# Otimização da Extração de Compostos Bioativos de Plantas (*Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L., e *Rosmarinus officinalis* L.) para Utilização como Conservantes Naturais em "Muffins de Chocolate"

**Mariana Correia Pedrosa**

Relatório Final da Dissertação apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em

**Engenharia Química**

**Orientado por:**

Doutor Márcio Soares Carocho

Doutora Lillian Bouçada de Barros

Doutora Aline Bruna da Silva

**Bragança**

**2020**

**Mariana Correia Pedrosa**

**Otimização da Extração de Compostos Bioativos de Plantas (*Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L., e *Rosmarinus officinalis* L.) para Utilização como Conservantes Naturais em " Muffins de Chocolate"**

**Novembro 2020**

# Otimização da Extração de Compostos Bioativos de Plantas (*Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L., e *Rosmarinus officinalis* L.) para Utilização como Conservantes Naturais em "Muffins de Chocolate"

**Mariana Correia Pedrosa**

Relatório Final da Dissertação apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em

**Engenharia Química**

No âmbito da dupla diplomação com o Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

**Orientado por:**

Doutor Márcio Soares Carocho

Doutora Lillian Bouçada de Barros

Doutora Aline Bruna da Silva

***Este Trabalho de Dissertação inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri***

**Bragança**

**2020**

Este trabalho foi financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal através do projeto 0377_Iberphenol_6_E e TRANSCoLAB 0612_TRANS_CO_LAB_2_P.

## AGRADECIMENTOS

O trabalho de mestrado é o final de mais uma caminhada da vida e quando um ciclo se encerra, outro se inicia. Quando chegamos ao final de uma caminhada é normal olharmos para trás e lembrarmos das situações, dificuldades, desafios, superações e das coisas boas que passamos. É hora de olhar para trás e de agradecer todos que estiveram comigo nesse caminho.

Nada neste mundo se conquista sem a ajuda das pessoas ao seu redor. Por isso, eu quero compartilhar minha alegria e gratidão a todos que, de alguma forma, fizeram parte desse trabalho de dissertação.

Ao meu orientador, Dr. Márcio Carocho, pela orientação, disponibilidade de solucionar as dúvidas e problemas que surgiam no caminho, pelo auxílio, pela paciência, ensinamentos, dedicação, por me incentivar e mudar minha percepção sobre a área científica.

À minha orientadora, Dra. Lillian Barros, pela orientação, instrução, apoio, competência e auxílio na elaboração desta dissertação.

À minha orientadora do CEFET/MG (Brasil), Dra. Aline Bruna da Silva, pela orientação, pelo auxílio, ensinamentos e por me acompanhar nessa jornada desde o início.

Ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO) e a todos os seus colaboradores, em especial à Dra. Sandrina Heleno pelo auxílio juntamente com meus orientadores e à Andreia Tomás pelo suporte em várias questões laboratoriais. Agradeço a todos, investigadores e estudantes, do CIMO que contribuíram para a realização do mestrado.

À minha instituição de ensino no Brasil, CEFET/MG, pela oportunidade proporcionada em realizar o mestrado em Bragança/Portugal e pelo auxílio prestado, juntamente com a Secretaria de Relações Internacionais (SRI). A todos da SRI por prestar todo o apoio durante o período do mestrado, retirando dúvidas, respondendo e-mails e sempre se mostrando disponíveis.

Aos amigos que fiz em Bragança, que fizeram desse período de Mestrado, longe de casa, ser menos árduo e mais leve, que sempre me ajudaram e apoiaram, pela motivação e força. Agradeço também aos meus amigos do Brasil. Muito obrigada a todos de coração!

À toda minha família, avó, tias, tios, primas e primos, tanto da família Correia, quanto da Pedrosa, pela força, apoio, carinho, que mesmo estando longe, sempre estiveram comigo nessa jornada. Não posso deixar de agradecer também o meu irmão, Samuel Correia, que também sempre esteve comigo nessa jornada.

Á minha querida mãe, Tânia Márcia, e ao meu querido pai, Alexandre Luiz, pelo auxílio, incentivo diário, por sempre acreditarem em mim, pelos ensinamentos, pelo carinho, pelas palavras de apoio, por terem feito de tudo para que eu tivesse preparada para esta caminhada e que me permitiu chegar ao final deste desafio. Pais, vocês sempre fizeram de tudo para que eu tivesse um ótimo estudo, sempre me apoiaram e me incentivaram. Eu dedico este título a vocês. Obrigada mãe e pai! Sem vocês, nada disso seria possível. Eu amo vocês!

Por último, mas não menos importante, agradeço a Deus, por todas minhas conquistas, sem Ele nada seria possível nesta jornada.

**RESUMO**

Um muffin é um lanche doce, assado, popular, consumido normalmente ao pequeno almoço e ao lanche. A sua textura esponjosa e macia e o seu sabor adocicado são atributos procurados pelos consumidores, bem como sua fácil mastigação, o formato simétrico com o topo arredondado e acastanhado.

Um comportamento recente nos consumidores tem sido aliar a alimentação à procura de um estilo de vida mais saudável, à preferência por alimentos mais naturais, com propriedades funcionais e produtos mais sustentáveis. Essas tendências têm pressionado a indústria alimentar no sentido de desenvolver produtos com ingredientes naturais e com aporte de propriedades benéficas para a saúde dos seus consumidores. Um dos aspetos mais importantes no desenvolvimento de alimentos é a sua conservação, que hoje em dia depende de aditivos sintéticos ou artificiais. No entanto, devido a problemas relacionados com o consumo de aditivos alimentares e consequente toxicidade, procuram-se alternativas naturais e com menos ou nenhum efeito adverso, por exemplo, a adição de conservantes naturais derivados de plantas para estender o tempo de prateleira e evitar a sua deterioração. De entre as matrizes naturais consideradas como fontes de moléculas funcionais, encontram-se o alecrim, os orégãos e a cidreira, podendo ser utilizadas com esse propósito, pois apresentam uma variedade de fitoquímicos com grande atividade biológica.

Assim, o presente trabalho tem dois objetivos principais; por um lado a otimização da extração de compostos bioativos de plantas, e, por outro lado a utilização de extratos de alecrim, cidreira e orégãos como ingredientes conservantes e indutores de bioatividade, com vista a produzir muffins sem aditivos conservantes artificiais. A otimização foi feita com o auxílio do design fatorial fracionário, e utilizada a extração assistida por ultrassom para maximizar a quantidade de compostos fenólicos nos extratos, sendo também avaliada a atividade antimicrobiana e antioxidante. Após incorporação destes nos muffins, foi efetuada uma análise ao perfil nutricional, ácidos orgânicos, ácidos gordos, açúcares solúveis, além da cor e textura. Como esperado, a influência dos conservantes naturais assemelhou-se à utilização do sorbato de potássio sem alterar significativamente outros parâmetros nutricionais, químicos ou físicos dos muffins ao longo dos 8 dias de análise. Assim,

confirma-se o potencial do uso dos extratos como conservantes naturais em substituição aos conservantes sintéticos.

**Palavras-chave:** otimização; extratos de plantas; aditivo alimentar; muffins.

**ABSTRACT**

A muffin is a sweet snack which is baked and usually consumed throughout the day, highly appreciated for its spongy and soft texture, sweet flavour, as well as its chewiness, symmetrical shape and rounded brownish top.

A recent trend from consumers is a pursuit for a more adequate diet, allied to a healthier way of life, translated in the seek for healthier foods with functional properties. These tendencies have led the food industry to develop healthier foods with natural ingredients that can confer beneficial properties for their consumers. One of the most important aspects in the development of food is its preservation, which relies, nowadays, on synthetic or artificial food additives. However, due to problems related to the consumption of food additives and consequent toxicity, natural alternatives are sought with less or no adverse effect, for example, the addition of natural preservatives derived from plants to extend the shelf-life and prevent deterioration. Among the natural matrices, rosemary, oregano and lemon balm are interesting candidates due to the high number of functional molecules which can be used to preserve food.

The present work has two main objectives; on the one hand the optimization of the phenolic fraction of extracts from lemon balm, oregano and rosemary, and, on the other, using the best extracts as preservative ingredients in muffins, to produce these snacks without artificial preservative additives. The optimization was done with the aid of factorial fraction design and using ultrasound-assisted extraction. Furthermore, the antioxidant and antimicrobial activities were also performed on these extracts prior to their incorporation in chocolate muffins. Then, the nutritional profile of these muffins was analysed, as well as the organic and fatty acids, soluble sugars, texture and color parameters were performed. As expected, the extracts showed as similar effect on preserving the muffins as sodium sorbate while not changing any other parameters of the muffins. This work shows that plant extracts can be alternatives to synthetic molecules.

**Keywords:** optimization; plant extract; natural preservatives, food additives; muffins.

**ÍNDICE**

**RESUMO** ..... **VII**

**ABSTRACT** ..... **IX**

**ÍNDICE** ..... **X**

**ÍNDICE DE FIGURAS** ..... **XIII**

**ÍNDICE DE TABELAS** ..... **XV**

**LISTA DE ABREVIAÇÕES** ..... **XVI**

**1. INTRODUÇÃO** ..... **1**

**1.1. A importância dos alimentos à base de cereais** ..... **1**

***1.1.1. Muffins*** ..... ***1***

**1.2. Necessidade de conservação de alimentos** ..... **2**

***1.2.1. Problemática da conservação de alimentos*** ..... ***4***

***1.2.2. Matrizes naturais como conservantes de alimentos*** ..... ***5***

*1.2.2.1. Caso particular da família Lamiaceae na conservação de alimentos* ..... *9*

*1.2.2.2. Caraterização botânica e aplicação de extratos de Cidreira, Orégão e Alecrim em alimentos* ..... *9*

**1.3. A importância da extração de compostos bioativos de plantas** ..... **14**

**1.4. A importância da textura de alimentos** ..... **15**

**2. OBJETIVOS** ..... **16**

**3. MATERIAIS E MÉTODOS** ..... **17**

**3.1. Plantas** ..... **17**

**3.2. Otimização da extração de compostos bioativos de plantas** ..... **18**

***3.2.1. Extração assistida por ultrassons (EAU)*** ..... ***18***

***3.2.2. Teste de rastreio*** ..... ***19***

*3.2.2.1. Design fatorial fracionário* ..... *19*

*3.2.2.2. Design fatorial geral* ..... *20*

***3.2.3. Caracterização do perfil fenólico e respetiva quantificação*** ..... ***22***

**3.3. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos** ..... **23**

**3.4. Muffins** ..... **25**

***3.4.1. Preparação dos Muffins*** ..... ***25***

***3.4.2. Análises químicas*** ..... ***27***

*3.4.2.1. Perfil nutricional* ..... *27*

*3.4.2.2. Ácidos orgânicos* ..... *32*

*3.4.2.3. Ácidos gordos* ..... *33*

*3.4.2.4. Açúcares solúveis* ..... *34*

***3.4.3. Análises físicas*** ..... ***35***

*3.4.3.1. Cor externa* ..... *35*

*3.4.3.2. Textura* ..... *35*

***3.4.4. Análise estatística*** ..... ***36***

**4. Resultados** ..... **37**

**4.1. Design fracionário aplicado ao alecrim** ..... **37**

**4.2. Designs de tempo multinível** ..... **39**

**4.3. Design de temperatura multinível** ..... **42**

**4.4. Condições ótimas de extração** ..... **43**

**4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos** ..... **45**

**4.6. Muffins** ..... **49**

**4.7. Perfil nutricional** ..... **49**

**4.8. Ácidos gordos** ..... **51**

**4.9. Atividade da água, ácidos orgânicos e açúcares solúveis nos muffins** ..... **54**

**4.10. Cor exterior ..... 56**

**4.11. Textura ..... 59**

**5. CONCLUSÕES ..... 62**

**6. REFERÊNCIAS ..... 63**

**TRABALHOS PUBLICADOS ..... 68**

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1** – Conservantes e espessantes naturais. Fonte: Carocho et al., 2014. Adaptado .... 7

**Figura 2 -** *Melissa officinalis L.* Fonte: The Herb Society of America, 2007 ..... 10

**Figura 3** - *Origanum vulgare L.* Fonte: Rockstein, 2017 ..... 10

**Figura 4** - *Rosmarinus officinalis L.* Fonte: Garcia-Cabral, 2010 ..... 11

**Figura 5 –** Fluxograma dos metabolitos primários e secundários das plantas. Fonte: Campos, 2019. Adaptado..... 12

**Figura 6** – Extratos de a) alecrim, b) orégão e c) cidreira após trituração ..... 18

**Figura 7** – Homogeneizador ultrassónico utilizado para técnica de extração assistida por ultrassons ..... 19

**Figura 8** – Soluções obtidas após a extração da cidreira com potência (275W – 55%), solvente (etanol:água 80%) e variação do tempo (10 s – 5 min) (seis balões da esquerda). Extração feita variando apenas a temperatura (20 ºC - 75 ºC) (três balões da direita)..... 21

**Figura 9 –** Solução obtida após a extração com potência (275W – 55%), solvente (etanol:água 80%) variando apenas a temperatura (20 ºC - 75 ºC) ..... 21

**Figura 10** – Ilustração e posicionamento central das extrações no ultrassons ..... 22

**Figura 11** – Cromatógrafo líquido de ultra performance, acoplado a um detetor de díodos e um detetor de massa de ionização por electro-*spray* (UPLC-DAD-ESI/MS)..... 23

**Figura 12** – Processo de a) pesagem e b) adição da massa à bandeja ..... 26

**Figura 13** – Mufla com os cadinhos em seu interior ..... 28

**Figura 14** – Destilador Kjeldahl utilizado para a análise do conteúdo de proteínas ..... 29

**Figura 15** – Extrator Soxhlet ..... 30

**Figura 16** – a) Esquema utilizado para a filtração e lavagem das fibras e b) cadinhos após secagem ..... 31

**Figura 17** – Cromatógrafo gasoso, acoplado a um detetor de ionização de chama (GC-FID) ..... 33

**Figura 18 -** Cromatógrafo líquido de alta eficiência, acoplado a um detetor de índice de refração (HPLC-RI) ..... 35

**Figura 19** – Texturómetro com célula de 30 kg de carga e sonda cilíndrica de alumínio de P/35 ..... 36

**Figura 20** – a) Ordem do design fracionário executado e o rendimento em função do ácido rosmarínico e b) diagrama de Pareto com os efeitos de magnitude ..... 38

**Figura 21** – a) Fatorial multinível em função do tempo e b) gráficos comparativos do rendimento médio de cada planta analisada. ..... 40

**Figura 22 –** Gráfico comparativo das respostas, em função da temperatura, do rendimento de ácido rosmarínico de cada planta analisada ..... 43

**Figura 23** – Representação gráfica de: a) CMI da atividade antibacteriana, b) CMB, c) CMI da atividade antifúngica e d) CMF ..... 47

**Figura 24** – Muffins com extrato de a) alecrim e b) orégão ..... 49

**Figura 25** – Representação ilustrativa da resultante das coordenadas colorimétricas do topo e lateral dos muffins para a) diferentes conservantes e b) diferentes tempos de análise. ..... 58

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1** – Quantidades e funções dos componentes do muffin. Fonte: Smith e Hui, 2004. Adaptado. ..... 2

**Tabela 2** – Representação dos principais conservantes naturais, exemplos e estrutura química. ..... 8

**Tabela 3** – Ensaios para medir a textura dos alimentos. Fonte: Bourne, 2002. Adaptado . 16

**Tabela 4** – Valores dos parâmetros utilizados em cada extração assistida por ultrassom para otimização do processo. ..... 20

**Tabela 5** – Ingredientes para confecção dos muffins expresso para 100 g de farinha. ..... 25

**Tabela 6** – Códigos e quantidade de conservantes (naturais e sintéticos) adicionados aos muffins. ..... 27

**Tabela 7** – Condições ótimas para a extração do extrato de alecrim, cidreira e orégão. .... 44

**Tabela 8** – Rendimento específico de cada composto fenólico e total dos extratos de alecrim, cidreira e orégão. ..... 44

**Tabela 9** – Atividade anti-hemolítica das amostras dos extratos de plantas. ..... 48

**Tabela 10 -** Perfil nutricional em g/100g de matéria fresca e valor energético dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes. ..... 50

**Tabela 11 -** Perfil de ácidos gordos em percentagem relativa dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes. ..... 53

**Tabela 12 -** Perfil da atividade da água, ácidos orgânicos e açúcares solúveis dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes. ..... 55

**Tabela 13 -** Perfil das coordenadas colorimétricas (*L**, *a**, *b**) do topo e lateral dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes. ..... 57

**Tabela 14** - Perfil da textura dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes. ..... 61

## LISTA DE ABREVIAÇÕES

| | |
|---|---|
| **a*** | Vermelho-verde |
| **AAPH** | *2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride* |
| **ANOVA** | Análise de variância |
| **AOAC** | *Association of Official Analytical Collaboration* |
| **b*** | Amarelo-azul |
| **CIE** | Comissão Internacional de Iluminação |
| **Cl** | Cloro |
| **CMB** | Concentração mínima bactericida |
| **CMF** | Concentração mínima fungicida |
| **CMI** | Concentração mínima inibitória |
| **Cu** | Cobre |
| **DAD** | Detetor de diodos |
| **DP** | Desvio padrão |
| **EAU** | Extração assistida por ultrassons |
| **EFSA** | Autoridade Europeia de Segurança Alimentar |
| **EUA** | Estados Unidos da América |
| **ESI** | Ionização electrospray |
| **FAME** | Estéres metílicos de ácidos gordos |
| **FDA** | *Food and Drug Administration* |
| **FID** | Detetor de ionização de chama |
| **GC** | Cromatografia gasosa |
| **GRAS** | Geralmente reconhecido como seguro |

| | |
|---|---|
| **H** | Hidrogénio |
| **HPLC** | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| **H$t_{50}$** | Metade do tempo de hemólise |
| **ISO** | *International Organization for Standardization* |
| **$IC_{50}$** | 50% da concentração máxima inibitória |
| **K** | Potássio |
| **L*** | Luminosidade |
| **LSD** | *Least Significant Difference* |
| **MS** | Espectrometria de massa |
| **MME** | Médias marginais estimadas |
| **MUFA** | Ácidos gordos monoinsaturados |
| **N** | Azoto |
| **Na** | Sódio |
| **OxHLIA** | *Oxidative haemolysis inhibition assay* |
| **O** | Oxigénio |
| **PBS** | Tampão fosfato salino |
| **PDA** | Detetor de fotodiodos |
| **PLP2** | Células primárias de fígado porcinas |
| **PUFA** | Ácidos gordos polinsaturados |
| **RI** | Detetor de índice de refração |
| **S** | Enxofre |
| **SFA** | Ácidos gordos saturados |
| **TA** | Tempo de armazenamento |
| **TC** | Tipo de conservante |

| | |
|---|---|
| **TDF** | Fibras dietéticas totais |
| **TPA** | Análise de perfil de textura |
| **UE** | União Europeia |
| **UFLC** | Cromatografia líquida ultra rápida |
| **UPLC** | Cromatografia líquida ultra performance |
| **UV** | Ultravioleta |
| **Vis** | Visível |
| ***Δt*** | Variação do tempo |
| **λmax** | Comprimento de onda de máxima absorção |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A importância dos alimentos à base de cereais

Umas das principais fontes de nutrientes para o ser humano são os grãos de cereais, como o trigo, arroz, amido de milho, sorgo e cevada. A energia proveniente do amido presente nos grãos de cereais é um contributo importante na dieta, assim como as proteínas, óleos e vitaminas, apesar de estarem presentes em menores quantidades. Em 2012, três variedades de cereais apareceram no top 11 das "comodities" alimentares mundiais, devido ao seu valor nutricional: o arroz (segunda posição), trigo (sexta posição) e o amido de milho (décima primeira posição). Na Europa, o trigo e produtos assados feitos de farinha são historicamente a base da dieta, principalmente o pão (Rosentrater e Evers, 2018).

### *1.1.1. Muffins*

O muffin é um "lanche" doce, com alto teor de calorias e bastante popular, consumido ao pequeno almoço e ao lanche. Nos últimos anos ganhou estatuto de "snack" e passou a ser consumido em todo o mundo; contudo, é originário de Londres, de onde foi exportado para os Estados Unidos e rapidamente foi integrado na cultura Norte Americana. A sua textura esponjosa e macia, e o seu sabor, são atributos apreciados pelos consumidores fazendo dele um produto de pastelaria de grande sucesso. Estas características organoléticas são influenciadas pela composição e estrutura de cada componente, ou seja, pelos ingredientes utilizados e suas respetivas funções na massa do muffin (Cross, 2004; Bhaduri e Mukherjee, 2016; Martínez-Cervera et al., 2012; Matos et al., 2014; Shevkani et al., 2015).

Os ingredientes, as suas quantidades e principais funções nos muffins estão descritas na **tabela 1**. A sua produção é dividida em quatro etapas: 1) mistura e dispersão dos ingredientes, e hidratação das proteínas da farinha; 2) depósito em forma; 3) "assamento", transformação da massa líquida em muffin assado; 4) arrefecimento, ajuste à estrutura e evaporação da água (Smith e Hui, 2004).

