemente perceptível | Moderadamente perceptível | Fortemente perceptível | Extremamente perceptível            |
| <b>Textura</b>                  |                      |                       |                           |                        |                                     |
| Aderência                       | Margarina Becel      |                       |                           |                        | Crema de queijo da Serra da Estrela |

|                                   |   |                         |                                 |                          |                                 |
|-----------------------------------|---|-------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Creiosidade                       | Suave/<br>aveludado<br>(Queijo<br>Philadelphia<br>) |                         |                                 |                          | Áspero<br>(Marmelada)           |
| Oleosidade                        | Seco (puré<br>de batata)                            |                         |                                 |                          | Húmido<br>(Manteiga de<br>vaca) |
| <b>Residual</b>                   |   |                         |                                 |                          |                                 |
| Flavor residual<br>(após 20 seg.) | Impercetível  | Levemente<br>percetível | Moderada<br>mente<br>percetível | Fortemente<br>percetível | Extremament<br>e percetível     |

**SOLICITA-SE A TODOS OS PROVADORES CONFIDENCIALIDADE DAS RESPOSTAS DENTRO DO PAINEL E PARA O EXTERIOR DO PAINEL**

**Anexo 4- Avaliação da estabilidade dos patês durante o armazenamento em refrigerado<sup>1</sup>**

|             | GT (%)       | Dz (N)                   | Ads (N.s)                 | pH                        | Acid (%)    | TPC <sup>2</sup>           | DPPH <sup>3</sup>          | ORAC <sup>4</sup>             | Tbars <sup>5</sup>       |
|-------------|--------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <b>PCON</b> |              |                          |                           |                           |             |                            |                            |                               |                          |
| 0           | 12,60 ± 0,23 | 4,32 ± 0,04 <sup>a</sup> | -2,08 ± 0,05 <sup>c</sup> | 6,81 ± 0,03 <sup>a</sup>  | 1,12 ± 0,01 | 22,44 ± 1,87 <sup>c</sup>  | 21,17 ± 1,38 <sup>c</sup>  | 876,49 ± 60,50 <sup>b</sup>   | 1,17 ± 0,06 <sup>c</sup> |
| 30          | 12,61 ± 0,41 | 4,48 ± 0,06 <sup>b</sup> | -2,13 ± 0,06 <sup>c</sup> | 6,89 ± 0,02 <sup>b</sup>  | 1,12 ± 0,02 | 20,59 ± 0,23 <sup>bc</sup> | 18,30 ± 0,60 <sup>bc</sup> | 820,34 ± 132,48 <sup>b</sup>  | 1,25 ± 0,02 <sup>a</sup> |
| 60          | 12,79 ± 0,23 | 4,73 ± 0,09 <sup>c</sup> | -2,50 ± 0,10 <sup>b</sup> | 6,86 ± 0,04 <sup>ab</sup> | 1,12 ± 0,01 | 19,57 ± 0,21 <sup>ab</sup> | 15,97 ± 1,22 <sup>b</sup>  | 76,33 ± 125,80 <sup>a</sup>   | 1,59 ± 0,06 <sup>b</sup> |
| 90          | 12,78 ± 0,34 | 5,31 ± 0,07 <sup>d</sup> | -3,08 ± 0,09 <sup>a</sup> | 6,79 ± 0,02 <sup>a</sup>  | 1,11 ± 0,01 | 17,33 ± 0,30 <sup>a</sup>  | 12,03 ± 1,06 <sup>a</sup>  | 0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>      | 1,64 ± 0,02 <sup>b</sup> |
| <b>PAU3</b> |              |                          |                           |                           |             |                            |                            |                               |                          |
| 0           | 12,67 ± 0,45 | 3,75 ± 0,07 <sup>a</sup> | -1,38 ± 0,05 <sup>c</sup> | 6,59 ± 0,03               | 1,67 ± 0,00 | 26,50 ± 1,28 <sup>b</sup>  | 22,23 ± 1,05 <sup>c</sup>  | 1000,07 ± 194,42              | 0,97 ± 0,03 <sup>a</sup> |
| 30          | 12,84 ± 0,25 | 3,82 ± 0,06 <sup>a</sup> | -1,43 ± 0,05 <sup>c</sup> | 6,57 ± 0,04               | 1,67 ± 0,00 | 25,70 ± 0,23 <sup>ab</sup> | 20,67 ± 0,99 <sup>bc</sup> | 742,28 ± 61,39                | 1,15 ± 0,08 <sup>a</sup> |
| 60          | 12,59 ± 0,20 | 3,97 ± 0,05 <sup>b</sup> | -1,54 ± 0,04 <sup>b</sup> | 6,54 ± 0,02               | 1,68 ± 0,00 | 25,27 ± 0,26 <sup>ab</sup> | 19,67 ± 0,53 <sup>ab</sup> | 1472,66 ± 291,97              | 1,22 ± 0,02 <sup>a</sup> |
| 90          | 12,79 ± 0,53 | 4,29 ± 0,09 <sup>c</sup> | -1,85 ± 0,08 <sup>a</sup> | 6,57 ± 0,02               | 1,68 ± 0,00 | 23,91 ± 0,35 <sup>a</sup>  | 17,67 ± 0,45 <sup>a</sup>  | 1368,32 ± 585,64              | 1,34 ± 0,01 <sup>b</sup> |
| <b>PAU6</b> |              |                          |                           |                           |             |                            |                            |                               |                          |
| 0           | 12,88 ± 0,39 | 2,85 ± 0,06 <sup>a</sup> | -1,07 ± 0,05 <sup>c</sup> | 6,55 ± 0,02               | 1,66 ± 0,00 | 30,65 ± 0,36 <sup>b</sup>  | 28,83 ± 0,17 <sup>c</sup>  | 1010,36 ± 154,97 <sup>a</sup> | 0,89 ± 0,04 <sup>a</sup> |
| 30          | 12,83 ± 0,56 | 2,91 ± 0,06 <sup>a</sup> | -1,12 ± 0,05 <sup>c</sup> | 6,55 ± 0,03               | 1,67 ± 0,00 | 30,00 ± 0,35 <sup>ab</sup> | 27,03 ± 0,96 <sup>bc</sup> | 918,16 ± 135,37 <sup>a</sup>  | 0,95 ± 0,09 <sup>a</sup> |
| 60          | 12,83 ± 0,33 | 3,02 ± 0,04 <sup>b</sup> | -1,22 ± 0,04 <sup>b</sup> | 6,52 ± 0,01               | 1,67 ± 0,00 | 29,91 ± 0,18 <sup>ab</sup> | 25,67 ± 0,36 <sup>ab</sup> | 1835,07 ± 181,51 <sup>b</sup> | 1,03 ± 0,11 <sup>a</sup> |
| 90          | 12,88 ± 0,29 | 3,20 ± 0,07 <sup>c</sup> | -1,46 ± 0,08 <sup>a</sup> | 6,57 ± 0,02               | 1,66 ± 0,00 | 29,62 ± 0,13 <sup>a</sup>  | 24,27 ± 0,85 <sup>a</sup>  | 2041,25 ± 282,76 <sup>b</sup> | 1,08 ± 0,02 <sup>b</sup> |