**Tabela 1** – Quantidades e funções dos componentes do muffin. Fonte: Smith e Hui, 2004. Adaptado.

| Componente | Quantidade (%) | Função |
|---|---|---|
| Farinha | 30-40 | Proporciona a estrutura final do produto, gelificação do amido e volume. |
| Açúcar | 50-70 | Retenção de humidade, cor da crosta, maciez, redução da atividade da água e sabor doce. |
| Gordura | 18-40 | Textura, sabor, maciez, sensação na boca e manutenção da humidade. |
| Agente de fermentação | 2-6 | Gerar $CO_2$, volume e estrutura da célula. |
| Ovos | 10-30 | Cor, sabor, estrutura e fonte de líquido. |
| Leite em pó | 5-12 | Sabor, retenção de humidade, resiliência e resistência, cor da crosta. |
| Cloreto de Sódio | 1.5-2 | Melhorar o sabor dos outros ingredientes. |
| Líquidos (água) | - | Dissolver os ingredientes secos, gelificação do amido, estrutura, volume e humidade no produto final. |
| Ingredientes adicionais | - | Sabor, textura, cor, vitaminas, fibras, antioxidantes de extratos naturais, entre outras. |

A massa de muffin pode ser considerada uma emulsão com fase contínua (ovos, açúcar, água e gordura) e uma fase descontínua de bolhas, na qual a farinha está dispersa. As bolhas conferem porosidade na estrutura final do muffin, e, juntamente com o volume proporcionado pela fase contínua, definem a textura esponjosa do alimento. No entanto, é importante salientar que um maior volume do muffin apenas é atingido caso a fase contínua seja capaz de reter pequenos compostos durante a sua preparação, mais especificamente, na etapa em que o muffin é assado (Martínez-Cervera et al., 2012; Matos et al., 2014).

As características que fazem o sucesso dos muffins são: o formato simétrico com o topo arredondado e castanho, estrutura interna uniforme com tamanho de poros moderados, maciez da massa, sabor adocicado, não ser muito seco, bem como quebrar facilmente e ser de fácil mastigação (Smith e Hui, 2004).

### 1.2. Necessidade de conservação de alimentos

A interação do homem com a comida é algo atemporal e que está presente em todas as faixas etárias e géneros, além de ser algo necessário para a sobrevivência do Homem. Ao

longo dos tempos, essa interação foi se transformando, iniciando em populações recolectoras locais nas Eras mais antigas, domesticação de animais, domínio da agricultura, até chegar aos dias atuais com a internacionalização da produção e comércio, dentro e fora das regiões de origem. A capacidade de criar "stocks" de comida permitiu essa internacionalização. No entanto, a exportação dos produtos para diferentes locais pode exigir muita energia, nomeadamente para o embalamento, refrigeração e transporte. Foi por estes motivos que o desenvolvimento da distribuição se deu na década de 40, quando os frigoríficos se tornaram acessíveis à maioria da população, seguido pelo desenvolvimento de embalagens a vácuo, uso de radiação e ionização, secagem e uso de conservantes artificiais (Carocho et al., 2015; Theron e Lues, 2011).

A necessidade de conservação de alimentos esteve sempre na história humana, sendo que os primeiros indícios do uso de métodos biológicos de conservação datam de 600 a 1000 a.C na produção de vinhos, pães, queijos, iogurtes e cervejas, através da fermentação. Há relatos datados de 1787 onde o Imperador da França, Napoleão Bonaparte, procurava meios de conservação de alimentos para uso do seu exército. Em 1864 foi comprovado, por Louis Pasteur, que a causa da deterioração do alimento era a presença de microrganismos. Outra descoberta, também feita pelo mesmo autor, foi um novo método de conservação, que consiste no aquecimento e selagem de embalagens, evitando a recontaminação do alimento pelo ar (Theron e Lues, 2011). Apesar dos avanços na ciência da conservação de alimentos, tanto em relação a novos métodos, como regulamentação e vigilância, as doenças causadas por alimentos contaminados/deteriorados ainda representam uma grande percentagem da morbimortalidade no mundo. Estudos estimam que cerca de 76 milhões de pessoas são anualmente afetadas por doenças transmitidas por alimentos, apenas nos Estados Unidos da América (Roller, 2003). A conservação de alimentos tem como um dos objetivos controlar os microrganismos indesejados, como bactérias, fungos e leveduras na cadeia produtiva, e assegurar a segurança e qualidade do produto em toda sua vida de prateleira, além de evitar perdas económicas (Aste et al., 2017; Carocho et al., 2015; Theron e Lues, 2011).

### *1.2.1. Problemática da conservação de alimentos*

A indústria alimentar está inserida numa rede que movimenta grandes quantidades de capital, recursos e investimentos, proporcionando grande potencial de inovação. Estima-se que a indústria agroalimentar movimente cerca de 750 mil milhões de euros/ano na economia europeia, sendo considerado o segundo maior setor económico. Dados indicam que cerca de 30% de todos os alimentos produzidos mundialmente são perdidos por deterioração ou desperdiçados, e que, este setor contribui com 22% das emissões dos gases de efeito estufa, além de consumir 30% da produção mundial de energia. As necessidades económicas, de processos com menor gasto energético e menos prejudiciais ao ambiente, bem como as necessidades dos consumidores impulsionam a criação de novas tecnologias que sejam mais verdes e sustentáveis (Carocho et al., 2015; Carocho et al., 2016; Direção Geral da Comunicação (CE), 2014; Woodhouse et al.; 2018). A Comissão Europeia apontou o desperdício e perda alimentar como uma das prioridades para aplicação da *European Circular Economy Strategy*, sendo que a segurança alimentar se apresenta como um dos principais desafios e problemas do século XXI (Jiménez-Moreno, 2020).

Um exemplo de deterioração alimentar é a oxidação lipídica, ou autoxidação, que se inicia com a libertação de um radical livre devido a alguma perturbação do ambiente ou de lipoxigenases (enzimas), entre outros, propagando-se com a formação de hidroperóxidos e terminando com a produção de moléculas não radicalares, ou seja, que não reagem com o meio que as rodeia, parando o processo de oxidação (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

As três principais técnicas de conservação de alimentos são: a) diminuição ou inibição da deterioração química e microbiana; b) inativação de bactérias, fungos e enzimas; e c) impedimento da recontaminação antes ou depois do processamento do alimento, sendo que geralmente são utilizadas mais do que uma técnica por produto. Os tipos de técnicas de conservação mais comuns são: a) diminuição de oxigénio, secagem, congelamento, mudanças estruturais, revestimento de superfícies, adição de conservantes, controlo de pH, entre outras; b) esterilização, pasteurização, irradiação, tratamento com pressão, luz e campos magnéticos; c) uso de embalagens, processamentos antissépticos, processamentos e armazenagem higiénica, utilização de normas como a ISO 9000 e realização de análises de risco (Grumezescu e Holban, 2018; Rahman, 2007). Muitas delas não são usadas

individualmente, mas sim em conjunto com outras para criar redundâncias e garantir a segurança do alimento.

Quando os consumidores têm a possibilidade de decidir entre produtos que irão consumir, geralmente dão prioridade a alimentos com menor processamento, seguida por alimentos com pouca quantidade de aditivos e de preferência com aditivos naturais, apesar de ainda existir uma certa dificuldade por parte da sociedade em identificar o que é natural ou artificial (Carocho et al.,2014; Carocho et al., 2015). Para atender à procura dos consumidores por alimentos mais seguros, saudáveis, com qualidade e funcionalidade, com menos aditivos, mais sustentáveis e que não afetem negativamente a saúde, a comunidade científica e a própria indústria alimentar têm vindo a intensificar a procura por inovações e alternativas, por exemplo, pela utilização de compostos naturais e extratos de plantas para substituir os aditivos artificiais. (Ahvenainen, 2003; Carocho et al., 2016; Roller, 2003).

### *1.2.2. Matrizes naturais como conservantes de alimentos*

A utilização de aditivos na indústria alimentar é uma prática que data do século XIX. No entanto, inicialmente, não existiam preocupações em relação à qualidade, quantidade e segurança dos aditivos que eram adicionados aos alimentos. Com a criação de métodos de análise e regulamentação, esse receio diminuiu, apesar de ainda hoje existirem desconfianças em relação ao seu uso (Carocho et al., 2014). Atualmente, o Codex Alimentarius reúne um conjunto de padrões aceites internacionalmente, bem como guias e códigos de qualidade e segurança. Estes materiais têm como objetivo proteger os consumidores, permitir uma troca mais justa no comércio e facilitar o próprio comércio internacional (Codex Alimentarius, 2020). De acordo com o Codex Alimentarius, aditivos alimentares são "quaisquer substâncias normalmente não consumidas como alimento e não utilizadas como um ingrediente típico do alimento, que tenham ou não valor nutritivo, e cuja adição intencional aos alimentos seja para fins tecnológicos (incluindo organoléticos) no processo de fabrico, processamento, tratamento, preparação, embalagem, transporte ou armazenamento, ou que se possa razoavelmente esperar que resulte (direta ou indiretamente) em tornar-se um componente ou afetar as características desses alimentos. O termo não inclui contaminantes ou substâncias adicionadas aos alimentos para manter ou melhorar as qualidades

nutricionais, nem o cloreto de sódio" (Carocho et al., 2015; Codex Alimentarius, 2020. Tradução do autor). O regulamento da União Europeia (UE) 1129/2011 lista todos os aditivos aprovados, bem como sua ingestão diária aceitável dentro dos países-membros. A identificação dos aditivos é feita por um código no qual é utilizada a letra "E", seguida de uma sequência de números. Esta nomenclatura é empregue tanto pela UE como pela Comissão do Codex Alimentarius. Os aditivos, são informalmente divididos em 6 grupos: conservantes, aditivos nutricionais, corantes, aromatizantes, aditivos de textura e agentes diversos. Além desta divisão, também existe a classificação em relação à origem e produção, ainda que também não seja oficial, mas que complementa a anterior: "aditivos naturais", obtidos diretamente de animais e plantas; "similar a aditivos naturais ou sintéticos", produzidos sinteticamente, porém mimetizando os naturais; "modificados do natural" aditivos naturais que são depois modificados quimicamente e "aditivos artificiais", aditivos desenvolvidos artificialmente (Carocho et al., 2014; Carocho et al., 2015).

Os aditivos naturais podem provir de diversas fontes, tais como fungos, algas, animais, plantas e microrganismos. A **figura 1** ilustra alguns dos aditivos naturais (conservantes e espessantes) mais utilizados em alimentos. Os óleos essenciais e outros compostos provenientes de plantas já são amplamente utilizados com o objetivo de proporcionar sabor aos alimentos, sendo alguns reconhecidos como seguros (GRAS) pela Food and Drug Administration of the United States of America (FDA). Outra motivação para a procura por esses aditivos naturais reside no facto de não terem efeitos nefastos para a saúde como alguns químicos podem ter, nomeadamente toxicidade, reações alérgicas ou ainda o risco de sobre-exposição diária (Carocho et al., 2015). Além de serem vistos como mais saudáveis em detrimento dos aditivos artificiais, que padecem de uma perceção negativa por parte dos consumidores, permitem também obter rótulos limpos (clean label) que é outra "corrente" interessante que a indústria procura promover. Estes rótulos dão a perceção positiva aos consumidores por não conterem palavras estranhas, geralmente reservadas aos aditivos alimentares, dando uma sensação de familiaridade e segurança a quem consome o alimento (Carocho et al.,2014; O'Sullivan e O'Mahony, 2016).

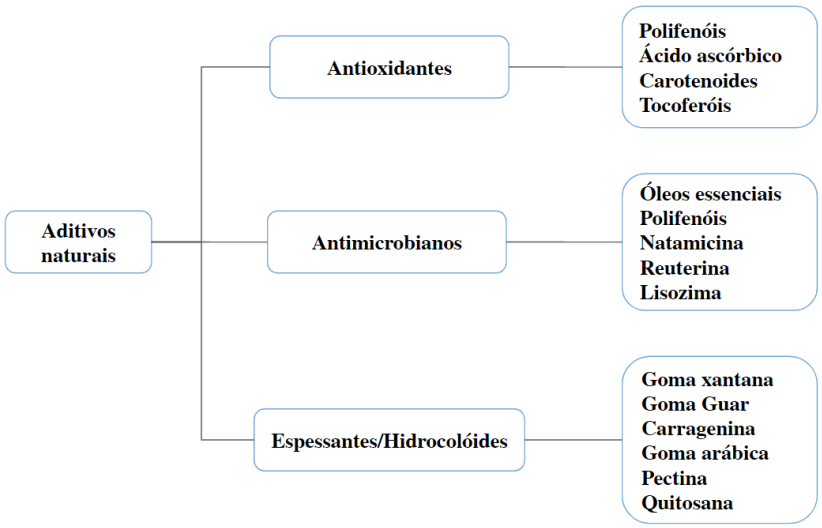
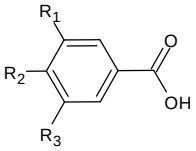
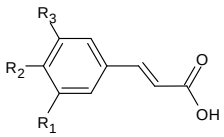
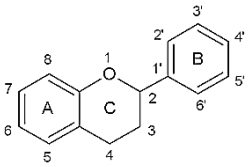
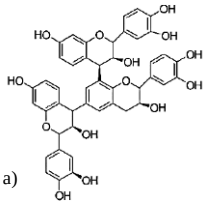
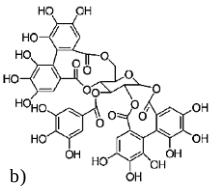
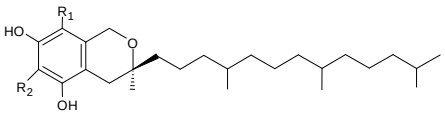
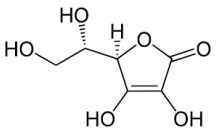
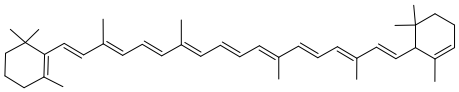



**Figura 1** – Conservantes e espessantes naturais. Fonte: Carocho et al., 2014. Adaptado

Os conservantes alimentares têm como objetivo aumentar o tempo de vida de um produto e podem ser subdivididos em 3 grupos de acordo com a sua função: antimicrobianos, antioxidantes e anti escurecimento. De acordo com a regulamentação da UE 1129/2011 os conservantes abrangem a faixa do E200 ao E399 (Carocho et al.,2014; O'Sullivan e O'Mahony, 2016). Campos (2019), definiu antioxidantes como substâncias que inibem ou atrasam as reações de oxidação. Assim, dentro dos conservantes naturais existem os flavonoides, ácidos fenólicos, tocoferóis, alcaloides, aminoácidos, ácido ascórbico (vitamina C) e os carotenoides. A **tabela 2** ilustra alguns compostos e suas respectivas estruturas. Os agentes antimicrobianos proporcionam resistência e defesa contra o crescimento microbiano, quer de microrganismos patogénicos como não patogénicos, e consequentemente controlam a sua deterioração alimentar. Os polifenóis, terpenos, esteróides, alcalóides e óleos essenciais são alguns exemplos de compostos com propriedades antimicrobianas (Carocho et al., 2016; Rahman, 2007). Finalmente, os agentes anti escurecimento têm como objetivo impedir o escurecimento, enzimático ou não enzimático, dos alimentos no seu ciclo de vida. No primeiro caso, o agente tende a evitar a decomposição de polifenóis em quinonas que escurecem o alimento. No segundo caso, o agente tende a evitar a caramelização do açúcar no alimento e a produção de melanóides em resultado da reação entre grupos carbonilo e grupos amina livres (Carocho et al., 2014).

**Tabela 2** – Representação dos principais conservantes naturais, exemplos e estrutura química.

| Conservantes naturais | Exemplos | | Estrutura básica | Referências |
|---|---|---|---|---|
| **Ácidos fenólicos** | Derivados do ácido hidroxibenzóico | Ácidos<br>*p* -hidroxibenzóico<br>protocatecuico<br>vanílico<br>siríngico<br>gálico |  | Wrolstad et al., 2005; Shahidi e Ambigaipalan, 2015. |
| | Derivados de ácido hidroxicinâmico | *p* -cumárico<br>cafeico<br>ferúlico<br>sinápico |  | |
| **Flavonoides** | Flavan-3-ols<br>Flavonols<br>Isoflavonas<br>Flavanonas<br>Antocianinas<br>Quercetina | |  | Shahidi e Ambigaipalan, 2015; Campos, 2019. |
| **Taninos** | Taninos condensados (a) | Monómeros<br>Dímeros<br>Trímeros<br>Polímeros |  a) | Shahidi e Ambigaipalan, 2015; Das et al., 2020. |
| | Taninos hidrolisáveis (b) | Elagitaninos<br>Galotaninons |  b) | |
| **Tocoferois** | | α-tocoferol<br>β-tocoferol<br>ɣ-tocoferol<br>δ-tocoferol |  | Shahidi e Ambigaipalan, 2015; Campos, 2019. |
| **Ácido ascórbio** | | |  | Theron e Lues, 2011; Campos, 2019 |
| **Carotenoides** | | β-carotenoides<br>α-carotenoides<br>ɣ-carotenoides<br>β-criptoxantina |  | Campos, 2019; Hermanns, 2020. |

#### *1.2.2.1. Caso particular da família Lamiaceae na conservação de alimentos*

A família Lamiaceae contém cerca de 6900 a 7200 espécies, entre elas o alecrim, hortelã, tomilho, lavanda, manjericão, orégão, cidreira e sálvia. São plantas aromáticas, de fácil cultivo e amplamente utilizadas na culinária (Raja, 2012). Estudos indicam que esta família de plantas possui uma grande variedade de compostos, com atividade biológica e grande quantidade de compostos fenólicos, principalmente de ácido rosmarínico. Alguns dos bioativos mais encontrados nessa família são os ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides, tornando a família Lamiaceae numa das mais importantes famílias de plantas medicinais (Vladimir-Knezevic et al., 2014; Zgórka e Glowniak, 2001).

#### *1.2.2.2. Caraterização botânica e aplicação de extratos de Cidreira, Orégão e Alecrim em alimentos*

Os extratos de ervas aromáticas e medicinais têm um grande potencial de aplicação na indústria alimentar, sendo usados como conservantes, pois conferem bioatividades a esses alimentos (Mimica-Dukic et al., 2004).

A **cidreira** *(Melissa officinalis L.*) (**figura 2**) é uma erva perene nativa do sul da Europa que cresce, de maneira natural, em áreas arenosas. Esta erva é caracterizada por ser um herbáceo ereto com folhas ovadas, dentadas e opostas, que cresce em hastes quadradas e ramificadas, semelhante a um arbusto. As suas folhas podem ser lisas ou ligeiramente "peludas". As flores da cidreira são pequenas e possuem dois lábios que crescem em cachos tortos com variações na coloração, podendo ser amarela, branca, rosada, roxa ou azul. A sua altura pode alcançar 1,5 metros e a largura pode variar de 0,30 a 0,60 metros (Meyers, 2007).

**Figura 2** - *Melissa officinalis L.* Fonte: The Herb Society of America, 2007

O **orégão** (*Origanums vulgare L.*) (**figura 3**) é uma erva nativa da região Mediterrânica e da Eurásia, amplamente utilizada na culinária e na medicina tradicional como fragrância e planta ornamental. O orégão é uma erva perene, com raízes rasteiras, caules lenhosos e ramificados, folhas pecioladas e "peludas". As folhas apresentam-se com brácteas avermelhadas em corimbos, uma corola arroxeada de dois lábios e um cálice de cinco dentes. A folhagem apresenta pequenas glândulas pontilhadas que contém óleos essenciais que proporcionam à planta o sabor e aroma. O género Origanum possui mais de 44 espécies que geralmente crescem em áreas rochosas e calcárias (Meyers, 2005; Peter, 2004; The American Herb Society, 2005).

**Figura 3** - *Origanum vulgare L.* Fonte: Rockstein, 2017

O **alecrim** (*Rosmarinus officinalis L.*) (**figura 4**) é uma erva perene aromática, densa com folhas, pequenas, pontiagudas, resinosas e peludas. Os galhos são rígidos com casca

fissurada e caule quadrado, amadeirado e castanho. As flores formam-se em florescência cimeira e apresentam uma coloração azulada. O alecrim é nativo da região Mediterrânica, pode chegar a 200 cm de altura e, geralmente, é adaptado para terrenos secos, clima quente e ensolarado. Grande parte da planta (folhas, flores e galhos) produz óleos essenciais utilizados na medicina, em aromatizantes e em indústrias de sabores. Extratos de alecrim já são também usados dentro da União Europeia como conservante alimentar, com código E392 (Peter, 2004).

**Figura 4** - *Rosmarinus officinalis L.* Fonte: Garcia-Cabral, 2010

De entre os agentes bioativos presentes nestas plantas, os compostos fenólicos, moléculas resultantes do metabolismo secundário das plantas (**Figura 5**) (Campos, 2019), são dos mais abundantes e importantes, sendo poderosos antioxidantes naturais que atuam como captadores de moléculas oxidantes. Estes compostos são estudados devido à sua capacidade de combater o "stress" oxidativo e, por consequência, distúrbios metabólicos e patológicos.

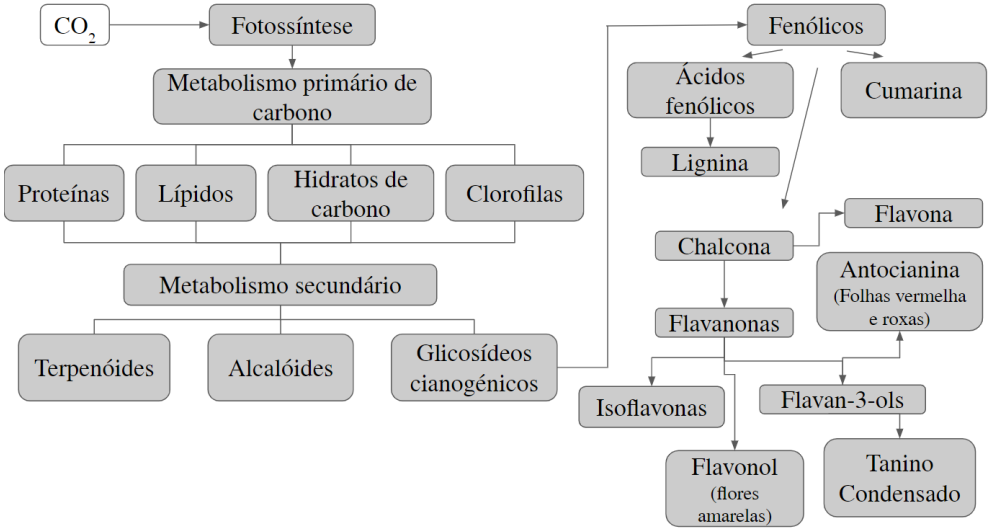



**Figura 5 –** Fluxograma dos metabolitos primários e secundários das plantas. Fonte: Campos, 2019. Adaptado

Os compostos primários têm funções de manutenção das células e compreendem as proteínas, hidratos de carbono, ácidos gordos, entre outros. Os metabolitos secundários possuem maior diversidade de compostos, e são responsáveis pela defesa das plantas, sinalização e vigilância (ex.: contra oxidantes e radiação ultravioleta).