<sup>1</sup>Valores com letras diferentes (a-d) entre colunas correspondem a diferenças significativas ( $p$ -value < 0,05); <sup>2</sup> Resultado expresso em mg de ácido gálico/100 g de fruto fresco; <sup>3</sup> Resultado expresso em percentagem de inibição de DPPH; <sup>4</sup> Resultado expresso em  $\mu$ mol equivalentes de trolox/100 g de fruto fresco; <sup>5</sup> Resultado expresso em mg de aldeído malônico/Kg de produto

Anexo 5- Avaliação da variabilidade dos patés por tempo<sup>1</sup>

|                 | GT (%)       | Dz (N)                   | Ads (N.s)                 | pH                       | Acid (%)                 | TPC <sup>2</sup>          | DPPH <sup>3</sup>         | ORAC <sup>4</sup>             | Tbars <sup>5</sup>       |
|-----------------|--------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <b>Tempo 0</b>  |              |                          |                           |                          |                          |                           |                           |                               |                          |
| PCON            | 12,60 ± 0,23 | 4,32 ± 0,04 <sup>c</sup> | -2,08 ± 0,05 <sup>s</sup> | 6,81 ± 0,03 <sup>z</sup> | 1,12 ± 0,01 <sup>s</sup> | 22,44 ± 1,87 <sup>s</sup> | 21,17 ± 1,38 <sup>s</sup> | 876,49 ± 60,50                | 1,17 ± 0,06 <sup>z</sup> |
| PAU3            | 12,67 ± 0,45 | 3,75 ± 0,07 <sup>z</sup> | -1,38 ± 0,05 <sup>y</sup> | 6,59 ± 0,03 <sup>s</sup> | 1,67 ± 0,00 <sup>y</sup> | 26,50 ± 1,28 <sup>y</sup> | 22,23 ± 1,05 <sup>s</sup> | 1000,07 ± 194,42              | 0,97 ± 0,03 <sup>s</sup> |
| PAU6            | 12,88 ± 0,39 | 2,85 ± 0,06 <sup>s</sup> | -1,07 ± 0,05 <sup>c</sup> | 6,55 ± 0,02 <sup>s</sup> | 1,66 ± 0,00 <sup>y</sup> | 30,65 ± 0,36 <sup>c</sup> | 28,83 ± 0,17 <sup>y</sup> | 1010,36 ± 154,97              | 0,89 ± 0,04 <sup>s</sup> |
| <b>Tempo 30</b> |              |                          |                           |                          |                          |                           |                           |                               |                          |
| PCON            | 12,61 ± 0,41 | 4,48 ± 0,06 <sup>c</sup> | -2,13 ± 0,06 <sup>s</sup> | 6,89 ± 0,02 <sup>z</sup> | 1,12 ± 0,02 <sup>s</sup> | 20,59 ± 0,23 <sup>s</sup> | 18,30 ± 0,60 <sup>s</sup> | 820,34 ± 132,48               | 1,25 ± 0,02 <sup>c</sup> |
| PAU3            | 12,84 ± 0,25 | 3,82 ± 0,06 <sup>z</sup> | -1,43 ± 0,05 <sup>y</sup> | 6,57 ± 0,04 <sup>s</sup> | 1,67 ± 0,00 <sup>y</sup> | 25,70 ± 0,23 <sup>y</sup> | 20,67 ± 0,99 <sup>y</sup> | 742,28 ± 61,39                | 1,15 ± 0,02 <sup>z</sup> |