Mais de 100 compostos já foram identificados na cidreira, nomeadamente o citral, citronelal, geraniol e linalol sendo responsáveis pelo seu aroma e sabor; óleos essenciais, flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, tocoferóis, ácido rosmarínico, ácido caféico e vitamina C com atividade antioxidante; taninos que proporcionam efeitos antivirais e acetato de eugenol que pode ter efeitos antiespasmódicos (Campos, 2019; Meyers, 2007; Vladimir-Knezevic et al., 2014).

De acordo com Mimica-Dukic et al. (2004) a cidreira é bastante conhecida pelo seu uso em bebidas e utilizada para o tratamento de dores de cabeças, reumatismo, nervosismo e problemas gastrointestinais. Tem também atividade antibacteriana tanto contra bactérias Gram-positivas, como o *Staphylococcus epidermidis,* como contra Gram-negativas, *Escherichia coli,* e *Salmonella enteritidi.* Caleja et al. (2018) investigou a bioatividade da cidreira, tendo descrito que os resultados obtidos evidenciaram a forte atividade antioxidante do extrato e seu o potencial uso em produtos de pastelaria.

O orégão, apresenta metabolitos como compostos fenólicos e óleos essenciais. O carvacrol, composto fenólico com propriedades antibacterianas e antifúngicas, responsável pelo sabor forte e picante, e o timol, são os principais compostos presentes (Meyers, 2007; Vladimir-Knezevic et al., 2014).

Na indústria alimentar, o oregão pode ser utilizado em saladas, carne, sopas, entre outros alimentos. O seu óleo é bastante utilizado em alimentos assados, bebidas alcoólicas e condimentos, e ainda como antioxidante em maioneses. Estudos anteriores evidenciaram a atividade bactericida do óleo essencial em peixes crus e carnes. Dentre as bactérias inibidas estão a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *S. enteritidis*. Existem ainda outros estudos que evidenciam o seu uso no tratamento de doenças respiratórias, gastrointesninais, urinárias e dermatológicas (Peter, 2004).

O alecrim, possui grande quantidade de compostos fenólicos, sendo o ácido rosmarínico o principal, além de óleos essenciais obtidos das folhas, flavonóides e derivados do ácido carnósico (ex: diterpenos). As atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antidiabética, antitumoral, entre outras, devem-se à presença destes compostos no alecrim, o que explica também o seu amplo uso medicinal, além do uso culinário (Gonçalves et al., 2018; Ribeiro et al., 2016).

O óleo essencial e o extrato podem ser utilizados como estabilizantes em alimentos que contenham gordura como óleos, manteigas e afins (Peter, 2004). Alguns estudos evidenciaram um efeito na redução da taxa de oxidação em carnes processadas e peixes com a incorporação dos extratos de alecrim (Piñeros-Hernandez et al., 2017). Ribeiro et al. (2016) também analisou a adição de extratos de alecrim em queijos e os resultados mostraram uma melhoria nas propriedades antioxidantes do produto final. Os compostos presentes no alecrim com maior importância para a indústria alimentar são, além do ácido rosmarínico, o ácido carnósico e o carnosol. Estes compostos são os principais responsáveis pelo facto de o extrato de alecrim (E392) ser já aprovado como aditivo alimentar (natural) dentro da UE, aprovado pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) (Meyers, 2007; Ribeiro et al., 2016; Rižnar et al, 2006). Assim, é um objetivo deste trabalho verificar a capacidade de extratos de alecrim inibirem a oxidação e a contaminação por microrganismos em muffins, além de outros extratos provenientes de orégãos e cidreira.

### 1.3. A importância da extração de compostos bioativos de plantas

O estudo do uso de extratos de plantas como fonte de componentes bioativos está diretamente ligado ao processo de extração, no qual influenciará no resultado final do extrato, ou seja, na sua composição e, consequentemente, no efeito que proporcionará no produto onde for utilizado (Azmir et al., 2013).

As técnicas de extração são de grande importância para extrair de forma adequada e eficiente os compostos desejados de cada planta. Uma divisão que pode ser feita entre as técnicas de extração para aquisição de compostos fenólicos, por exemplo, divide-se em métodos convencionais (ex.: extração por Soxhlet, maceração, maceração dinâmica, etc.) e não convencionais (ex.: extração assistida por ultrassom, por micro-ondas e por enzimas, extração com fluido supercrítico, etc.). Métodos convencionais possuem desvantagens, como maiores tempos de extração, uso de solventes com custos mais elevados e com necessidade de alta pureza, bem como a possibilidade de favorecer a decomposição de compostos termolábeis a altas temperaturas (Azmir et al., 2013; Joavanović et al., 2017; Sik et al., 2020). No entanto, também apresentam a vantagem de serem mais baratos, seguros e escaláveis (Oliveira et al., 2016). As desvantagens, citadas anteriormente, fazem com que as técnicas não convencionais para a extração ganhem importância, tanto na ciência como na indústria (Sik et al., 2020). Estas técnicas possuem vantagens, nomeadamente a redução do uso de grandes quantidades de solventes, tempos menores de extração e maior qualidade do extrato, além de apresentarem menor impacto ambiental (Joavanović et al., 2017).

Parâmetros como o tempo, temperatura, características do solvente, razão sólido-líquido e pressão são importantes no processo de extração e influenciam o resultado final (Azmin et al., 2016). Por isso, a escolha do processo de extração adequado e com parâmetros adequados deve ser estudada, para que se possa obter extratos de forma eficiente, satisfatória e com qualidade (Sik et al., 2020). O método ideal de extração deveria ser executado em curtos espaços de tempo, com menor consumo energético e de solvente, preferencialmente, com solventes que não sejam prejudiciais à saúde humana, e que não degrade os compostos desejados (Sik et al., 2020). Para que isso aconteça, a otimização com uma escolha de parâmetros e fatores adequados torna-se importante (Albuquerque et al., 2020).

### 1.4. A importância da textura de alimentos

Apenas na década de 60 é que a textura foi considerada como uma característica chave no estudo da qualidade, ciência e tecnologia alimentar. Nesta década também, o livro "Food Texture" foi lançado e abriu o caminho para posteriores estudos na área e criação de revistas científicas sobre o tema, como é o caso do "Journal of Texture Studies". Este novo fator foi considerado pela necessidade de entender a perceção sensorial humana em relação ao alimento e a necessidade da indústria por inovação (Chen e Rosenthal, 2015). A textura e estabilidade dos alimentos dependem da microestrutura do produto, que por sua vez é consequência da estrutura de seus elementos. As diferentes interações entre os elementos são controladas pelos ingredientes e componentes adicionados no seu processamento (Scholten et al., 2014). De acordo com Wrolstad et al. (2005) deMan (1976) definiu textura como "a maneira como os componentes estruturais do alimento são arranjados na micro e macroestrutura e a manifestação externa dessa estrutura". Existem ainda outros fatores que podem influenciar e afetar a estrutura, nomeadamente a embalagem, o armazenamento do produto e as condições de processamento do mesmo (Chen e Rosenthal, 2015). A textura tal como a aparência, sabor e perfil nutricional pode ser considerada como um fator da qualidade nos alimentos. Além disso, esta pode ser descrita em relação a um conjunto de propriedades sensoriais, como a dureza, coesividade, fraturabilidade e mastigabilidade. Outro aspeto importante é a relação com a reologia do alimento. Assim, a qualidade sensorial correlaciona-se com a qualidade da textura (Meullenet e Gross, 1999; Wrolstad et al., 2005). Os mecanismos de sensação dividem se em três: o visual, que engloba a aparência, brilho, tamanho; a acústica, que envolve a audição e é evidenciada pela crocância; e a tátil, que é evidenciada pelo contato direto entre a pessoa e o alimento, sendo esta última, a mais estudada (Chen e Rosenthal, 2015).

De acordo com a classificação (crítica, importante e menor) de Bourne (2002) referente à importância da textura, os pães e outros produtos derivados de cereais, como os muffins, encaixariam na classe de importante, pois apesar da textura contribuir para a qualidade do alimento, tem a mesma importância no sabor e na aparência do produto.

A **Tabela 3** apresenta alguns dos possíveis testes para medir essas características. Os testes objetivos são conduzidos por equipamentos e os sensoriais por pessoas treinadas para o efeito (Bourne, 2002).

**Tabela 3** – Ensaios para medir a textura dos alimentos. Fonte: Bourne, 2002. Adaptado

| **Objetivo** | | **Sensorial** | |
|---|---|---|---|
| **Direto** | **Indireto** | **Oral** | **Não oral** |
| Fundamental | Ótica | Mecânica | Dedos |
| Empírica | Química | Geométrica | Mão |
| Imitativo | Acústica | Química | Olhos |
| | Outras | | Outros |

Nos testes objetivos diretos, as medidas adquiridas retrataram os valores reais da textura. Em contrapartida, os indiretos são calculados a partir de correlações com outras propriedades. A avaliação sensorial pode ser realizada por meio dos cinco sentidos: visão, paladar, toque, audição e olfato. Estes ao serem realizados em contacto com a boca são definidos como teste oral, quando com outra parte do corpo humano, teste não oral (Bourne, 2002).

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta dois objetivos principais: a) otimizar a extração dos extratos de 3 plantas (alecrim, cidreira e orégãos); b) avaliar a capacidade conservante destes extratos de plantas em muffins de chocolate.

Objetivos específicos deste trabalho:

- Otimização da extração de compostos bioativos conservantes utilizando: extratos aquosos e extratos hidroetanólicos, pela técnica de extração assistida por ultrassons (EAU) e determinação das condições ótimas de extração;
- Caracterização química dos extratos obtidos por técnicas de cromatografia líquida e gasosa;

- Caracterização bioativa dos extratos de plantas através da sua atividade antioxidante e antimicrobiana;
- Incorporação dos melhores extratos de plantas em muffins de chocolate;
- Avaliação nutricional, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares solúveis dos muffins ao longo do tempo de prateleira, analisando no dia de fabrico, após 4 e 8 dias;
- Avaliação de outros parâmetros físico-químicos dos muffins ao longo do tempo de prateleira: cor e textura.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Plantas

As plantas utilizadas no presente estudo foram o alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), o orégão (*Origanums vulgare L.*) e a cidreira (*Melissa officinalis L.*). O alecrim e os orégãos foram adquiridos à empresa agrícola "Cantinho das Aromáticas", com sede em Vila Nova de Gaia, Portugal, especializada na venda de plantas aromáticas, medicinais e condimentares. A cidreira (*Melissa officinalis L.*) foi obitida da empresa "Mais Ervas", que também é especializada em plantas aromáticas e medicinais, com sede em Alfândega da Fé, Portugal. As plantas foram adquiridas em seco e trituradas a uma dimensão de 20 *mesh* numa trituradora (Moulinex A320, Mayenne, França) (**Figura 6**).

**Figura 6** – Extratos de a) alecrim, b) orégão e c) cidreira após trituração

### 3.2. Otimização da extração de compostos bioativos de plantas

#### *3.2.1. Extração assistida por ultrassons (EAU)*

A extração de compostos bioativos assistida por ultrassom das diferentes espécies estudadas foi realizada por um sistema ultrassónico (modelo CY-500, Optic Ivymen System, Barcelona, Espanha) (**Figura 7**) com uma sonda de titânio. A relação sólido-líquido foi ajustada a cada repetição para se manter o volume constante entre os ensaios. Após cada extração, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm; por 20 min a 10 °C), filtradas por meio de filtros de papel (Whatman nº 4) e secas a 40 ºC com o evaporador rotativo a vácuo (Heidolph Hei-VAP Advantage), com rotação média de 80 rotações por minuto (rpm). A fração aquosa foi liofilizada (47 ºC, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) para obtenção do extrato em pó. Os extratos foram armazenados num local seco para análise posterior.

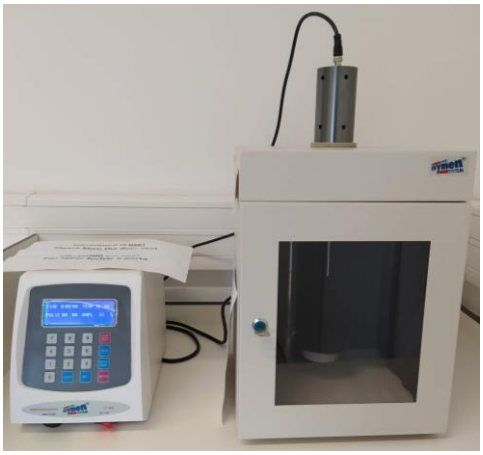


**Figura 7** – Homogeneizador ultrassónico utilizado para técnica de extração assistida por ultrassons

### *3.2.2. Teste de rastreio*

#### *3.2.2.1. Design fatorial fracionário*

A primeira parte da análise de rastreio para otimização das extrações foi executada no alecrim e baseada num design fatorial regular de dois níveis com resolução IV ($2^{(3-1)}$), também conhecido como design fatorial fracionário, um método ideal utilizado para análises de otimização. O design foi construído e aleatorizado usando o software Design expert 12.0.1. (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN, USA), composta por 4 corridas (duas repetições por condição). As variáveis fixas da experiência foram definidas como X1: tempo (7.5 e 12.5 min), X2: solvente (0 e 80% EtOH) e X3: potência do ultrassom (275 e 450 W). A variável dependente foi expressa de acordo com o conteúdo do ácido rosmarínico (Y1). A **tabela 4** apresenta os valores utilizados de cada variável nas primeiras extrações, todas a temperatura ambiente. No design fatorial fracionário, os fatores foram nomeados como Intercept = Intercept + ABC, A = A + BC, B = B + AC e C = C + AB para determinar os fatores pertinentes e intervalos de experimentação a serem usados em designs de otimização futuras.

**Tabela 4** – Valores dos parâmetros utilizados em cada extração assistida por ultrassom para otimização do processo.

| **Técnica de extração assistida por ultrassons (EAU)** | | | |
|---|---|---|---|
| **Extração** | **Tempo (min)** | **Potência (W)** | **Solvente** |
| **A** | 12,5 | 275 (50%) | Etanol: $H_2O$ (80%) |
| **B** | 7,5 | 450 (90%) | Etanol: $H_2O$ (80%) |
| **C** | 7,5 | 275 (50%) | $H_2O$ |
| **D** | 12,5 | 450 (90%) | $H_2O$ |

*3.2.2.2. Design fatorial geral*

A seleção secundária e avaliação dos fatores e níveis foi realizada para determinar os domínios experimentais apropriados seguindo as diretrizes do primeiro teste. As variáveis independentes foram $X_1$: tempo (10-300 s) e $X_4$: temperatura (20-75 ºC) a 6 e 4 níveis diferentes, respectivamente. Para cada um dos 2 fatores, uma análise "multinível unifactorial" ou um "fatorial geral" foi executada e analisada.

Um conjunto de extrações foi feita com a potência fixa (275W – 55%) e solvente fixo (etanol:água 80%), variando apenas o tempo de extração. Os tempos utilizados foram $t_1$ = 10 s; $t_2$ = 15 s; $t_3$ = 30 s; $t_4$ = 1 min; $t_5$ = 2 min; $t_6$ = 5 min. A **figura 8** ilustra as diferentes colorações obtidas da cidreira em relação a cada tipo de extração. Na terceira etapa, o tempo selecionado foi fixado (2 min), bem como a potência (275 W) e as extrações foram realizadas variando apenas a temperatura $T_1$ = 20 ºC $T_2$ = 25 ºC; $T_3$ = 50 ºC; $T_4$ = 75 °C (**figura 9**).

**Figura 8** – Soluções obtidas após a extração da cidreira com potência (275W – 55%), solvente (etanol:água 80%) e variação do tempo (10 s – 5 min) (seis balões da esquerda). Extração feita variando apenas a temperatura (20 ºC - 75 ºC) (três balões da direita)

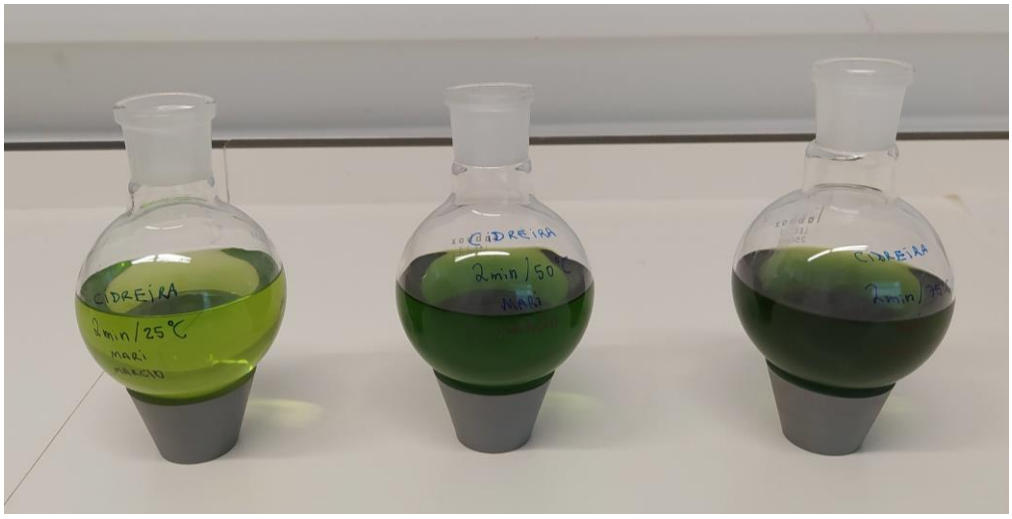



**Figura 9 –** Solução obtida após a extração com potência (275W – 55%), solvente (etanol:água 80%) variando apenas a temperatura (20 ºC - 75 ºC)

As condições fixas empregues nas etapas de otimização foram de 5 g de pó do extrato moído em 200 mL do solvente, ambos adicionados num goblé de 200 mL (**Figura 10**).

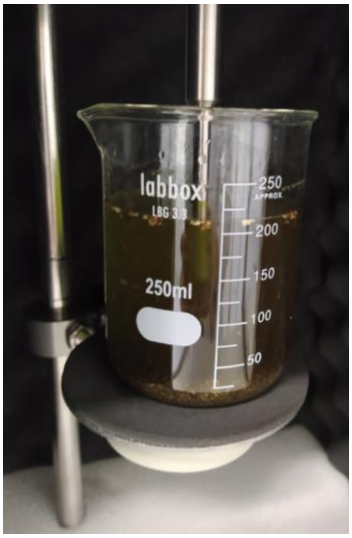



**Figura 10** – Ilustração e posicionamento central das extrações no ultrassons

### *3.2.3. Caracterização do perfil fenólico e respetiva quantificação*

Os dados cromatográficos foram analizados por meio de um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 ºC), um desgasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado (**figura 11**). A deteção dos compostos foi efetuada com detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm e acoplado a um detetor de espectrometria de massa (MS). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 $C_{18}$ (3 μm, 4.6 mm × 150 mm, Waters, Milford, MA, USA), a 35 ºC. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL/min. A deteção de massas foi realizada utilizando um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA), equipada com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI). O gás de arraste utilizado foi azoto (50 psi); o sistema trabalhou com uma voltagem de *spray* de 5 kV, a uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a -66 V. Os espetros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando

o programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Os compostos foram identificados através da informação obtida (tempos de retenção, e espectros UV-VIS e massa) por comparação com compostos padrão, quando disponíveis, ou utilizando dados reportados na literatura. Para a quantificação foram obtidas curvas de calibração de compostos fenólicos padrão (Extrasynthèse, Genay, France), construídas com base no sinal UV de cada composto. As moléculas que não foram identificadas com padrões comerciais disponíveis, foram quantificadas através da curva de calibração dos padrões mais similares. Os resultados foram expressos em mg/g de extrato, a utilizar o ácido cinâmico como ácido fenólico, ácido rosmarínico como o principal composto na família Lamiaceae e a quercetina para flavonoides.

**Figura 11** – Cromatógrafo líquido de ultra performance, acoplado a um detetor de díodos e um detetor de massa de ionização por electro-*spray* (UPLC-DAD-ESI/MS)

### 3.3. Avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica dos extratos

A atividade antioxidante foi realizada pelo método de hemólise oxidativa de inibição (OxHLIA) de acordo com Lockowandt et al. (2019). As amostras de extratos foram pesadas (10 mg) e diluídas em 2 mL de solução hidroetanólica (etanol:$H_2O$ – 20:80). As amostras foram depois transferidas para *vials* de análise, por meio de seringas e filtros de *nylon*. Uma solução de eritrócitos (2,8%, v/v, 200 µL) preparada em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4)

foi misturada em 400 μL de solução de extrato (6-500 μg/mL em PBS), PBS (controlo), água (para hemólise completa) ou no controlo positivo trolox (7,81-250 μg/mL em PBS). Após a pré-incubação a 37 ºC por 10 min com agitação, 200 μL de *2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride* (AAPH, 160 mM em PBS, da Sigma-Aldrich) foram adicionados e a densidade óptica foi medida a 690 nm a cada 10 min num leitor de microplaca (Bio-Tek Instruments, ELX800) até a hemólise completa. Os valores de $\Delta t$ (min) resultantes da metade do tempo de hemólise ($Ht_{50}$ valores) obtidos das curvas hemolíticas de cada concentração de amostra de extrato, menos o valor $Ht_{50}$ do PBS controlo foram recolhidos. A respetiva concentração de extrato para os valores obtido de $IC_{50}$ (μg/mL), calculados por períodos de 120 e 180 min, representam a concentração de extrato necessária para proteger 50% da população de eritrócitos da ação hemolítica da AAPH.