| PAU6            | 12,83 ± 0,56 | 2,91 ± 0,06 <sup>s</sup> | -1,12 ± 0,05 <sup>c</sup> | 6,55 ± 0,03 <sup>s</sup> | 1,67 ± 0,00 <sup>y</sup> | 30,00 ± 0,35 <sup>c</sup> | 27,03 ± 0,96 <sup>c</sup> | 918,16 ± 135,37               | 0,95 ± 0,02 <sup>s</sup> |
| <b>Tempo 60</b> |              |                          |                           |                          |                          |                           |                           |                               |                          |
| PCON            | 12,79 ± 0,23 | 4,73 ± 0,09 <sup>c</sup> | -2,50 ± 0,10 <sup>s</sup> | 6,86 ± 0,04 <sup>z</sup> | 1,12 ± 0,01 <sup>s</sup> | 19,57 ± 0,21 <sup>s</sup> | 15,97 ± 1,22 <sup>s</sup> | 76,33 ± 125,80 <sup>s</sup>   | 1,59 ± 0,06 <sup>c</sup> |
| PAU3            | 12,59 ± 0,20 | 3,97 ± 0,05 <sup>y</sup> | -1,54 ± 0,04 <sup>y</sup> | 6,54 ± 0,02 <sup>s</sup> | 1,68 ± 0,00 <sup>y</sup> | 25,27 ± 0,26 <sup>y</sup> | 19,67 ± 0,53 <sup>y</sup> | 1472,66 ± 291,97 <sup>y</sup> | 1,22 ± 0,02 <sup>z</sup> |
| PAU6            | 12,83 ± 0,33 | 3,02 ± 0,04 <sup>s</sup> | -1,22 ± 0,04 <sup>c</sup> | 6,52 ± 0,01 <sup>s</sup> | 1,67 ± 0,00 <sup>y</sup> | 29,91 ± 0,18 <sup>c</sup> | 25,67 ± 0,36 <sup>c</sup> | 1835,07 ± 181,51 <sup>y</sup> | 1,03 ± 0,02 <sup>s</sup> |
| <b>Tempo 90</b> |              |                          |                           |                          |                          |                           |                           |                               |                          |
| PCON            | 12,78 ± 0,34 | 5,31 ± 0,07 <sup>c</sup> | -3,08 ± 0,09 <sup>s</sup> | 6,79 ± 0,02 <sup>z</sup> | 1,11 ± 0,01 <sup>s</sup> | 17,33 ± 0,30 <sup>s</sup> | 12,03 ± 1,06 <sup>s</sup> | 0,00 ± 0,00 <sup>s</sup>      | 1,64 ± 0,02 <sup>c</sup> |
| PAU3            | 12,79 ± 0,53 | 4,29 ± 0,09 <sup>y</sup> | -1,85 ± 0,08 <sup>y</sup> | 6,57 ± 0,02 <sup>s</sup> | 1,68 ± 0,00 <sup>y</sup> | 23,91 ± 0,35 <sup>y</sup> | 17,67 ± 0,45 <sup>y</sup> | 1368,32 ± 585,64 <sup>y</sup> | 1,34 ± 0,01 <sup>y</sup> |
| PAU6            | 12,88 ± 0,29 | 3,20 ± 0,07 <sup>s</sup> | -1,46 ± 0,08 <sup>c</sup> | 6,57 ± 0,02 <sup>s</sup> | 1,67 ± 0,00 <sup>y</sup> | 29,62 ± 0,13 <sup>c</sup> | 24,27 ± 0,85 <sup>c</sup> | 2041,25 ± 282,76 <sup>y</sup> | 1,08 ± 0,01 <sup>s</sup> |

<sup>1</sup>Valores com letras diferentes (x-z) entre colunas correspondem a diferenças significativas ( $p$ -value<0,05); <sup>2</sup> Resultado expresso em mg de ácido gálico/100 g de fruto fresco; <sup>3</sup> Resultado expresso em percentagem de inibição de DPPH; <sup>4</sup> Resultado expresso em  $\mu$ mol equivalentes de trolox/100 g de fruto fresco; <sup>5</sup> Resultado expresso em mg de aldeído malónico/Kg de produto