Para a atividade antimicrobiana e antifúngica as amostras (20 mg) foram preparadas e analisadas pelo método de microdiluição em microplaca, permitindo encontrar as concentrações mínimas inibitórias e bactericidas/fungicidas. Neste ensaio foram usadas espécies diferentes de contaminantes alimentares seguindo o procedimento descrito por Soković et al., (2010), nomeadamente três bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes* e três bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* e *Enterobacter cloacae*. Para a determinação da atividade antifúngica, seis micromicetes foram testados: *Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus versicolor, Penicillium funiculosum, Trichoderma viride* e *Penicillium verrucosum var. cyclopium.*

Para rastrear a segurança do extratos obtidos, estes foram testados quanto à sua toxicidade em células normais primárias de fígado porcinas (PLP2), pelo método da sulforrodamina B, descrito por Guimarães et al, (2013). Os extratos foram analisados na faixa de concentração entre 400 e 1,56 μg/mL, para determinar a concentração de extrato que proporciona inibição de 50% do crescimento celular. A elipticina foi utilizada como controlo positivo.

### 3.4.Muffins

#### *3.4.1. Preparação dos Muffins*

Os Muffins foram feitos com base na receita descrita por Karp et al. (2017). Os ingredientes e suas respectivas quantidades foram descritas na **tabela 5**.

**Tabela 5** – Ingredientes para confecção dos muffins expresso para 100 g de farinha.

| Ingredientes | Quantidade (g) |
|---|---|
| **Farinha** | 100 |
| **Ovo** | 56 |
| **Leite em pó** | 50 |
| **Açúcar** | 60 |
| **Chocolate em pó** | 15 |
| **Óleo vegetal** | 35 |
| **Fermento em pó** | 5 |
| **Ácido cítrico** | 0.75 |
| **Sal** | 1.25 |
| **Água** | 35 |

Nove lotes de muffins foram produzidos variando o tipo de conservante e extrato utilizado, sendo que um dos lotes foi o controlo, sem a adição de nenhum conservante. Em cada lote foram produzidos 9 muffins (3 muffins para cada tempo de análise) (dia de produção, após 4 dias e após 8 dias) e para esta produção foram utilizados 150 g de farinha e as respetivas percentagens dos outros ingredientes.

Após pesar a quantidade de cada ingrediente, a receita seguiu o seguinte protocolo: os ingredientes secos foram adicionados (exceto o fermento em pó e o extrato), misturados

por 20 s na batedeira (KitchenAid Artisan 5KSM125EER, Michigan, EUA). Depois os líquidos foram adicionados, a água junto com extrato conservante e por último o fermento em pó. A massa foi misturada na mesma batedeira por 2 min. Após a preparação, 50 g da massa foi adicionada à forma para tomar a forma de muffin (**figura 12**). O forno foi pré-aquecido por 15 min e os muffins foram assados num forno convectivo (Princess 112390, Tilburgo, Holanda) por 20 min a 180 ºC.

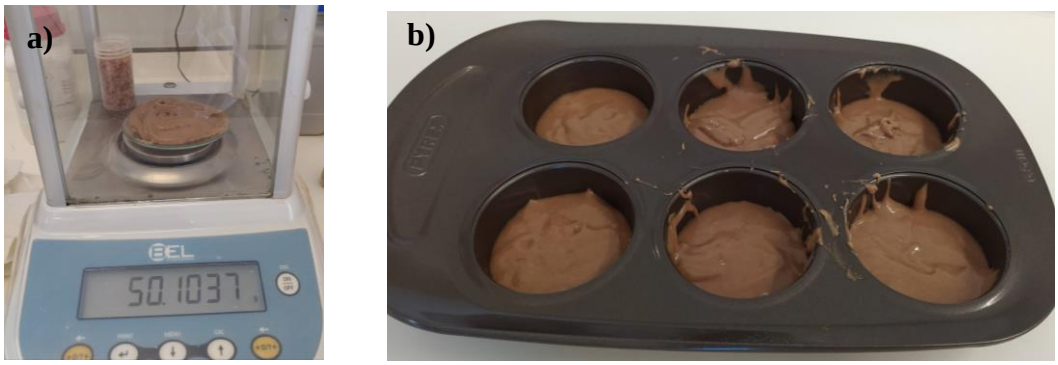



**Figura 12** – Processo de a) pesagem e b) adição da massa à bandeja

Os muffins foram arrefecidos durante 10 min, tirados da bandeja e três deles foram analisados no próprio dia (T0). Os outros foram guardados em recipientes plásticos selados, sendo que 3 muffins foram retirados após 4 dias (T4) para análise, e os últimos 3 após 8 dias (T8). A **tabela 6** expressa os valores utilizados em cada receita e o código empregue para identificar cada muffin em relação ao lote e ingrediente inserido como possível conservante.

Este trabalho permitiu comparar vários parâmetros físico-químicos de muffins sem qualquer conservante (MC), conservados com um conservante sintético (MS2 e MS0,2), utilizado em vários produtos de pastelaria, o sorbato de potássio, e finalmente com conservantes naturais, extraídos de alecrim (MA), cidreira (MCID) e orégãos (MO). O racional para a adição de quantidades destes conservantes aos muffins baseou-se na quantidade máxima permitida por lei dentro da União Europeia de extrato de alecrim (200 mg/kg matéria gorda) em produtos de pastelaria, usando os extratos naturais nessa mesma quantidade, bem como o sorbato de potássio (MS0,2). Foi também adicionada a outros muffins a quantidade máxima permitida de sorbato de potássio em snacks de produtos de

pastelaria (2000 mg/kg) (MS2), sendo que os extratos naturais também foram adicionados nesta concentração (MAMAX, MCIDMAX, MOMAX) a outros muffins.

**Tabela 6** – Códigos e quantidade de conservantes (naturais e sintéticos) adicionados aos muffins.

| Extrato | Código | Quantidade (100 g de farinha) |
|---|---|---|
| - | MC | - |
| **Alecrim** | MA | 0,0086264 g |
| | MAMAX | 0,731 g |
| **Cidreira** | MCID | 0,0086264 g |
| | MCIDMAX | 0,731 g |
| **Orégão** | MO | 0,0086264 g |
| | MOMAX | 0,731 g |
| **Sorbato de Potássio** | MS2 | 0,731 g |
| | MS0,2 | 0,0086264 g |

### *3.4.2. Análises químicas*

#### *3.4.2.1. Perfil nutricional*

As análises do perfil nutricional (proteínas, gorduras, humidade e cinzas) foram feitas de acordo com a metodologia oficial da AOAC, 17ª edição (AOAC, 2016).

A humidade dos muffins foi determinada através de um analisador de humidade da empresa Adam Equipment (modelo PBM 163, Oxford, EUA). A amostra, 2 g de cada muffin, foi colocada no prato metálico e inserida no equipamento. A amostra foi aquecida até registar uma temperatura constante durante um intervalo de tempo definido, registando a evaporação de toda a água. Após subtrair o valor final ao inicial, é calculado o valor da humidade.

O conteúdo de cinzas foi determinado pelo método AOAC 923.03, que consiste na queima da matéria orgânica a altas temperaturas. A amostra liofilizada, 0,25 g de cada muffin liofilizado, foi pesada e adicionada a cadinhos de porcelana, e incinerados na mufla, onde (Optic Ivymen System, N-8L, Barcelona, Espanha) (**figura 13**) por 5 h a 550º C.

**Figura 13** – Mufla com os cadinhos em seu interior

O conteúdo em proteínas foi calculado pelo método AOAC 920.87, que consiste na destruição da matéria orgânica por um ácido forte e se baseia na quantidade de azoto (N) da amostra para quantificar as proteínas. A análise foi feita pelo método Macro-Kjeldahl, usando o fator de conversão 6,25 (N x 6,25). Cada amostra liofilizada (0,25 g) foi adicionada aos tubos de ensaio e digeridas com o agente catalisador, $K_2SO_4/CuSO_4$, e em 15 mL de ácido sulfúrico por 70 min a 400 ºC. Após o arrefecimento, os tubos foram inseridos no destilador Kjeldahl (modelo Pro-Nitro-A, JP Selecta, Barcelona) (**figura 14**) onde uma destilação alcalina estável e um titulação ocorria no equipamento, informando a quantidade de azoto.

**Figura 14** – Destilador Kjeldahl utilizado para a análise do conteúdo de proteínas

O conteúdo de gordura bruta foi determinado pelo método AOAC 920.85, que se baseia na extração de gordura por soxhlet usando éter de petróleo como solvente de extração. Cada amostra de muffin liofilizado (2 g) foi pesada, colocada em cartuchos de papel de filtro e cobertas com algodão. Os cartuchos foram introduzidos nos soxhlets (**figura 15**), juntamente com o éter petróleo. O equipamento foi aquecido a, aproximadamente, 80 ºC e após 4 horas, a solução contendo a gordura foi retirada, transferida para tubos de ensaios, previamente pesados, e encaminhadas para evaporação. Depois da secagem, o tubo de ensaio foi pesado novamente e o conteúdo de gordura quantificado.

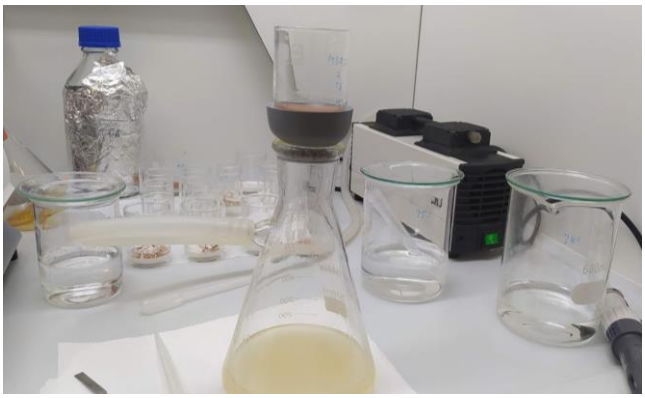
**Figura 15** – Extrator Soxhlet

O conteúdo de fibras dietéticas totais (TDF) foi determinado pelo método AOAC 985.29, que consiste na combinação de métodos enzimáticos e gravimétricos. O Kit TDF-100A (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suíça) foi utilizado para o ensaio. Cada amostra liofilizada (4 repetições cada) foi pesada (0,5 g) e adicionada a tubos de falcon.

Na primeira etapa, extração, 25 mL de tampão fosfato (pH 6,0) foi adicionado ao recipiente, juntamente com 0,05 mL da enzima α-amilase (para gelatinizar a amostra) e incubados por 15 min a 95 ºC. Após arrefecer, o pH da solução foi ajustado para 7,5 com NaOH, e 0,05 mL (50 mg/mL) da enzima protease (para eliminar a proteína) foi adicionada, sendo a solução incubada por mais 30 min a 60 ºC, com agitação. Novamente, após o banho arrefecer, o pH da solução foi ajustado para 4,5 com HCl, e 0,05 mL de amiloglucosidase (para eliminar o amido) foi adicionada e a solução encaminhada para outro período de incubação de 30 min a 60 ºC, com agitação. No final das digestões, à solução foi adicionado etanol (95%, 60 ºC) e deixada durante a noite, em temperatura ambiente, para precipitação total das fibras. Na segunda etapa, filtração, a solução (o precipitado e a suspensão) foi transferida para cadinhos de vidro previamente preparados e pesados. A bomba de vácuo foi usada para gerar sucção e auxiliar na filtração. O resíduo que permanecia no cadinho foi lavado com três porções de 10 mL de etanol (78 %), duas porções de 5 mL de etanol (95 %) e duas porções de 5 mL de acetona (**figura 16a**). O cadinho com a amostra foi deixado,

durante a noite, na estufa a 105 ºC para secagem e após arrefecer foi pesado (**figura 16b**). Na terceira parte do ensaio, após todo o processo, em duas repetições, foram analisados o teor de proteínas e em outras duas foram analisadas o conteúdo de cinzas, de acordo com o respectivo procedimento da AOAC já mencionado anteriormente. Além disso, juntamente com as amostras foram feitos brancos para medir possíveis contribuições dos resíduos dos reagentes durante o ensaio.

**a)**



**b)**

**Figura 16** – a) Esquema utilizado para a filtração e lavagem das fibras e b) cadinhos após secagem

No final, o valor da percentagem de fibras dietéticas totais foi calculado com o peso do resíduo, menos o peso da proteína, menos as cinzas e com a correção do branco (Equação 1).

$$\%\,TDF = \left(\frac{R_{amostra} - P_{amostra} - A_{amostra-Branco}}{massa_{amostra}}\right) * 100 \qquad (1)$$

Onde:

- $R_{amostra}$ = massa média de resíduo (mg);
- $P_{amostra}$ = massa média de proteína (mg);
- $A_{amostra}$ = massa média de cinzas (mg);
- B = correção do branco (mg).

O valor energético foi determinado de acordo com a fórmula (Equação 2) da Regulação Europeia (EU) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho (2011).

$$Energia = 4\ x\ [proteína\ (g) + hidratos\ de\ carbono\ (g)] + 2\ x\ [fibra\ dietética\ (g)] + 9\ x\ [gordura\ (g)] \quad (2)$$

$$Energia\ \left[\frac{kcal}{100\ g\ do\ peso\ seco}\right]$$

*3.4.2.2. Ácidos orgânicos*

A determinação dos ácidos orgânicos foi descrita por Barros et al. (2013) em estudos anteriores. Cada amostra liofilizada foi pesada (1 g) para um gobelé onde foram adicionados 25 mL de ácido metafosfórico (4,5 %) e o gobelé foi coberto com papel alumínio. A solução foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante 20 min. Após os 20 min, as amostras foram filtradas, por meio de filtro de papel, para um tubo de ensaio. Com o auxílio de uma seringa e um filtro de *nylon*, as amostras foram transferidas para *vials* âmbar de 1,5 mL, para prosseguirem para a análise por cromatografia líquida ultra-rápida, acoplada a um detetor de díodos (UFLC-PDA) (Shimadzu 20A series, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão).

A separação dos compostos foi realizada através de uma coluna de fase reversa $C_{18}$ (250 mm x 4.6 mm, 5 μm, Phenomenex), termostatizada a 35 ºC e a detecção ocorreu nos comprimentos de onda de 215 e 245 nm. O solvente de eluição utilizado foi ácido sulfúrico (3.6 mM). Para a identificação e quantificação dos ácidos orgânicos foram comparados os tempos de retenção e os espectros dos padrões comerciais, tal como suas respetivas retas de calibração. Os resultados foram apresentados em g/100 g de peso fresco (fw)

*3.4.2.3. Ácidos gordos*

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa (GC), acoplado a um detetor de ionização de chama (FID) (DANI 1000, Contone, Suíça) (**figura 17**).

**Figura 17** – Cromatógrafo gasoso, acoplado a um detetor de ionização de chama (GC-FID)

Às amostras resultantes do cálculo da gordura bruta, foram adicionados 5 mL de uma solução de metanol:ácido sulfúrico:tolueno (2:1:1), levadas ao vórtex e colocadas em banho a 50 ºC com agitação de 160 rpm, durante 12 horas. Após este processo, 3 mL de água destilada foram adicionadas à amostra, passada pelo vórtex, onde mais 3 mL de éter etílico foram adicionados com repassagem pelo vórtex novamente. Esperou-se a separação de fases e o sobrenadante foi retirado com uma pipeta de Pasteur e transferido para um *vial* com sulfato de sódio anidro (remover humidade na solução transferida). Logo após, com o auxílio de uma seringa e um filtro, o sobrenadante foi filtrado para um outro *vial* de GC para ser analisado. A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: temperatura inicial da coluna a 100 ºC, mantida por 2 min, aumento da temperatura de 10 ºC/min até 140 ºC, seguido por um aumento de 3 ºC/min até 190 ºC e por fim 30 ºC/min até 260 °C, mantido por 2 min. O gás de arraste (hidrogénio) foi mantido a 1.1 mL/min (0.61 bar), medidos a 100 ºC. A injeção *split* (1:50) foi realizada a 250 ºC e a identificação dos ácidos gordos individuais foi obtida a partir da comparação dos tempos de retenção dos padrões comerciais FAME Mix C4-C24 (padrão 4788-U, Sigma-Aldrich). Os resultados foram apresentados em percentagem relativa de cada ácido gordo quantificado. A identificação e quantificação dos

ácidos gordos foi feita com o auxílio do *sofware* CSW 1.7 (DataApex 1.7, Praga, República Checa), a comparar com os tempos de retenção da mistura de padrões referente aos estéres metílicos de ácidos gordos (FAME).

*3.4.2.4. Açúcares solúveis*

A determinação dos açúcares solúveis foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detetor de índice de refração (RI) (Knauer, Smartline System 1000, Berlim, Alemanha) (**figura 18**), a utilizar como padrão interno do método a melezitose, como descrita por Carocho et al. (2020). Cada amostra foi pesada (1 g) com o resíduo/amostra final do cartucho da extração por soxhlet, transferida para um tubo de falcon e foi adicionada 1 mL de melezitose (25 mg/mL) e 40 mL de etanol 80%. As amostras foram colocadas no banho a 80 ºC, durante 1h 30 min e agitadas a cada 15 min. As amostras foram deixadas em repouso para a decantação e depois filtradas para um balão de vidro para evaporação do etanol. Após a evaporação, a solução aquosa foi lavada três vezes com hexano com o auxílio de um funil de decantação. A fase aquosa foi transferida para um tubo e colocada na estufa para evaporar possíveis restos de hexano. O extrato restante foi adicionado a um balão volumétrico de 5 mL e água destilada foi adicionada até completar o volume. A solução então foi filtrada em um filtro de *nylon* com ajuda da seringa e transferida para *vials* de 1,5 mL para a análise no HPLC-RI. Utilizou-se uma coluna 100-5 $NH_2$ Eurospher (4.6 x 250 mm, 5 μm, Knauer) sendo a fase móvel utilizada acetonitrilo/água desionizada (70:30 v/v) a 35 ºC com um caudal de 1 mL/min (forno 7971 R Grace). A identificação e quantificação foi realizada utilizando os tempos de retenção de padrões comerciais com o auxílio do *sofware* Clarity 2.4 (DataApex, Praga, República Checa), por meio da curva padrão e comparação entre os picos e os tempos de retenção.

**Figura 18** - Cromatógrafo líquido de alta eficiência, acoplado a um detetor de índice de refração (HPLC-RI)

### *3.4.3. Análises físicas*

#### *3.4.3.1. Cor externa*

As cores do topo e das laterais dos 3 muffins foram analisadas (3 repetições e em pontos diferentes) com o auxílio do colorímetro portátil CR 400 da empresa Konica Minolta (Tóquio, Japão) descrito por Carocho et al. (2020). O padrão da Comissão Internacional de Iluminação (CIE), D65 iluminante, com 8 mm de abertura e 10º de observação foi utilizado. De acordo com o espaço de medição do CIE *L* a* b**, *L** representa a luminosidade (L = 0 preto, L = 100 branco), *a** representa a vermelhidão (-a = 0 verdura, +a = vermelhidão) e *b** representa a amarelidão (-b = azulado; +b = amarelado). A referência do branco Y = 83,6, x = 0,3208 e y = 0,3365 foi utilizado para calibrar o equipamento.

#### *3.4.3.2. Textura*

De forma a conseguir entender os efeitos que os diferentes extratos podem tem no perfil de textura dos muffins, estes foram sujeitos a uma análise num texturómetro *TA.XT Plus* da Stable Micro Systems (Vienna Court, Godalming, Reino Unido), com uma célula de 30 kg de carga (**figura 19**). A análise utilizada foi uma "*texture profile analysis*" (TPA), ou seja, uma análise de textura que imita a mastigação humana ao fazer duas compressões no mesmo alimento, conseguindo extrair bastantes parâmetros através da utilização de macros em parâmetros fundamentais. Desta forma conseguiu-se analisar a dureza, adesividade,

resiliência, coesividade elasticidade, gomosidade e mastigabilidade. Utilizando o cilindro metálico de 35 milímetros (P/35) como sonda, uma velocidade de pré-teste de 5 mm/s, uma velocidade de teste de 3 mm/s, uma velocidade de pós teste de 10 mm/s e uma tensão de deformação de 25% por muffin, a partir de uma força de 10 g como gatilho para a análise. Os muffins foram colocados inteiros no equipamento para o estudo e o processo foi realizado com três repetições. Os resultados foram estudados pelo programa Exponent.

**Figura 19** – Texturómetro com célula de 30 kg de carga e sonda cilíndrica de alumínio de P/35

### *3.4.4. Análise estatística*

Para o design fatorial fracionário Pareto uma análise de variância (ANOVA) foi executada para determinar os principais efeitos e magnitudes. Para o design fatorial geral, um comparativo entre as diferentes amostras foi realizado, por meio da aplicação da uma análise unidirecional da variância usando um teste F com $p$ = 0,05, além de um teste de Fischer da diferença mínima significativa (LSD). Ambas as análises foram realizadas utilizando o software Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia, EUA).

Para os ensaios aos extratos e muffins, os valores são apresentados por média ± desvio padrão (DP). No que concerne à análise dos parâmetros dos muffins, os valores foram analisados através de uma ANOVA a 2 fatores, com soma de quadrados do tipo III, recorrendo ao *software* SPSS, versão 25. Este modelo de análise linear multivariado permite tratar os dois fatores TC (tipo de conservante) e TA (tempo de armazenamento) de uma forma independente, permitindo entender a contribuição de cada um deles independente do outro, oferecendo uma melhor compreensão do comportamento dos vários parâmetros ao longo do tempo. Se uma interação significativa for registada ($p$-value<0.05) entre os dois fatores (TC×TA), estes são avaliados de uma forma simultânea e algumas conclusões são extraídas das médias marginais estimadas (MME). Caso não haja uma interação significativa entre fatores, isto é, quando a influência de um se sobrepõe à influência do outro para obter o resultado final, cada fator é avaliado independentemente, usando um teste de Tukey. Ao longo de todo o trabalho, o nível de significância é de 0.05

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Design fracionário aplicado ao alecrim

Os fatores selecionados tiveram como base designs de otimizações anteriores executadas pelo grupo de investigação BioChemCore, do CIMO, bem como de outros projetos relacionados com o alecrim. Com o objetivo de redução do tempo e maximizar rendimento, a escolha pela utilização do EAU ganhou destaque. Portanto, os fatores mais relevantes para se incluir foram o tempo de extração, potência do equipamento e percentagem de etanol na solução utilizada como solvente de extração (**figura 20**). Esta otimização teve como objetivo potenciar a quantidade de ácido rosmarínico no extrato, pois é o composto fenólico com maior bioatividade nas plantas estudadas, podendo ser usado na indústria alimentar como conservante.

O método fracionário é um design rápido e efetivo para detetar reações com efeitos principais e as suas respetivas magnitudes, assim como uma ajuda útil para auxiliar na tomada de decisões.

**a)**

| Extração | Fatores: Tempo (min) | Potência (W) | Solvente (%) | Ácido rosmarínico (mg/g extrato) |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 12,5 (-1) | 275 (-1) | 80 (1) | 31,12 |
| **2** | 7,5 (1) | 450 (1) | 80 (1) | 26,02 |
| **3** | 7,5 (1) | 275 (-1) | 0 (-1) | 2,26 |
| **4** | 12,5 (-1) | 450 (1) | 0 (-1) | 3,33 |

**b)**

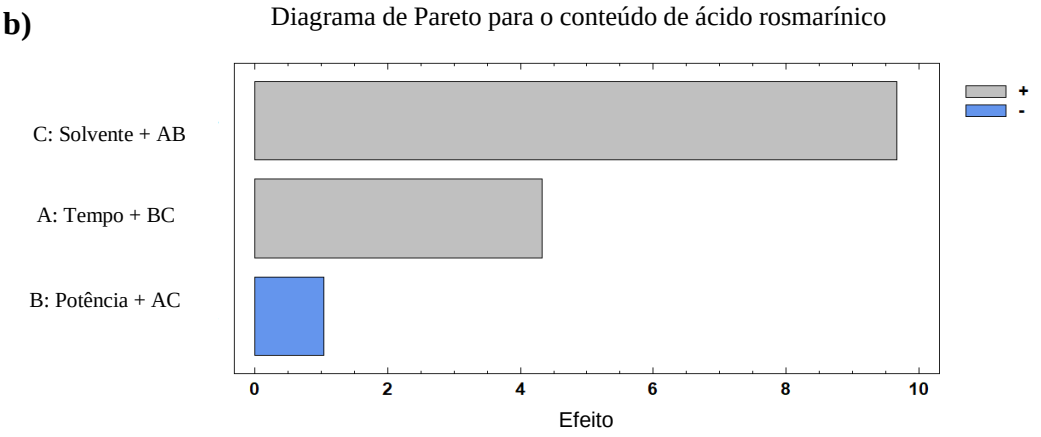


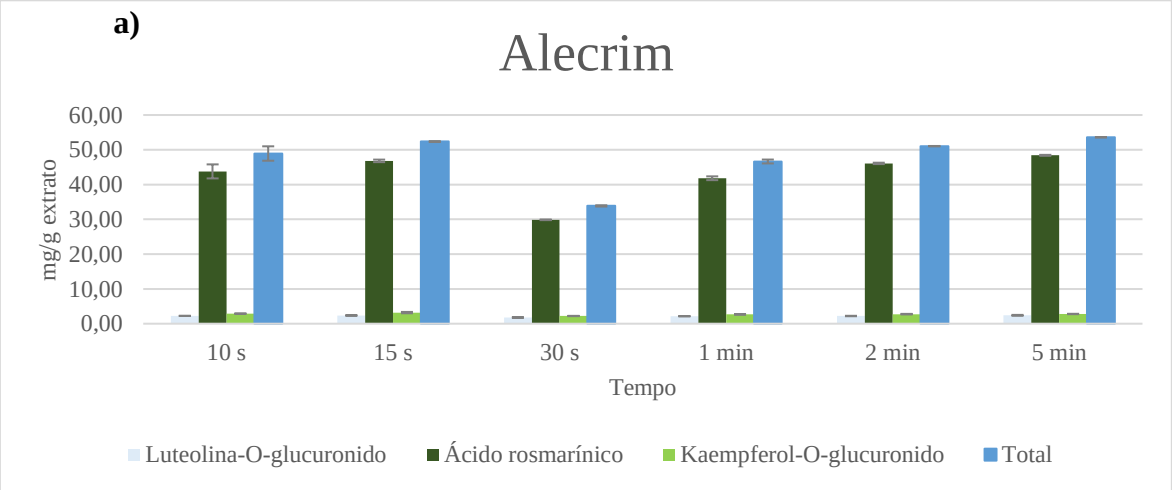

**Figura 20** – a) Ordem do design fracionário executado e o rendimento em função do ácido rosmarínico e b) diagrama de Pareto com os efeitos de magnitude

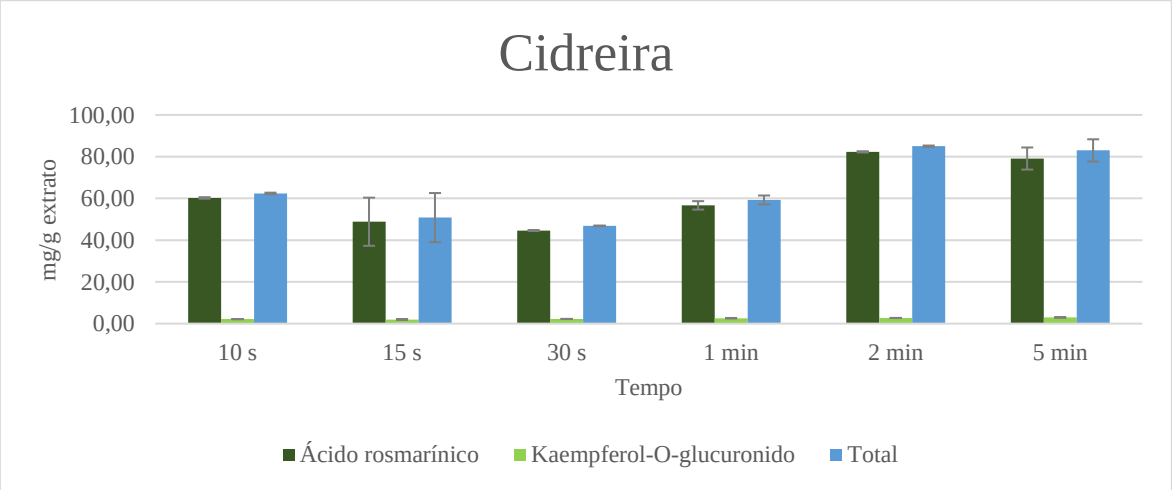
Tanto numerica como graficamente, o efeito do solvente foi o de maior e de positiva magnitude de entre os três fatores testados, mostrando um aumento de mais de 2 vezes em magnitude quando comparado com o segundo efeito testado (tempo). Com base nos resultados descritos, foi feita uma decisão de se utilizar a menor potência do EAU, com o objetivo de economizar recursos, além do uso de altas concentrações de etanol do solvente de extração. A eficiência no rendimento na extração de compostos fenólicos de *R. officinalis* com solventes menos polares também foi descrita por outros autores (Oliveira et al., 2016; Sik et al., 2020), o que reforça a decisão.

### 4.2. Designs de tempo multinível

De acordo com resultados anteriores, uma análise mais profunda do rendimento da extração em função do tempo, revelou-se um fator importante para monitorizar. Os níveis de tempo analisados anteriormente foram 7,5 min e 12,5 min e, em paralelo, ensaios realizados dentro do grupo apontaram a diminuição do ponto, ou seja, redução do valor do tempo. Portanto, considerou-se a inclusão de uma nova faixa de tempo, que varia de 10 s até 5 min e que foi aplicada ao alecrim, bem como à cidreira (*M. officinalis*) e orégãos (*O. vulgare*). Na **figura 21**, os gráficos sintetizam os resultados, mostrando o rendimento individual de cada planta, em gráficos isolados, e um gráfico com a comparação das três plantas juntas.

**a)**



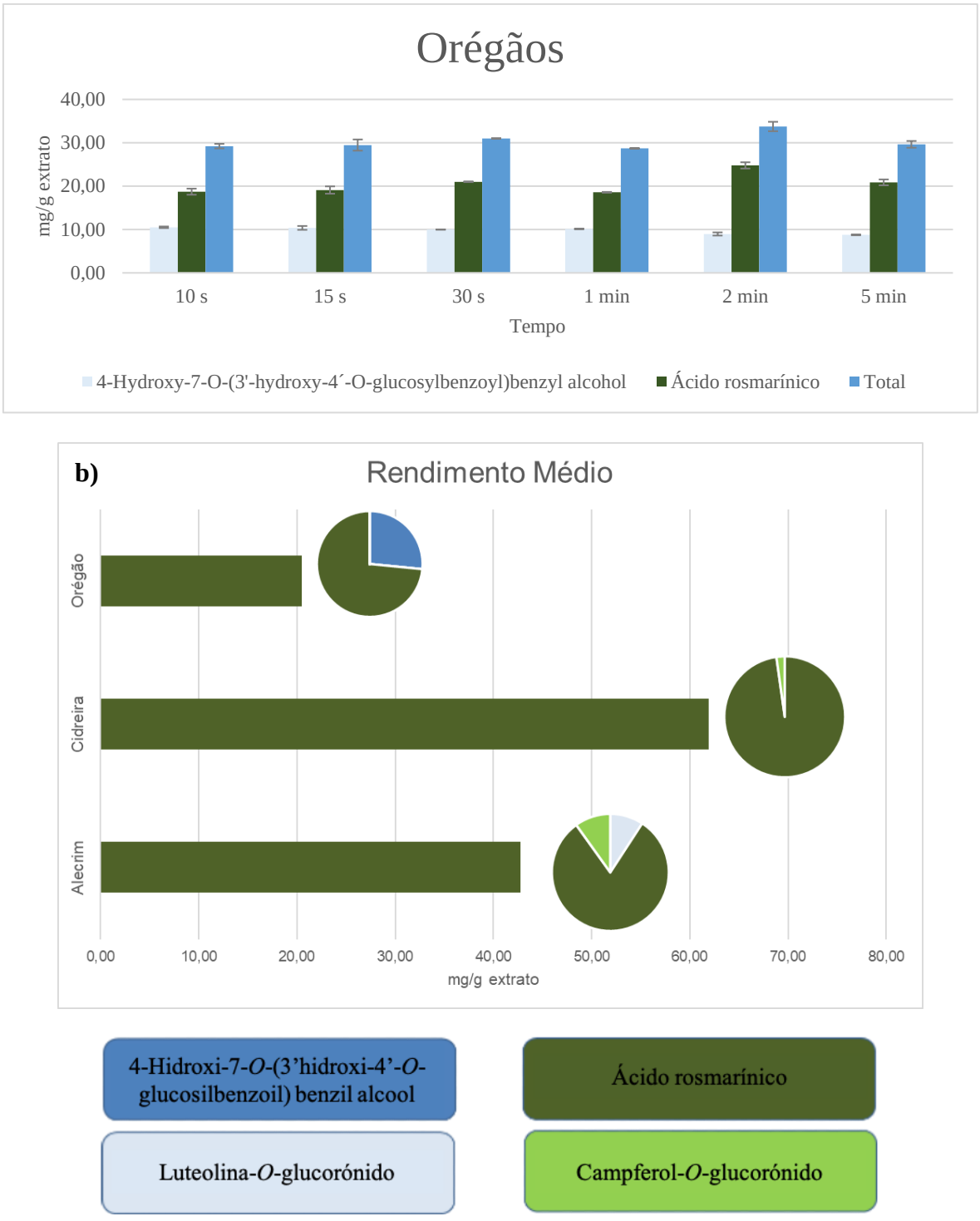



**Figura 21** – a) Fatorial multinível em função do tempo e b) gráficos comparativos do rendimento médio de cada planta analisada.

Na **figura 21b** é possível identificar a cidreira como a planta com o maior rendimento referente ao conteúdo em ácido rosmarínico. Estes resultados estão parcialmente em concordância com os relatados por Sik et al., (2020), os quais referiram o orégão como a maior fonte de ácido rosmarínico, seguido pela cidreira e, por último, pelo alecrim. A diferença entre as plantas de maior rendimento pode ser explicada e atribuída a possíveis diferenças atmosféricas ou de variedades, ou até mesmo nas condições de extração que neste estudo foram otimizadas.

Nesta análise, foram identificados e quantificados quatro compostos fenólicos distintos maioritários, incluindo ácidos fenólicos e flavonoides. Os quatro picos foram identificados pelo tempo de retenção, massa, características UV-Vis. O pico 1, com o tempo de retenção de 15,95 min, apresentou um ião pseudomolecular a m/z 421 e foi identificado como 4-hidroxi-7-*O*-(3'-hidroxi-4´-*O*-glucosibenzoil)benzil alcool. Os picos 2 e 3 foram identificados como luteolina-*O*-glucurónido (tempo de retenção 18,3 min), e campferol-*O*-glucurónido (tempo de retenção 24,5 min), ambos com ião pseudomolecular a *m/z* 461. Por último, o pico 4 foi o maior composto encontrado nas três amostras, o ácido rosmarínico (tempo de retenção de 21,12 min; ião pseudomolecular de *m/z* 359) e a sua identificação foi feita em comparação com o padrão comercial.

Por outro lado, os três gráficos isolados (**figura 21a**), específicos de cada planta, mostraram alta variabilidade com significância estatística em quase todos os resultados. Surpreendentemente, cada nível com tempo inferior produz maiores concentrações quando comparadas com os níveis relatadas no tópico 4.1 (7,5 e 12,5 min). Além disso, é importante destacar que o rendimento não parece ter nenhum padrão específico de acordo com os tempos empregues. Basicamente, o maior rendimento dos compostos fenólicos difere, tanto entre as plantas, quanto com as variações do tempo. Portanto, duas conclusões podem ser retiradas destes resultados: primeiro, uma maior especificidade na metodologia de design fatorial fracionário deve ser aplicada para se obter resultados ideais de cada planta; e segundo, o poder de extração da EAU mostrou maior quantidade de compostos que o esperado. Além disso, o resultado obtido é bastante interessante, porque em ensaios baseados nas extrações por EAU, a tendência é de se utilizar tempos maiores, bem maiores que os tempos testados neste trabalho.

### 4.3. Design de temperatura multinível

Junto com os resultados obtidos no design fracionário e no design fatorial dependente do tempo, uma análise extra multinível baseada no efeito da temperatura também foi executada, com a variação de 20 a 75 ºC. A principal ideia na incorporação da temperatura como um fator foi pelo conhecimento da possibilidade de existência de compostos termolábeis, ou seja, que perdem suas qualidades acima de determinada temperatura. Deste modo, a decisão de analisar uma gama comum de temperatura com o intuito de maximizar a seleção de fatores para possíveis futuras otimizações mostrou-se vantajosa.

A **figura 22** exibe as quantidades de compostos consoante a temperatura de extração. Não foi possível estabelecer um padrão claro no rendimento em relação à variação de temperatura, portanto foram destacadas interpretações individuais. No caso do alecrim, um efeito negativo com o aumento da temperatura foi observado, embora que a 50 ºC exista um pico, mas que se apresentou com menor rendimento que o observado a menor temperatura. Além disso, a maior flutuação ocorreu neste ponto, o que pode apontar que possíveis erros de manipulação podem ter influenciado na resposta. Contudo, é importante destacar que a menor temperatura (20 ºC) altera quase 40% em comparação com a maior temperatura (75 ºC), a indicar um grande impacto nestes níveis dos fatores. Ao contrário do alecrim, a cidreira apresentou um efeito com tendência positiva, a exibir na maior temperatura, a maior eficiência no rendimento na extração. O efeito positivo teve quase a mesma magnitude que o efeito negativo apresentado no alecrim. No entanto, a significância estatística também foi observada entre as extremidades inferiores e superiores, com flutuações de 30 %. O orégão não apresentou efeitos significativos com a variação da temperatura. No geral, considerando os custos para se aquecer a água em escalas maiores, o aumento da temperatura não se afigura benéfico para extração dos compostos destas plantas e deve ser analisado com mais detalhe.

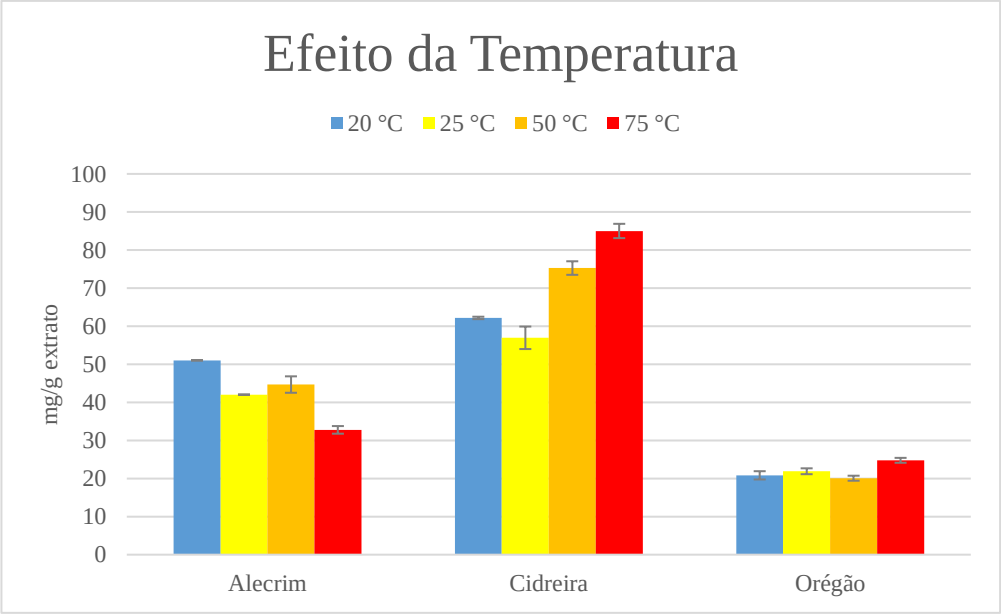



**Figura 22 –** Gráfico comparativo das respostas, em função da temperatura, do rendimento de ácido rosmarínico de cada planta analisada

Numa análise mais profunda das respostas dos compostos, não foi detectado um padrão específico como se havia postulado inicialmente. Além disso, a suposição da degradação de flavonoides e ácido rosmarínico não se verificou.

### 4.4. Condições ótimas de extração

Os valores encontrados para os testes de rastreio da extração de cada extrato são mostrados na **tabela 7**.

**Tabela 7** – Condições ótimas para a extração do extrato de alecrim, cidreira e orégão.

| | **Tempo (min)** | **Potência (W)** | **Solvente (mL)** | **Temperatura (ºC)** |
|---|---|---|---|---|
| **Alecrim** | 0,25 | 375 (75%) | Etanol 80% | 20 |
| **Orégão** | 2 | 375 (75%) | Etanol 80% | 75 |
| **Cidreira** | 2 | 375 (75%) | Etanol 80% | 75 |

A **tabela 8** representa os valores encontrados para o rendimento total e de cada composto fenólico identificado, após o estudo das condições ótimas. Os valores obtidos estão próximos dos indicados no capítulo 4.2 (**figura 20**). O alecrim apresentou um maior aumento no conteúdo fenólico total e de ácido rosmarínico, aproximadamente, 4 mg/g acima das outras duas plantas. A cidreira e o orégão não apresentaram variações significativas no conteúdo, o que pode ser explicado pelo facto do design inicial ter sido feito para o alecrim e depois aplicado às outras duas plantas. No entanto, a cidreira foi a planta com o maior rendimento em ácido rosmarínico.

**Tabela 8** – Rendimento específico de cada composto fenólico e total dos extratos de alecrim, cidreira e orégão.

| **Composto fenólico** | **mg/g extrato** | | |
|---|---|---|---|
| | **Alecrim** | **Cidreira** | **Orégão** |
| **4-Hidroxi-7-*O*-(3'-hidroxi-4´-*O*-glucosilbenzoil)benzil** | - | - | 8,1 ± 0,3 |
| **Luteolina-*O*-glucurónido** | 2,37 ± 0,09 | - | - |
| **Ácido rosmarínico** | 46,8 ± 0,4 | 62 ± 1 | 21 ± 1 |
| **Campferol-*O*-glucurónido** | 3,2 ± 0,2 | 2,7 ± 0,1 | - |
| **Total** | 52,36 ± 0,08 | 65 ± 1 | 29 ± 1 |

### 4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica dos extratos

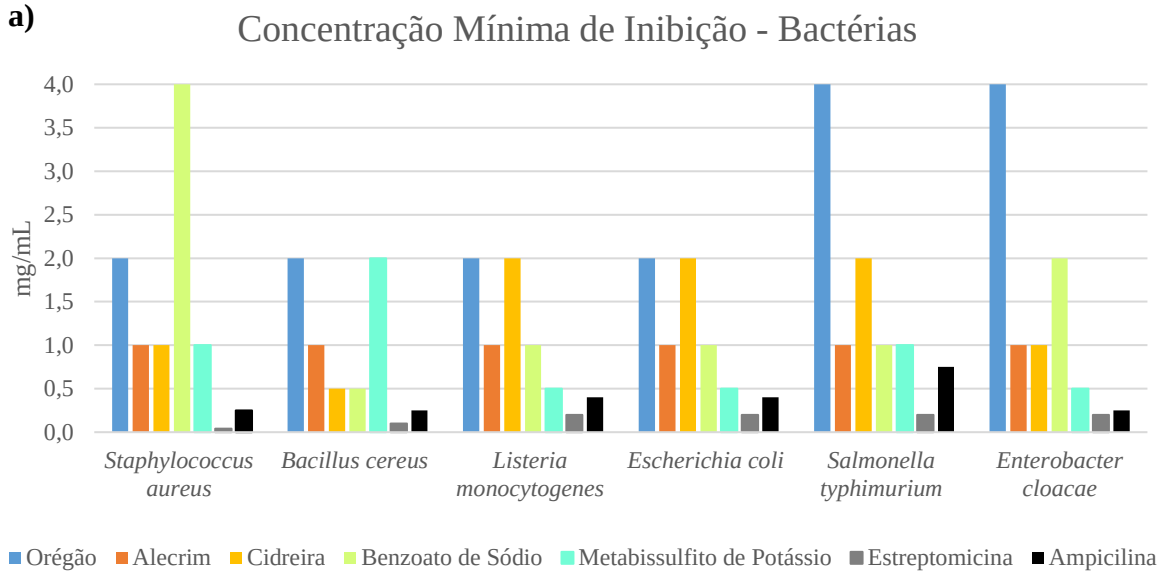
Após chegar aos valores ótimos para potenciar a extração de maior quantidade de compostos, foram efetuadas várias extrações para obter bastante massa para as análise da atividade antioxidante e antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana foi realizada contra patógenos alimentares. Para comparar a efetividade dos extratos naturais foram utilizados dois conservantes sintéticos empregues na indústria alimentar, o benzoato de sódio (E211) e metabissulfito de potássio (E224), bem como dois antibióticos, estreptomicina e ampicilina, como controlos positivos. A **figura 23** evidencia, por meio de gráficos, os valores das análises antimicrobianas, concentração mínima inibitória (CMI) da atividade antibacteriana e antifúngica e concentração mínima bactericida/fungicida (CMB/CMF). Os controlos positivos estão representados à direita de cada grupo de barras, seguidos pelos conservantes sintéticos e pelos naturais, mais à esquerda. Na **figura 23a**, os valores de CMI, tanto dos extratos de plantas como dos conservantes sintéticos, foram superiores do que os valores dos controlos positivos. O alecrim demonstrou o efeito mais promissor, por apresentar efeito igual ou menor que o benzoato de sódio para todas bactérias, exceto para *Bacillus cereus*. Na **figura 23b** (CMB), o comportamento bactericida do alecrim em relação ao benzoato de sódio foi semelhante ao observado no primeiro gráfico (CMI). A cidreira mostrou-se bastante efetiva contra o *Bacillus cereus,* enquanto que o metabissulfito de potássio se mostrou bastante efetivo contra todas bactérias, menos contra a *Bacillus cereus.*

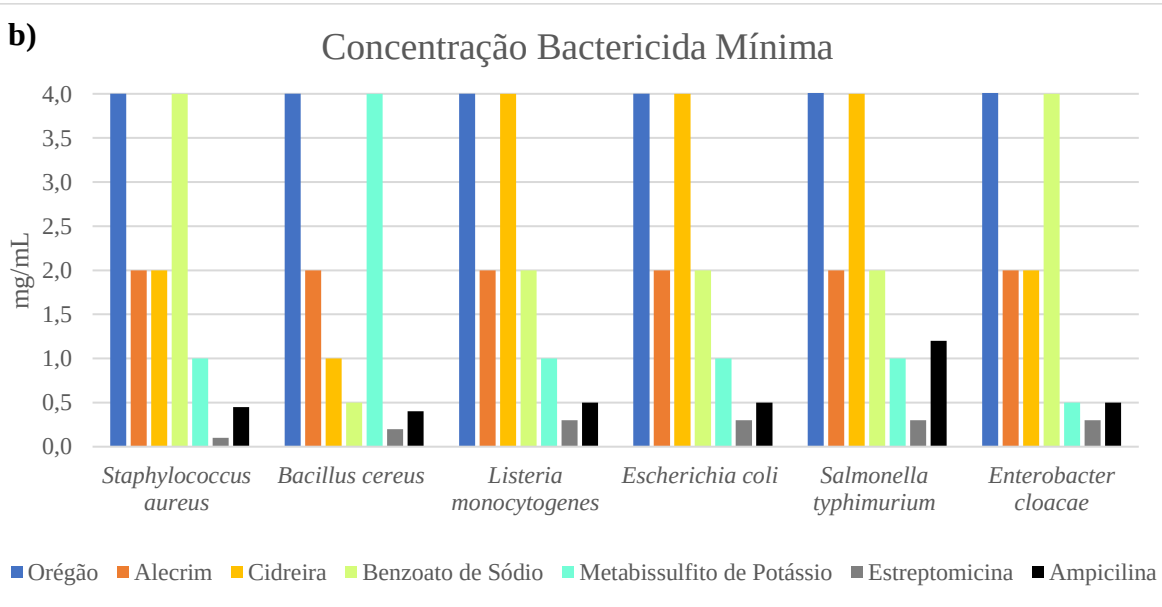
Em relação aos fungos, a **figura 23c** representa a CMI e analisando no geral, os extratos de plantas parecem ter maior efeito contra fungos, do que contra bactérias. Todos os extratos apresentaram melhor atividade antimicrobiana, do que ambos conservantes sintéticos e valores próximos aos encontrados nos controlos positivos. O alecrim, exibiu novamente, efeitos promissores e valores abaixo ou iguais ao controlo positivo para *A. fumigatus*, *P. funiculosum* e *P. verrucosum*, demonstrando excelente capacidade para impedir o crescimento de fungos. A mesma tendência foi observada na **figura 23d** (CMF), na qual todos os extratos tiveram valores inferiores contra todos os fungos, quando comparado com o benzoato de sódio e melhor valor que o metabissulfito de potássio para o *P. verrucosum*. O orégão e a cidreira exibiram comportamento semelhante entre si, em

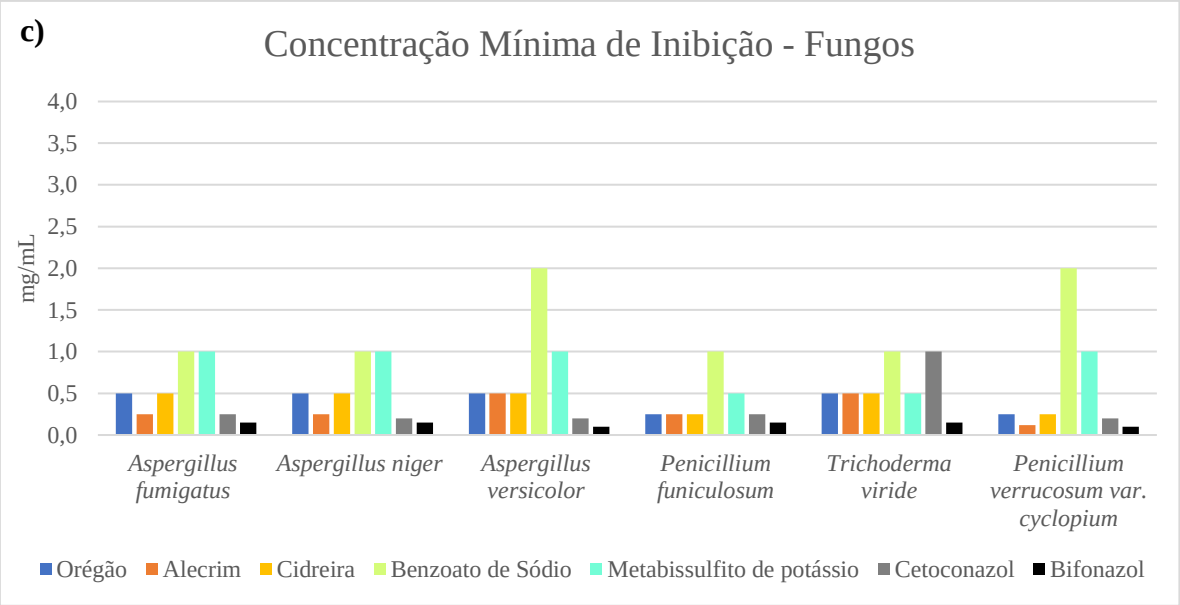
relação a atividade fungicida. Pode-se concluir, portanto que os extratos destas plantas apresentam potencial de conservação de alimentos ao reduzir a carga microbiana, sobretudo fúngica, em alguns casos melhor que os controlos positivos e antimicrobianos sintéticos usados pela indústria.

**a)**




**b)**





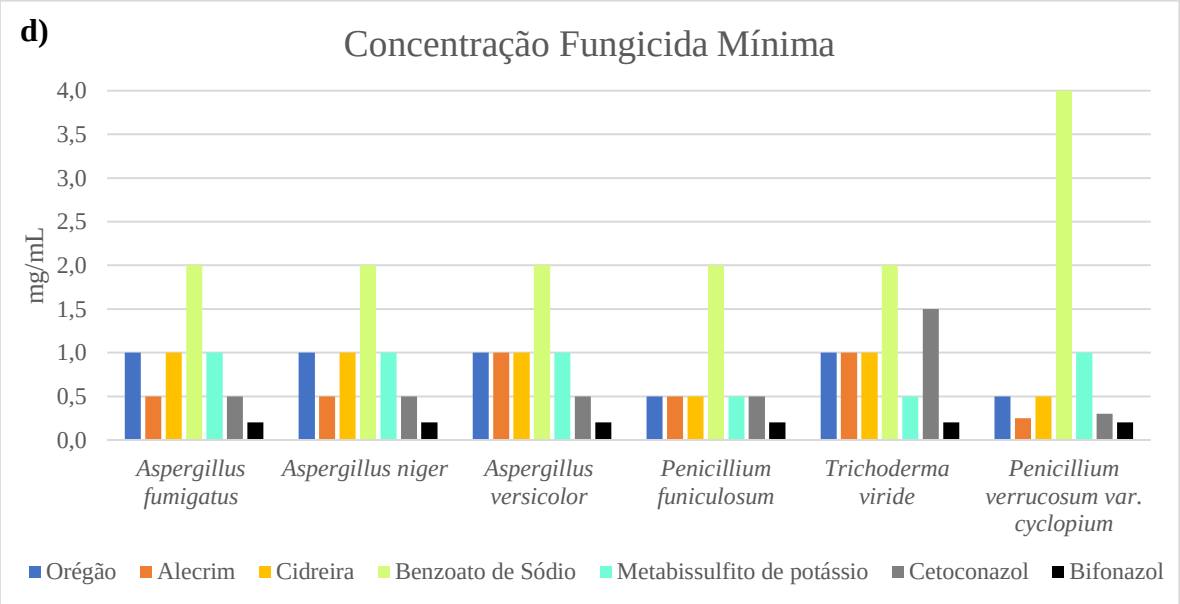




**Figura 23** – Representação gráfica de: a) CMI da atividade antibacteriana, b) CMB, c) CMI da atividade antifúngica e d) CMF

Os resultados da atividade antioxidante através do método OxHLIA estão descritos na **tabela 9**. As duas variações de tempo de análises foram definidas para analisar variações da proteção das hemácias, devido a diferentes interações, em função do tempo, entre as capacidades antioxidantes dos extratos naturais. Todos os extratos mostraram melhor

atividade anti-hemolítica, do que o Trolox (controlo), em ambos tempos. De entre os extratos, o alecrim obteve o menor resultado (valores em $IC_{50}$ que quanto mais baixo, melhores) (1,2 µg/mL), sendo, aproximadamente, 20 vezes menor que o valor do orégão (24,7 2 µg/mL) e 25 vezes menor que a cidreira (29,7 µg/mL), no $\Delta t$ = 120 min. O aumento do tempo para $\Delta t$ = 180 min, reduz a diferença entre a atividade anti-hemolítica dos componentes, aproximadamente, 5 vezes para o orégão (37,1 µg/mL), 7 vezes para a cidreira (46,1 µg/mL) e 9 vezes para o Trolox (63 µg/mL), em relação ao alecrim (6,9 µg/mL).

Apesar da cidreira ter sido o extrato com o maior rendimento de compostos fenólicos, foi a que apresentou a menor atividade anti-hemolítica. Este facto pode ser explicado pela forma que os compostos fenólicos estão arranjados na estrutura do extrato e sobretudo pela sua interação com os reagentes do meio, na forma como confere proteção às hemácias.

**Tabela 9** – Atividade anti-hemolítica das amostras dos extratos de plantas.

| | **OxHLIA** (valores de $IC_{50}$, µg/mL) | |
|---|---|---|
| | **$\Delta t$ 120 min** | **$\Delta t$ 180 min** |
| **ALE** | 1,2±0,1 | 6,9±0,3 |
| **ORE** | 24,7±0,5 | 37,1±0,7 |
| **CID** | 29,7±0,6 | 46,1±0,7 |
| **Trolox** | 41±1 | 63±1 |

Em relação a atividade citotóxica, todos os extratos não revelaram toxicidade contra as células normais PLP na concentração máxima, 400 µg/mL, a indicar ser seguro para o consumo. Entretanto, a avaliação da atividade foi feita *in vitro*, a significar que para assegurar a completa segurança de seu uso, outros estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários. Além disso, se esperava que os três extratos não apresentassem toxicidade, visto que estas plantas são consumidas mundialmente.

### 4.6. Muffins

A **figura 24** exibe alguns muffins prontos, após todas as etapas do processamento.

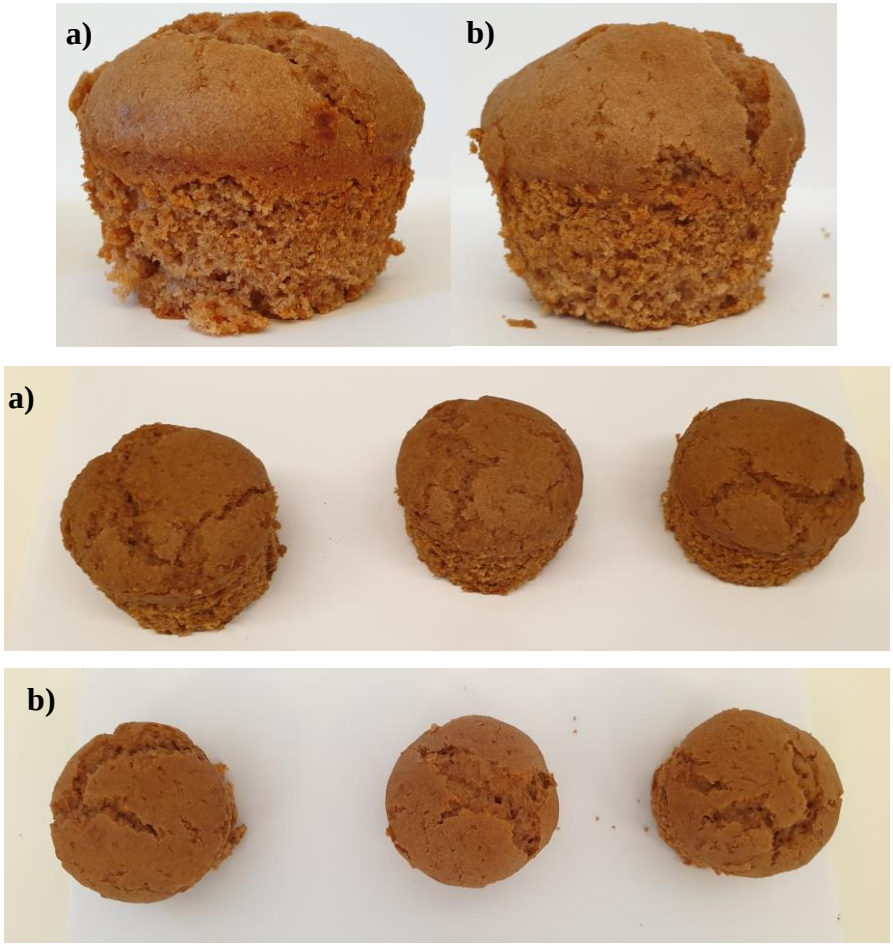



**Figura 24** – Muffins com extrato de a) alecrim e b) orégão

### 4.7. Perfil nutricional

A **tabela 10** representa o perfil nutricional dos diferentes muffins conservados com conservantes naturais e sintéticos nas suas concentrações ideais e também na concentração máxima permitida por lei para o sorbato de potássio.

**Tabela 10** - Perfil nutricional em g/100g de matéria fresca e valor energético dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes.

| | | Humidade (g/100 g) | Gordura (g/100 g) | Proteína (g/100 g) | Cinza (g/100 g) | Fibras Totais (g/100g) | Hidratos de Carbono (g/100 g) | Energia (kcal) | Energia (kJ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tempo de Armazenamento (TA)** | 0 Dias | 19±2 | 11±1 | 1,66±0,06 | 5±1 | 3,9±0,1[a] | 64±2 | 371±9 | 1551±40 |
| | 4 Dias | 18±1 | 11,2±0,5 | 1,8±0,1 | 2,2±0,4 | 4,1±0,2[a] | 64±2 | 374±7 | 1567±30 |
| | 8 Dias | 18,3±0,6 | 10,5±0,7 | 1,7±0,1 | 4±2 | 4,8±0,2[b] | 65±1 | 370±5 | 1548±20 |
| ***p*-value (n=3)** | Teste de Tukey | 0,059 | 0,004 | <0,001 | <0,001 | 0,002 | 0,356 | 0,027 | 0,027 |
| **Tipo de Conservante (TC)** | Controlo | 18±1 | 11±2 | 1,76±0,09 | 4±1 | 4,0±0,6 | 65±3 | 373±10 | 1561±43 |
| | Sorbato de Potássio 2 | 19±2 | 10,9±0,5 | 1,7±0,1 | 5±2 | 4,4±0,6 | 64±2 | 369±9 | 1544±40 |
| | Sorbato de Potássio 0.2 | 18±1 | 11,2±0,6 | 1,8±0,1 | 4±2 | 4,4±0,6 | 65±1 | 376±6 | 1574±26 |
| | Alecrim | 17,8±0,4 | 11,1±0,4 | 1,77±0,09 | 4±2 | 3,4±0,9 | 66±1 | 377±2 | 1580±10 |
| | Alecrim Max | 18,3±0,7 | 10±1 | 1,64±0,06 | 4±2 | 4,4±0,7 | 65±1 | 371±7 | 1551±31 |
| | Cidreira | 19±2 | 10,8±0,6 | 1,66±0,08 | 4±2 | 4,0±0,7 | 64±2 | 368±10 | 1542±41 |
| | Cidreira Max | 18,7±0,7 | 10,9±0,5 | 1,6±0,1 | 4±2 | 4±1 | 64,5±0,9 | 371±5 | 1552±20 |
| | Oregãos | 19±1 | 10,6±0,6 | 1,68±0,05 | 4±2 | 4,1±0,7 | 65±1 | 369±8 | 1544±32 |
| | Oregãos Max | 18,9±0,7 | 11,1±0,3 | 1,7±0,2 | 2,4±0,6 | 4,5±0,9 | 63,8±0,9 | 371±4 | 1552±17 |
| ***p*-value (n=9)** | Teste de Tukey | 0,052 | 0,745 | 0,001 | <0,001 | 0,055 | 0,119 | 0,030 | 0,030 |
| **TA×TC (n=27)** | *p*-value | 0,072 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,150 | 0,140 | 0,012 | 0,012 |

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

A representação da **tabela 10** segue a análise simultânea dos dois fatores, o tempo de armazenamento (TA) e tipo de conservante (TC) de uma forma independente para que se consigam entender melhor os efeitos de cada um deles nos resultados apresentados, ou se, porventura, houve uma interação entre eles. Assim, a parte superior da tabela representa a passagem do tempo de armazenamento, mas, incluído em cada um dos dias de análise estão todos os valores de cada um dos conservantes. Na parte inferior, em cada tipo de conservante, estão incluídos os três tempos de análise. Quando cada um dos fatores pode ser analisado independentemente (*p*-value $_{TA\times TC} > 0,05$), então a classificação é feita recorrendo a testes *post-hoc* caso os valores individuais de significância sejam menores que 0,05 (valor considerado como significante) contudo, quando (*p*-value $_{TA\times TC} < 0,05$) então, para alguns casos apenas tendências podem ser obtidas pelas médias marginais estimadas (MME).

Tratando-se de um alimento feito à base de farinha, a análise do perfil nutricional incluiu as fibras totais, hidratos de carbono, cinzas, proteínas, gordura bruta e humidade. Na **tabela 10**, na qual está representado o perfil nutricional dos muffins, os hidratos de carbono, (calculados por diferença), corresponderam à maior parcela, ≃ 64 g/100g, e foram seguidos da humidade e gordura. As proteínas e fibras totais foram os nutrientes menos abundantes. No que concerne ao efeito dos diferentes conservantes, em linha com a definição de conservante alimentar, é desejável que essas moléculas ou extratos não tenham nenhum efeito para além daquele que tecnologicamente são adicionados para satisfazer. No caso do perfil nutricional, nenhum dos conservantes usados apresentou alterações significativas, o que significa que tanto o tipo de conservante, como o tempo de armazenamento tiveram influências nas alterações não significativas que se verificaram. Apenas nas fibras totais se registou um aumento significativo do dia 4 para o dia 8, mostrando que para este nutriente, o tempo de armazenamento teve uma influência maior que o tipo de conservante. Conclui-se, portanto que a nível nutricional os conservantes naturais não exercem efeitos significativos.

### 4.8. Ácidos gordos

A **tabela 11** representa o perfil em ácidos gordos individuais, bem como as quantidades de ácidos gordos saturados (SFA) monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA). Foram identificados onze ácidos gordos, sendo que a grande maioria são saturados, seguidos dos monoinsaturados e finalmente polinsaturados. Em termos de quantidade verificou-se o inverso, uma maior prevalência de ácidos gordos polinsaturados, variando entre 48 até 54%, seguido de ácidos monoinsaturados, aproximadamente 33%, e finalmente ácidos gordos saturados com cerca de 17%. Ainda que a gordura seja uma parte significativa dos muffins, as gorduras presentes são sobretudo gorduras insaturadas, tornando os muffins num alimento considerado saudável. Individualmente, o ácido gordo com maior quantidade em todas as amostras foi o ácido linoleico seguido do ácido oleico. Em relação à contribuição de cada fator (tempo e conservante) para o resultado em ácidos gordos, ficou patente que houve uma interação entre ambos. Contudo, as variações não foram significativas, mostrando que o efeito do tempo e do tipo de conservante tiveram influência, mas que essa

influência não foi significativa. Este resultando coaduna-se com aquilo que é esperado de um conservante (não alterar parâmetros alimentares), sobretudo porque os ácidos gordos individuais são um dos parâmetros mais importantes na conservação de alimentos. Assim, mesmo na amostra controlo não houve uma degradação dos ácidos gordos, mostrando que provavelmente, devido à baixa quantidade de humidade não se verificou quebras das ligações duplas dos ácidos gordos insaturados, revelando que a deterioração dos muffins não se dá devido à peroxidação lipídica, sendo porventura mais prevalente a degradação por ação de microrganismos ou alterações físicas.

**Tabela 11** - Perfil de ácidos gordos em percentagem relativa dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes.

| | | C14:0 | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 | C20:0 | C20:1 | C22:0 | C24:0 | SFA | MUFA | PUFA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tempo de** | 0 Dias | 0,3±0,2 | 10±1 | 0,36±0,09 | 5,0±0,8 | 33±4 | 50±5 | 0,28±0,06 | 0,4±0,1 | 0,23±0,04 | 0,9±0,2 | 0,5±0,3 | 17±2 | 33±4 | 50±4 |
| **Armazenamento** | 4 Dias | 0,16±0,02 | 9,2±0,8 | 0,32±0,05 | 4±1 | 33±5 | 51±5 | 0,24±0,04 | 0,31±0,03 | 0,20±0,02 | 0,7±0,1 | 0,30±0,08 | 15±2 | 34±6 | 51±5 |
| **(TA)** | 8 Dias | 0,16±0,04 | 10±1 | 0,35±0,08 | 5,2±0,2 | 31±1 | 51±3 | 0,27±0,03 | 0,33±0,02 | 0,22±0,01 | 0,70±0,09 | 0,26±0,05 | 16±2 | 32±1 | 52±3 |
| ***p*-value (n=3)** | Teste de Tukey | <0,001 | 0,001 | 0,001 | <0,001 | 0,001 | 0,008 | 0,016 | 0,006 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,063 |
| **Tipo de Conservante (TC)** | Controlo | 0,3±0,2 | 10,3±0,4 | 0,37±0,01 | 5,3±0,2 | 30,2±0,4 | 51±1 | 0,30±0,02 | 0,32±0,03 | 0,21±0,01 | 0,7±0,1 | 0,3±0,1 | 17,3±0,8 | 30,8±0,3 | 51,9±0,9 |
| | Sorbato de Potássio 2 | 0,2±0,2 | 8,8±0,7 | 0,28±0,03 | 5,2±0,1 | 30,3±0,4 | 53,0±0,7 | 0,24±0,01 | 0,4±0,2 | 0,23±0,04 | 0,9±0,4 | 0,5±0,5 | 16,0±0,8 | 30,8±0,4 | 53,2±0,8 |
| | Sorbato de Potássio 0.2 | 0,18±0,04 | 11±2 | 0,39±0,09 | 5,3±0,3 | 31±1 | 50±4 | 0,31±0,05 | 0,33±0,03 | 0,22±0,01 | 0,82±0,09 | 0,34±0,08 | 17±2 | 32±2 | 50±4 |
| | Alecrim | 0,17±0,03 | 10,0±0,5 | 0,38±0,02 | 5,1±0,1 | 30,0±0,2 | 52,4±0,4 | 0,27±0,02 | 0,32±0,03 | 0,22±0,02 | 0,7±0,1 | 0,34±0,08 | 16,7±0,5 | 30,6±0,6 | 52,6±0,4 |
| | Alecrim Max | 0,17±0,02 | 10±1 | 0,41±0,07 | 4,7±0,6 | 38±6 | 44±6 | 0,24±0,03 | 0,31±0,04 | 0,21±0,03 | 0,74±0,09 | 0,31±0,05 | 17±2 | 39±6 | 45±6 |
| | Cidreira | 0,2±0,2 | 9,5±0,7 | 0,29±0,01 | 5,4±0,3 | 29,8±0,5 | 53±1 | 0,29±0,05 | 0,34±0,04 | 0,24±0,03 | 0,7±0,1 | 0,28±0,08 | 16±1 | 30,4±0,5 | 53±1 |
| | Cidreira Max | 0,16±0,03 | 9±1 | 0,35±0,06 | 4±1 | 37±5 | 47±5 | 0,24±0,03 | 0,31±0,04 | 0,21±0,02 | 0,70±0,08 | 0,29±0,05 | 16±3 | 37±5 | 48±5 |
| | Oregãos | 0,15±0,04 | 8,6±0,6 | 0,23±0,06 | 4,9±0,1 | 30,3±0,5 | 53,8±0,5 | 0,26±0,06 | 0,34±0,02 | 0,21±0,02 | 0,84±0,08 | 0,35±0,06 | 15,3±0,8 | 30,7±0,4 | 54,0±0,5 |
| | Oregãos Max | 0,16±0,04 | 10±2 | 0,37±0,08 | 4±1 | 35±2 | 49±2 | 0,25±0,05 | 0,31±0,05 | 0,21±0,03 | 0,70±0,09 | 0,30±0,06 | 15±3 | 35±2 | 50±2 |
| ***p*-value (n=9)** | Teste de Tukey | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,028 | 0,004 | <0,001 | <0,001 | 0,002 | <0,001 | <0,001 |
| **TA×TC (n=27)** | *p*-value | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,010 | <0,001 | <0,001 | 0,005 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

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

### 4.9. Atividade da água, ácidos orgânicos e açúcares solúveis nos muffins

A **tabela 12** representa vários parâmetros, entre eles a atividade da água, que permite entender a água disponível para putativa utilização por parte de bactérias e fungos, cuja carga microbiana não pôde ser analisada em tempo útil devido a constrangimentos relativos à COVID-19. Não foram registados quaisquer diferenças entre os diferentes tempos de armazenamento e muffins conservados. Outros parâmetros patentes na **tabela 12** são os ácidos orgânicos individuais, sendo que foram detetados e quantificados cinco ácidos orgânicos, o ácido oxálico, quínico, cítrico, sucínico e fumárico. Devido à quantidade ínfima de ácido fumárico nas amostras, não foram representados na tabela. Finalmente, os açúcares solúveis estão também representados, sendo que apenas foi detetada a sacarose e a maltose.

Em relação aos ácidos orgânicos, houve uma interação significativa para o ácido oxálico, contudo para o ácido quínico, cítrico e sucínico verificaram-se diferenças significativas. No caso do ácido quínico, o tempo teve uma influência maior que a adição do conservante, verificando-se uma diminuição significativa do T0 para o T4. Inversamente, no ácido sucínico houve uma influência significativamente maior do tipo de conservante em relação ao tempo, mostrando que a maior conservação deste ácido foi conseguida com o sorbato de potássio a 2 mg/g, e a menor para a amostra controlo. Ainda assim, dada a baixa quantidade deste ácido orgânico, as diferenças, ainda que significativas foram relativamente reduzidas. Um dos resultados mais interessantes verificou-se para o total de ácidos orgânicos, onde se conseguiu claramente entender a contribuição de cada fator independente. Ainda que se tenha verificado uma diminuição significativa de ácidos orgânicos de T0 para T8, o conservante que melhor conservou estas moléculas foi o sorbato de potássio a 2 mg/g. Como poucas vezes se usa esta quantidade máxima de conservante para alimentos, pode-se concluir que efetivamente os três extratos naturais têm capacidade conservante igual à do sorbato de potássio a 0,2 mg/g.

No caso dos açúcares solúveis, foram registadas interações significativas para ambos os fatores, não se conseguindo concluir qual deles teve uma influência mais importante, ainda que as diferenças não sejam significativas.

**Tabela 12 -** Perfil da atividade da água, ácidos orgânicos e açúcares solúveis dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes.

| | | aW | Ácido oxálico (g/100 g) | Ácido quínico (g/100 g) | Ácido cítrico (g/100 g) | Ácido succínico (g/100g) | Total ácidos orgânicos (g/100 g) | Sacarose (g/100 g) | Maltose (g/100 g) | Total açúcares solúveis (g/100 g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tempo de** | 0 Dias | 0,81±0,02 | 0,07±0,02 | 0,83±0,02$^{b}$ | 0,8±0,1 | 0,07±0,07 | 1,80±0,06$^{b}$ | 19±3 | 9±1 | 27±5 |
| **Armazenamento** | 4 Dias | 0,80±0,01 | 0,07±0,01 | 0,71±0,02$^{a}$ | 0,78±0,08 | 0,08±0,06 | 1,71±0,03$^{a, b}$ | 19±4 | 9±2 | 28±6 |
| **(TA)** | 8 Dias | 0,80±0,01 | 0,07±0,02 | 0,71±0,01$^{a}$ | 0,7±0,1 | 0,07±0,06 | 1,68±0,02$^{a}$ | 19±4 | 9±2 | 28±6 |
| ***p*-value (n=3)** | Teste de Tukey | <0,001 | 0,535 | 0,016 | <0,001 | 0,749 | 0,023 | 0,828 | 0,884 | 0,848 |
| | Controlo | 0,81±0,02 | 0,07±0,02 | 0,8±0,3 | 0,7±0,1 | 0,08±0,08$^{a}$ | 1,7±0,3$^{a, b}$ | 17±4 | 8±2 | 26±5 |
| | Sorbato de Potássio 2 | 0,80±0,01 | 0,08±0,01 | 0,9±0,2 | 0,9±0,1 | 0,13±0,03$^{c}$ | 2,0±0,4$^{b}$ | 19±4 | 9±2 | 28±6 |
| | Sorbato de Potássio 0.2 | 0,79±0,01 | 0,08±0,01 | 0,8±0,2 | 0,78±0,09 | 0,05±0,04$^{a, b, c}$ | 1,7±0,3$^{a, b}$ | 18±4 | 8±2 | 26±6 |
| **Tipo de Conservante** | Alecrim | 0,80±0,01 | 0,07±0,02 | 0,8±0,1 | 0,8±0,1 | 0,07±0,05$^{b}$ | 1,8±0,3$^{a, b}$ | 21±3 | 10±1 | 32±4 |
| **(TC)** | Alecrim Max | 0,81±0,01 | 0,07±0,02 | 0,6±0,2 | 0,6±0,1 | 0,05±0,03$^{c}$ | 1,5±0,2$^{a}$ | 20±3 | 8±2 | 29±5 |
| | Cidreira | 0,79±0,01 | 0,07±0,02 | 0,7±0,2 | 0,7±0,1 | 0,03±0,01$^{a, b}$ | 1,6±0,2$^{a}$ | 18±2 | 8,5±0,9 | 26±2 |
| | Cidreira Max | 0,79±0,01 | 0,07±0,01 | 0,7±0,2 | 0,9±0,1 | 0,17±0,08$^{b, c}$ | 1,8±0,3$^{a, b}$ | 20±2 | 9,6±0,9 | 30±3 |
| | Oregãos | 0,80±0,01 | 0,07±0,02 | 0,7±0,2 | 0,76±0,07 | 0,06±0,04$^{a, b, c}$ | 1,6±0,2$^{a, b}$ | 16±6 | 8±3 | 24±9 |
| | Oregãos Max | 0,79±0,01 | 0,06±0,01 | 0,7±0,2 | 0,74±0,04 | 0,10±0,04$^{a, b}$ | 1,6±0,1$^{a, b}$ | 20±3 | 10±1 | 30±4 |
| ***p*-value (n=9)** | Teste de Tukey | <0,001 | 0,093 | 0,189 | <0,001 | 0,062 | 0,014 | 0,407 | 0,253 | 0,353 |
| **TA×TC (n=27)** | *p*-value | <0,001 | 0,038 | 0,225 | 0,082 | 0,313 | 0,423 | 0,316 | 0,289 | 0,308 |

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

### 4.10. Cor exterior

Na **tabela 13** estão representadas as coordenadas *L**, *a** e *b** do topo e lateral dos muffins. Visto que pode haver alterações na cor induzida pelo calor, optou-se por fazer as leituras nos três locais dos muffins. As coordenadas *L**, *a** e *b** representam a cor dos muffins, sendo *L** a luminosidade, *a** a variação entre vermelho e verde e *b** a variação entre o amarelo e azul, permitindo entender como se decompõem as cores. O topo dos muffins apresentou maiores valores de luminosidade em relação a lateral, a indicar que esta parte possui coloração mais clara que a lateral. Em relação ao topo, foi possível entender o contributo tanto do tempo de armazenamento como dos conservantes, sendo que ao longo do tempo, a luminosidade dos muffins baixou significativamente de 56 para 50, mas aumentando a quantidade de vermelho (*a**) e amarelo (*b**) de formas estatisticamente significativas. A estas alterações impostas pelo fator tempo de armazenamento foram também adicionadas as alterações dos conservantes, mostrando que o alecrim foi o conservante que menos influenciou a luminosidade, não mostrando diferenças significativas para os muffin controlo. Em relação à *a**, houve poucas diferenças significativas, sendo que o conservante que mais influenciou foi a cidreira na quantidade máxima. Finalmente, no *b**, a grande maioria dos conservantes mostrou poucas diferenças significativas.

A lateral dos mufins, em relação à luminosidade mostrou uma interação significativa, não permitindo classificar as alterações induzidas pelos dois fatores. Para *a** e *b**, não se puderam classificar as alterações induzidas pelo tempo, mas a cidreia na quantidade máxima (2 mg/g) mostrou uma diferença significativa para a coloração verde, o que era expectável, pois o extrato da cidreira era verde. As coordenadas de *b** também mostrou uma interação significativa, não permitindo classificar cada um dos fatores.

**Tabela 13 -** Perfil das coordenadas colorimétricas (*L**, *a**, *b**) do topo e lateral dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes.

| | | Topo | | | Lateral | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ***L**** | ***a**** | ***b**** | ***L**** | ***a**** | ***b**** |
| **Tempo de Armazenamento (TA)** | 0 Dias | $56\pm1^{b}$ | $10\pm1^{a}$ | $26{,}4\pm0{,}3^{a}$ | 45±3 | 15±4 | 31±4 |
| | 4 Dias | $50\pm1^{a}$ | $13\pm1^{b}$ | $28\pm1^{b}$ | 45±3 | 14±2 | 32±3 |
| | 8 Dias | $50\pm1^{a}$ | $13\pm1^{b}$ | $28\pm1^{b}$ | 46±3 | 14±2 | 32±3 |
| ***p*-value (n=3)** | Teste de Tukey | <0,001 | <0,001 | 0,025 | 0,023 | 0,153 | 0,211 |
| **Tipo de Conservante (TC)** | Controlo | $54\pm3^{d}$ | $12\pm1^{b, c, d}$ | $28\pm3^{a, b}$ | 50±2 | $17\pm1^{b}$ | 31±6 |
| | Sorbato de Potássio 2 | $52\pm2^{a, b, c, d}$ | $13\pm1^{c, d}$ | $29\pm2^{a, b}$ | 46±2 | $16\pm1^{b}$ | 33±2 |
| | Sorbato de Potássio 0.2 | $52\pm3^{b, c, d}$ | $13\pm2^{d}$ | $29\pm2^{b}$ | 44±5 | $16\pm2^{b}$ | 33±2 |
| | Alecrim | $54\pm4^{d}$ | $12\pm2^{b}$ | $27\pm3^{a, b}$ | 45±2 | $15\pm2^{a, b}$ | 32±4 |
| | Alecrim Max | $48\pm1^{a}$ | $12\pm1^{b, c}$ | $26{,}3\pm0{,}8^{a}$ | 46±2 | $13{,}1\pm0{,}7^{a, b}$ | 31±1 |
| | Cidreira | $49\pm2^{a, b, c, d}$ | $13\pm2^{c, d}$ | $29{,}4\pm0{,}7^{a, b}$ | 44±2 | $15\pm2^{a, b}$ | 33±2 |
| | Cidreira Max | $48\pm2^{a, b, c}$ | $11{,}0\pm0{,}4^{a}$ | $27\pm1^{a, b}$ | 45±2 | $12\pm1^{a}$ | 30±2 |
| | Oregãos | $49\pm1^{a, b}$ | $13{,}4\pm0{,}3^{b, c, d}$ | $27{,}1\pm0{,}7^{a}$ | 45±3 | $14\pm1^{a, b}$ | 31±2 |
| | Oregãos Max | $51.3\pm0{,}6^{c, d}$ | $12{,}8\pm0{,}1^{b}$ | $28{,}3\pm0{,}5^{a, b}$ | 47±1 | $13{,}4\pm0{,}9^{a, b}$ | 30±2 |
| ***p*-value (n=9)** | Teste de Tukey | <0,001 | <0,001 | 0,003 | <0,001 | <0,001 | 0,382 |
| **TA×TC (n=27)** | *p*-value | 0,251 | 0,310 | 0,558 | <0,001 | 0,304 | 0,812 |

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

A **figura 25** sintetiza as mudanças de coloração dos muffins no topo e na lateral, que resultaram nas coordenadas da cor. A **figura 25a** inclui todos os tempos de análise para cada um dos muffins, enquanto que a **figura 25b** representa todos os conservantes em relação a cada tempo. Não houve modificações expressivas nas cores dos muffins, o que se afigura um aspeto positivo quanto a influência do uso dos extratos na questão visual do alimento, principalmente, pelos extratos apresentarem diferentes tonalidades de verde. Ainda assim são visíveis nuances nas cores sobretudo do topo do controlo para os muffins com conservantes. Na **figura 25b** consegue-se verificar uma tendência para o escurecimento dos muffins.

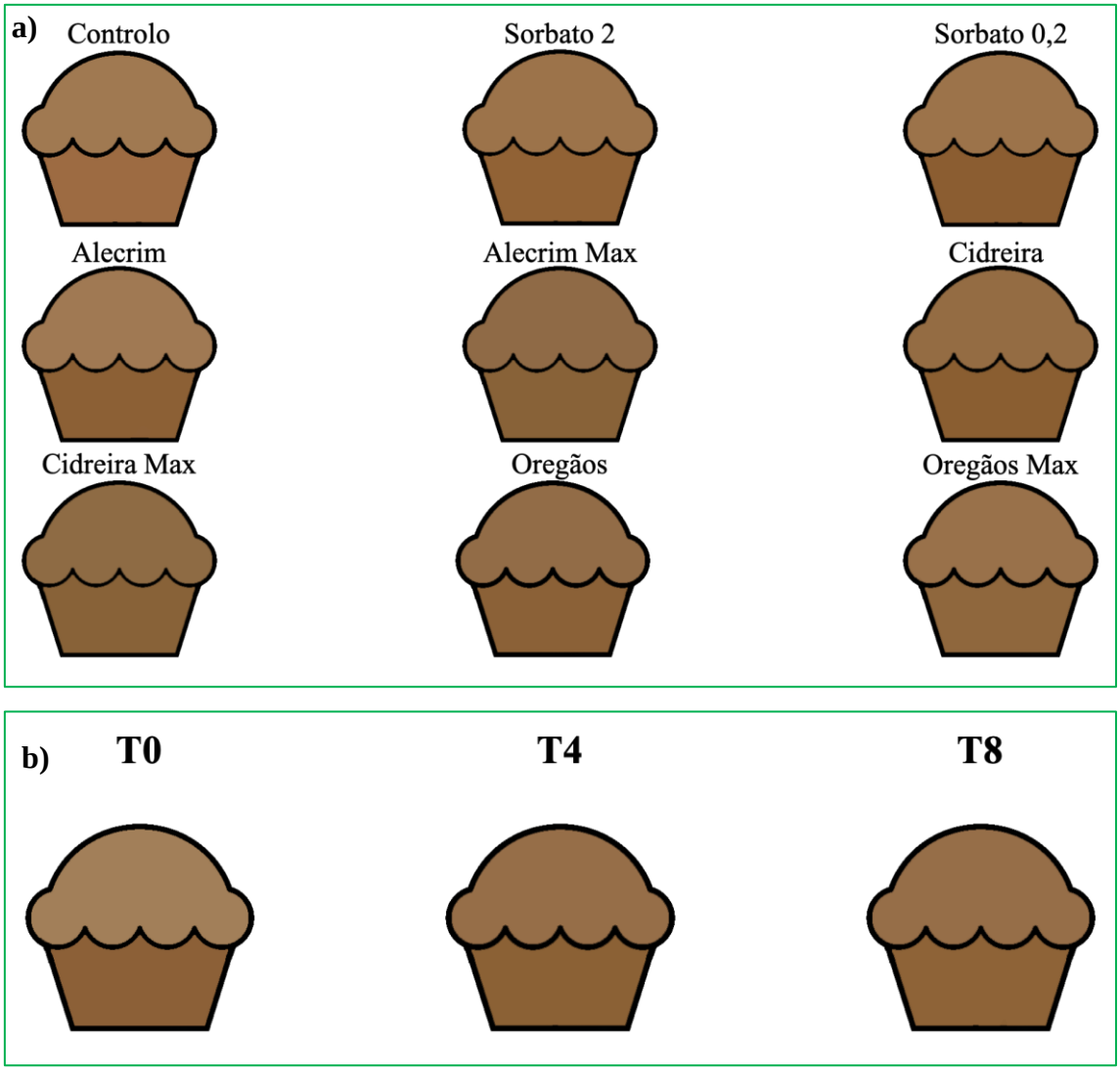



**Figura 25** – Representação ilustrativa da resultante das coordenadas colorimétricas do topo e lateral dos muffins para a) diferentes conservantes e b) diferentes tempos de análise.

### 4.11. Textura

No que concerne à influência dos conservantes naturais no perfil da textura dos muffins, efetuou-se uma análise TPA que imita a mastigação humana. Como está patente na **tabela 14**, apenas não foram registradas interações significativas para a dureza (força necessária que o dente deve efetuar no alimento), adesividade (capacidade de adesão entre o dente e o alimento durante a mastigação) e elasticidade (a taxa de recuperação total do alimento, ou seja, passagem do estado deformado para o não deformado, após a remoção da força aplicada), mostrando que tanto o tempo de armazenamento quanto o tipo de conservante influenciaram o resultado dos outros parâmetros, não permitindo entender a contribuição de cada fator. No tocante aos outros parâmetros, a coesividade pode ser descrita como a resistência da segunda deformação do alimento, em comparação com a primeira deformação; a mastigabilidade pode ser definida como a energia necessária para mastigar o alimento e é resultande da dureza, coesividade e elasticidade; e a resiliência é a capacidade de recuperação do alimento quando a força de deformação é removida, sendo associada com a velocidade e força envolvida para a recuperação.

Em relação à dureza, o tempo de armazenamento, como esperado contribuiu para o aumento da dureza dos muffins, com diferenças significativas registradas entre o primeiro e o último dia. Os conservantes não tiveram uma influência significativa neste parâmetro. O mesmo se verificou para a adesividade, com uma diminuição do primeiro para o oitavo dia, visto que a adesividade e a dureza estão inversamente relacionadas. O facto da adesividade se representar negativamente deve-se ao facto de ser uma força exercida contrariamente à força de esmagamento da sonda na análise de textura. A dimensão onde melhor se pode entender a influência de cada um dos fatores foi na elasticidade, que quanto menor, mais "quebradiço" é o alimento, não apresentando uma maciez "fofa", mas sim um esfarelamento da massa. Assim, como esperado, a elasticidade baixou significativamente do primeiro para o quarto dia, mantendo-se constante do quarto para o oitavo dia. No muffin controlo foi detetada a menor elasticidade, mostrando que os conservantes contribuem para uma manutenção desta dimensão da textura. Assim, consegue-se perceber que o alecrim e o sorbato de potássio nas duas concentrações mantêm a elasticidade ao longo dos 8 dias. Ainda que um conservante não deva ter nenhum outro efeito no alimento onde é adicionado, o facto de se manter a elasticidade de um muffin, neste caso, acaba por se conseguir reduzir a

quantidade de emulsionantes necessários para se manter a sua elasticidade. Por outro lado, o alecrim parece conferir a mesma elasticidade aos muffins que o sorbato de potássio.

**Tabela 14** - Perfil da textura dos muffins conservados por 8 dias com diferentes conservantes.

| | | Dureza (g) | Adesividade (g/s) | Resiliência (%) | Coesividade | Elasticidade (%) | Gomosidade | Mastigabilidade |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tempo de** | 0 Dias | 1523±1956[a] | -1,8±0,2[b] | 19±3 | 0,50±0,06 | 85±3[b] | 548±247 | 424±247 |
| **Armazenamento** | 4 Dias | 2533±405[a, b] | -0,4±0,3[a, b] | 19±2 | 0,51±0,03 | 80±4[a] | 1292±214 | 1042±179 |
| **(TA)** | 8 Dias | 3599±4287[b] | -0,5±0,9[a] | 18±1 | 0,50±0,03 | 80±3[a] | 1366±267 | 1068±232 |
| ***p*-value (n=3)** | Teste de Tukey | 0,026 | 0,035 | 0,075 | 0,324 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | Controlo | 3116±591 | -0,3±0,5 | 17±1 | 0,47±0,03 | 78±4[a] | 1491±355 | 1156±266 |
| | Sorbato de Potássio 2 | 2272±749 | -0,7±1,5 | 18±3 | 0,50±0,07 | 83±2[b] | 1129±558 | 890±531 |
| | Sorbato de Potássio 0.2 | 1941±1124 | -0,2±0,2 | 19±3 | 0,51±0,08 | 83±3[b] | 992±582 | 819±475 |
| **Tipo de** | Alecrim | 1999±763 | -0,3±0,2 | 19±2 | 0,51±0,03 | 81±3[b] | 1053±531 | 832±490 |
| **Conservante (TC)** | Alecrim Max | 4690±7620 | -0,5±0,2 | 18±2 | 0,50±0,02 | 83±3[a, b] | 1097±424 | 856±424 |
| | Cidreira | 3201±2980 | -0,5±0,4 | 20±2 | 0,52±0,02 | 83±3[b] | 865±312 | 830±290 |
| | Cidreira Max | 1901±766 | -0,2±0,3 | 18±2 | 0,48±0,04 | 81±4[a, b] | 865±312 | 683±236 |
| | Oregãos | 1998±762 | -0,4±0,2 | 20±2 | 0,51±0,03 | 83±4[b] | 1008±177 | 830±290 |
| | Oregãos Max | 1846±717 | -0,3±0,2 | 19±1 | 0,50±0,02 | 81±3[a, b] | 975±423 | 719±243 |
| ***p*-value (n=9)** | Teste de Tukey | 0,375 | 0,579 | 0,003 | 0,066 | 0,001 | <0,001 | <0,001 |
| **TA×TC (n=27)** | *p*-value | 0,505 | 0,249 | <0,001 | 0,001 | 0,108 | <0,001 | <0,001 |

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

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou como principais objetivos realizar um estudo das melhores condições de extração dos compostos bioativos de alecrim, cidreira e orégão, bem como avaliar a capacidade conservante destes extratos em muffins de chocolate, por meio de análises químicas e físicas. Portanto, a importância deste trabalho deve-se ao facto de que a perda e segurança alimentar são dois dos principais desafios do século XXI e a busca de meios de conservação com substâncias mais naturais e que não causem danos à saúde humana é uma solução promissora.

Com base no que foi apresentado, a metodologia de teste de rastreio e design fatorial demonstrou ser uma ferramenta essencial para o estudo da otimização das extrações, a evitar altos números de ensaios extrativos e promover economia de recursos. A extração assistida por ultrassom também demonstrou ser um método promissor para extrair compostos fenólicos do alecrim, orégão e cidreira, devido ao seu potencial extrativo, rapidez e vantagens económicas que pode proporcionar. A região com os intervalos ótimos para a extração de cada extrato foi encontrada. No entanto, mais estudos e especificidade são necessários para maior otimização dos resultados, ainda que essas "afinações" possam resultar numa pequena fração de aumento de rendimento, porventura a custos económicos que não as justifiquem. De entre os extratos, o alecrim apresentou os melhores resultados, seguido pela cidreira e depois pelo orégão, contudo foi a cidreira que mostrou uma maior quantidade do composto maioritário e bioativo, o ácido rosmarínico.

No geral, os extratos demonstraram ser mais efetivos contra fungos do que contra bactérias, o que se revelou benéfico visto que devido à baixa quantidade de água sejam os fungos que mais contaminem os muffins. O alecrim foi o extrato que apresentou maior atividade antioxidante e antimicrobiana de entre as plantas estudadas. Infelizmente, os ensaios da carga microbiana não foram realizados devido à pandemia de COVID-19, ensaio esse que permitiria entender definitivamente a contribuição antimicrobiana dos vários extratos.

O uso de conservantes naturais não demonstrou ter impacto significativo no perfil nutricional, atividade da água, açúcares solúveis e ácidos gordos, revelando que, de acordo com o que é esperado dos aditivos, seja um resultado benéfico pois não altera parâmetros

organoléticos. Ainda assim, todos os conservantes influenciaram levemente a cor e textura dos muffins. No caso da textura, a alteração foi também registada para os conservantes sintéticos, mostrando que a alteração imposta pelos conservantes naturais é equivalente ao conservante sintético, mas que, é desejável, pois aumenta a elasticidade de um alimento que tendencialmente se torna quebradiço.

O estudo apresentou limitações em relação ao tempo de análise dos muffins. O tempo poderia ter sido maior para se perceber o que realmente se passou com os ácidos orgânicos, as influências nas características físicas e químicas dos muffins e permitir resultados mais diferenciados em termos da eficácia dos conservantes. O trabalho também pretendia analisar a influência de espessantes naturais para tornar o muffin mais fofo, e entender a relação entre espessantes e conservantes, mas devido à pandemia não se pôde fazer essas análises.

Para trabalhos futuros, em relação a extração, o próximo passo é realizar estudos mais específicos, a envolver a temperatura, solvente e tempo com a utilização da EAU, para se obter maiores rendimentos de acordo com cada planta e composto desejado. Em relação aos muffins, o próximo passo é fazer as análises ao longo de mais tempo, provavelmente mais de um mês, usando atmosferas modificadas para não haver um endurecimento do muffin e estudar a adição de diferentes tipos de espessantes nos muffins como substituto do glúten.

## 6. REFERÊNCIAS


Ahvenainen, R., 2003. *Novel food packaging techniques*. 1 ed. Woodhead Publishing Limited e CRC Press.

Albuquerque, B.R., Pinela, J., Barros, L., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R. Anthocyanin-rich extract of jabuticaba epicarp as a natural colorant: Optimization of heat- and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. *Food Chemistry*. Vol. 316, p. 126364.

America, The Herb Society of, 2005. *Oregano and Marjoram Oregano: quick facts*. Kirtland: The Herb Society of America.

Azmin, S. N. H. M., Manan, Z. A., Alwi, S. R. W., Chua, L. S., Mustaffa, A. A., & Yunus, N. A., 2016. Herbal processing and extraction technologies. *Separation and Purification Reviews*. Vol. 45, no. 3, 305–320.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. Vol. 117, no. 4, 426–436.

Aste, N., Pero, C. del, Leonforte, F., 2017. Active refrigeration technologies for food preservation in humanitarian context – A review. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. Vol. 22, p. 150-160

Barros, L., Pereira, C. & Ferreira, I.C.F.R., 2013. Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Anal. Methods*. Vol. 6, 309–316.

Bhaduri, S., Mukherjee, A. K., 2016. Rheology of muffin batters by line spread test and viscosity measurements. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*. Vol. 5, p. 325–329.

Bourne, M. (2002). Food texture and viscosity: concept and measurement. *Food Science and Technology_International Series.* Ed. 2. Academic Press.

Caleja, C., Barros, L., Barreira, J.C.M., Ciric, A., Sokovic, M. Calhelha, R. C., Beatriz, M., Oliveira, P. P., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Suitability of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract rich in rosmarinic acid as a potential enhancer of functional properties in cupcakes. *Food Chemistry* Vol. 250, p. 67–74.

Campos, M. R. S., 2019. *Bioactive Compounds: health benefits and potential applications*. Woodhead Publishing.

Carocho, M, Barreira, J.C.M., Bento, A., Fernández-Ruiz, V., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2016. Chestnut and lemon balm based ingredients as natural preserving agents of the nutritional profile in matured ‘‘Serra da Estrela” cheese. *Food Chemistry*. Vol. 204, p. 185–193.

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2014. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 13, no. 4, p. 377–399.

Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 45, p. 284–295.

Carocho, M., Morales, P., Ciudad-Mulero, Fernández-Ruiz, V., Ferreira, E., Heleno, S., Rodrigues, P., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2020. Comparison of diferent bread types: Chemical and physical parameters. Food Chemistry. Vol. 310, p. 125954.

Celiac Disease Foundation, 2019. What is Celiac Disease? (online). (Acesso em: 13 evereiro, 2020). Disponível em: https://celiac.org/about-celiac-disease/what-is-celiac-disease/

Chen, J.; Rosenthal, A., 2015. *Modifying Food Texture - Volume 1: Novel Ingredients and Processing Technique*. Woodhead Publishing.

Codex Aalimentarius (FAO/WHO), 2020. About Codex Alimentarius. *FAO/WHO Food Standards Programme* (online). (Acesso em: 5 janeiro, 2020). Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/

Cross, N. 2004. Bakery: Muffins. In: Food Processing: Principles and Applications. (Eds. Smith, J.S., Hui, Y.H). Blackwell Publishing, Ames, IA, USA.

Das, A. K., Islam, M. N., Faruk, M. O., Ashaduzzaman, M., & Dungani, R., 2020. Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*. Vol. 135, p. 58–70.

Direção Geral da Cominicação (COMISSÃO EUROPEIA), 2014. *Do campo para a mesa : segurança alimentar*. União Europeia.

Europeia, Comissão, 2011. REGULAMENTO (UE) N. o 1129/2011 DA COMISSÃO de 11 de Novembro de 2011. (online). 2011. (Acesso em: 28 novembro, 2019). Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:PT:PDF.

FAO/WHO (Fifty-seventh meeting of the Joint), JECFA (Expert Committee on Food Additives), 2008. *WHO Food Additives (Series 48): Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. Geneva: World Health Organization (WHO).

Garcia-Cabral, I., 2010. Imagem da espécie *Rosmarinus officinalis var. officinalis*. *Jardim Botânico UTAD, Flora Digital de Portugal* (online). (Acesso em: 30 Outubro, 2020). Disponível em: https://jb.utad.pt/multimedia/7839 https://jb.utad.pt/multimedia/7839.

Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R., 2013. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: A comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry*. Vol. 136, p. 718–725.

Gonçalves, G. de A., Sá-Nakanishi, A. B. deComar, J. F., Bracht, L., Dias, M. I., Barros, L., Peralta, R. M., Ferreira, I. C. F. R., BRACHT, A., 2018. Water soluble compounds of *Rosmarinus officinalis L*. improve the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Food & Function*. Vol. 9, p. 2328–2340.

Grumezescu, A. M., Holban, A. M., 2018. *Food packaging and preservation - Handbook of Food Bioengineering*. Academic Press.

Hermanns, A. S., Zhou, X., Xu, Q., Tadmor, Y., Li, L., Journal, H. P., Zhou, X., Xu, Q., Tadmor, Y., & Li, L., 2020. Carotenoid Pigment Accumulation in Horticultural Plants. *Horticultural Plant Journal.*

Jiménez-Moreno, N., Esparza, I., Bimbela, F., Gandía, L. M., & Ancín-Azpilicueta, C., 2020. Valorization of selected fruit and vegetable wastes as bioactive compounds: Opportunities and challenges. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Vol. 50, no. 20, 2061–2108.

Jovanović, A. A., Đorđević, V. B., Zdunić, G. M., Pljevljakušić, D. S., Šavikin, K. P., Gođevac, D. M., & Bugarski, B. M., 2017. Optimization of the extraction process of polyphenols from Thymus serpyllum L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*. Vol. 179, 369–380.

Karp, S., Wyrwisz, J., Kurek, M. A., & Wierzbicka, A., 2017. Combined use of cocoa dietary fibre and steviol glycosides in low-calorie muffins production characteristic porous structure and spongy texture. *International Journal of Food Science and* Technology. Vol. 52, p. 944–953.

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

Martínez-Cervera, S., Sanz, T., Salvador, A., Fiszman, S. M., 2012. Rheological, textural and sensorial properties of low-sucrose muffins reformulated with sucralose/polydextrose. *LWT - Food Science and Technology*. Vol. 45, no. 2, p. 213–220.

Matos, M. E, Sanz, T. ROSELL, C. M., 2014. Establishing the function of proteins on the rheological and quality properties of rice based gluten free muffins. *Food hydrocolloids*. Vol. 35, p. 150–158.

Meullenet, J-F.C., Gross, J., 1999. Instrumental single and double compression tests to predict sensory texture characteristics of foods. *Journal of texture Studies*. Vol. 30, p. 167–180.

Meyers, M., 2005. *Oregano and Marjoram: an herb society of America guide to the Genus Origanum*. Kirtland: The Herb Society of America.

Meyers, M., 2007. *Lemon Balm: an herb society of America guide*. Kirtland: The Herb Society of America.

Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N., 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis L.* (*Lamiaceae*) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 52, no. 9, p. 2485–2489.

Oliveira, G. D. A. R., De Oliveira, A. E., Da Conceição, E. C., & Leles, M. I. G., 2016. Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary. *Food Chemistry*. Vol. 211, 465–473.

Peter, K. V., 2004. *Handbook of herbs and spices*. Woodhead Publishing Limited & CRC Press.

Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., Goyanes, S., 2017. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*. Vol. 63, p. 488–495.

Rahman, M. S., 2007. *Handbook of Food Preservation*. 2 ed. CRC Press.

Raja, R. R., 2012. Medicinally potencial plants of *Labiatae* (*Laminaceae*) family: an overview. *Research Journal of Medicinal Plant*. Vol. 6, p. 203–2013.

Regulamento (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council. 2011.

Ribeiro, A., Caleja, C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Barreiro, M. F., Ferreira, I. C. F. R., 2016. Rosemary extracts in functional foods: extraction, chemical characterization and incorporation of free and microencapsulated forms in cottage cheese. *Food & Function*. Vol. 7, p. 2185–2196.

Rižnar, K., Čelan, Š., Knez, Ž., Škerget, . Bauman, D., Glaser, R., 2006. Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary extract in chicken frankfurters. *Journal of Food Science*. Vol. 71, no. 7.

Rockstein, A., 2017. Imagem da espécie Origanum vulgare subesp. virens. *Jardim Botânico UTAD*, Flora Digital de Portugal (online). (Acesso em: 30 outubro, 2020). Disponível em: https://jb.utad.pt/multimedia/14897.

Roller, S., 2003. *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Rosentrater, K. A., Evers, A.D., 2018. Kent's technology of cereals. 5 ed. Woodhead Publishin.

Scholten, E., Moschakis, T., Biliaderis, C. G., 2014. Biopolymer composites for engineering food structures to control product functionality. *Food Structure*. Vol. 1, no. 1, p. 39–54.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*. Vol. 18, p. 820–897.

Shevkani, K., Kaur, A., Kumar, S., Singh, N., 2015. Cowpea protein isolates: functional properties and application in gluten-free rice muffins. *LWT - Food Science and Technology*. Vol. 63, no. 2, p. 927–933.

Sik, B., Hanczné, E. L., Kapcsándi, V., & Ajtony, Z. (2020). Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six Lamiaceae plants as determined by HPLC-DAD measurement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 184.

Smith, J.S., Hui, Y.H. 2004. *Food Processing, Principles and Applications.* Blackwell Publishing, NY.

Sokovic, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., Van Griensven, L. J. L. D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15, 7532–7546.

Sullivan, J. J. O., Mahony, J. A. O, 2016. Food ingredients. In: *Reference Module in Food Science*. Elsevier. p. 1–3.

Theron, M. M., Lues, J. F. R., 2011. *Organic acids and food preservation*. 1. CRC Press.

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A. D.. Brantner, A. H., 2014. Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the *Lamiaceae* family. *Molecules*. Vol. 19, p. 767–782.

Woodhouse, A., Davis, J., Pénicaud, C., Östergren, K., 2018. Sustainability checklist in support of the design of food processing. *Sustainable Production and Consumption*. Vol. 16, p. 110–120.

Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D., Sporns, P., 2005. *Handbook of food analytical chemistry: Pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components*. Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc.

Zgórka, G., Głowniak, K., 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 26, p. 79–87.

## TRABALHOS PUBLICADOS

### 1. Artigo

Mariana C. Pedrosa, Jonata M. Ueda, Bruno Melgar, Maria Inês Dias, José Pinela, Ricardo C. Calhelha, Marija Ivanov, Marina Soković, Sandrina Heleno, Aline Bruna da Silva, Marcio Carocho, Isabel C.F.R. Ferreira, Lillian Barros. Preservation of Chocolate Muffins with Lemon Balm, Rosemary and Oregano Extracts. (Submetido) Foods.

**2. Ata de conferência**

Mariana C. Pedrosa, Jonata M. Ueda, Sandrina Heleno, Bruno Melgar, Marija Ivanov, Marina Soković, Marcio Carocho, Isabel C.F.R. Ferreira, Lillian Barros. Novembro de 2020. Antimicrobial Activity of Aqueous Plant Extracts as Potential Natural Additives. 1st International Electronic Conference on Food Science and Functional Foods - Session Food Microbiology and Biotechnology (online) doi:10.3390/foods_2020-07595.

**3. Poster**

Mariana C. Pedrosa, Jonata M. Ueda, Sandrina Heleno, Marcio Carocho, Lillian Barros. Setembro de 2020. Efficacy, Sustainability and Safety of Natural Food Preservatives: A Study on Muffins Preserved with Plant Extracts. *The 8th World Sustainability Forum* (online).

Jonata M. Ueda, Mariana C. Pedrosa, Sandrina Heleno, Marcio Carocho, Lillian Barros. Setembro de 2020. Development of natural preservatives for the food industry: An integrated strategy focused on the use of sustainable, low cost and efficient processes. The 8th World Sustainability Forum (online).