

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Aplicação de espectroscopia de infravermelhos na
determinação da vida útil de hambúrgueres de carne
Maronesa: Influência de óleos essenciais e temperatura de
armazenamento**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Segurança Alimentar

Dirce Martins Moura

Orientadores

Prof.^a Dr.^a Cristina Maria Teixeira Saraiva

Prof. Dr. José Manuel Marques Martins de Almeida



Vila Real, 2015

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Aplicação de espectroscopia de infravermelhos na na
determinação da vida útil de hambúrgueres de carne
Maronesa: Influência de óleos essenciais e temperatura de
armazenamento**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Segurança Alimentar

Dirce Martins Moura

Composição do Júri

Vila Real, 2015

JÚRI DE AVALIAÇÃO

O Presidente de júri

(Prof. Dr. José António de Oliveira e Silva)

O Arguente

(Prof.^a Dr.^a Alexandra Sofia Miguens Fidalgo Esteves)

O Orientador,

(Prof. Dr. José Manuel Marques Martins de Almeida)

Classificação: _____

Data: ____/____/____

*“Quero para mim o espírito desta frase,
transformada a forma para a casar com o que eu sou:
Viver não é necessário; o que é necessário é criar.”*

(Fernando Pessoa)

Este trabalho foi elaborado com vista à realização da unidade curricular de Dissertação do 2º ano do Mestrado em Segurança Alimentar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

AGRADECIMENTOS

Um especial agradecimento a todas as pessoas que me apoiaram a concretizar esta etapa da minha vida, salientando:

À Professora Doutora Cristina Saraiva e ao Professor Doutor José Manuel Almeida por toda a disponibilidade, ajuda, paciência, preocupação, e, acima de tudo, amizade. Pelo encorajamento a seguir em frente com este trabalho, valorizando todo o tempo e dedicação investidos.

Ao Professor Doutor Alfredo Aires, Professor Doutor Luís Patarata e ao Professor Doutor António Silva, Professora Doutora Alexandra Esteves, Doutora Myriam Taghouti por toda a disponibilidade e ajuda.

À auxiliar D. Ana e à D. Fátima, Sr. Carlos da Costa por todo o apoio, disponibilidade, dedicação e paciência.

Aos colegas Patrícia Pires, Mara Carvalhais e Diogo Pereira pela disponibilidade e auxílio na execução deste trabalho.

A minha mãe pelo apoio, carinho e força de mãe, ao meu pai e ao meu padrasto que me ensinaram como aproveitar as oportunidades da vida e como vence-las.

Aos meus amigos, com especial aos que nunca me deixaram desistir, sempre me apoiaram, nesta etapa tão difícil e a auxiliaram, realçando, André Augusto, João Chaves, Davide Silva, Ana Rita Sousa, ao meu namorado André Canastra e à Joana Vilela pelo companheirismo e luta constante nesta etapa minuciosamente importante.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
Abstract.....	xviii
Resumo	xviii
CAPÍTULO I- Revisão Bibliográfica	i
1.1 Enquadramento temático	1
1.2 Carne de bovino “Maronesa”	3
1.3 Deterioração da carne fresca	4
1.4 Tipos de deterioração	5
1.4.1.1 Deterioração microbiana.....	5
1.4.1.2 Deterioração química	6
1.4.1.2.1 Oxidação lipídica	8
1.4.1.3 Alterações sensoriais	11
1.4.2 Fatores envolvidos na deterioração	13
1.4.2.1 Fatores extrínsecos	13
1.4.2.1.1 Temperatura	13
1.4.2.2 Fatores intrínsecos.....	14
1.4.2.2.1 pH.....	14
1.4.2.2.2 Atividade da água.....	15
1.5 Microbiota da carne.....	15
1.5.1 Principal Microbiota da Carne	16
1.5.1.1 Bactérias do ácido lático.....	16
1.5.1.2 Brochetrix thermosphacta.....	16
1.5.1.3 Pseudomonas spp.	17
1.5.1.4 Enterobacteriaceae	18
1.5.1.5 Fungos	18

1.5.1.6	Mesófilos	19
1.5.1.7	Psicrotróficos	19
1.6	Estratégias de aumento de vida útil de carnes frescas	20
1.6.1	Aplicação de embalagens	20
1.6.1.1	Embalagem a vácuo	22
1.6.1.2	Embalagem de atmosfera modificada	22
1.6.1.3	Embalagem de aerobiose	23
1.6.2	Adição de óleos essenciais.....	24
1.6.2.1	Óleo essencial de Laranja	25
1.6.2.2	Óleo essencial de Louro	26
1.6.2.3	Óleo essencial de Murta	27
1.7	Métodos alternativos de análise de alimentos.....	29
1.7.1	Métodos de cromatográficos.....	29
1.7.2	Métodos de espectroscópicos.....	29
1.7.2.1	Espectroscopia de infravermelho	30
1.7.2.1.1	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	31
1.8	Quimiometria	32
1.8.1	Análise discriminante linear	32
1.8.2	Análise em componentes principais	33
1.8.3	Regressão PCR e PLS-R.....	33
1.9	Objetivos.....	34
CAPÍTULO II- Material e Métodos		36
2.1	Delineamento experimental	37
2.1.1	Amostragem.....	37
2.1.1.1	Extração dos óleos essenciais	37
2.1.1.2	Determinação da concentração mínima inibitória	37
2.1.1.3	Análise dos compostos por GC-MS.....	39

2.1.1.4	Adição dos OE's às amostras.....	39
2.1.1.5	Preparação, embalagem e acondicionamento das amostras	40
2.1.1.6	Determinação Físico-químicas.....	41
2.1.1.6.1	pH.....	41
2.1.1.6.2	Coordenadas de cor L*a*b*	41
2.1.1.6.3	Atividade antioxidante	41
2.1.1.6.4	TBARS	42
2.1.1.7	Análise por FTIR-ATR.....	43
2.1.1.8	Determinações microbiológicas.....	44
2.1.1.8.1	Preparação das diluições e sementeira.....	44
2.1.1.8.2	Contagem de microrganismos mesófilos (aeróbios totais a 30°C)	44
2.1.1.8.3	Contagem de microrganismos psicrotróficos (aeróbios totais a 7°C).....	44
2.1.1.8.4	Contagem de Bactérias do ácido láctico	44
2.1.1.8.5	Contagem de Enterobacteriaceae	45
2.1.1.8.6	Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.....	45
2.1.1.8.7	Contagem de Fungos (bolores e leveduras)	45
2.1.1.9	Análise sensorial	46
2.1.1.10	Análise de dados	46
CAPÍTULO III- Resultados e Discussão.....		48
2.2	Resultados e discussão.....	49
2.2.1	Rendimento dos óleos essenciais	49
2.2.2	Resultados da concentração mínima inibitória	50
2.2.3	Composição volátil dos óleos essenciais	51
2.2.4	Determinações Físico-químicas	55
2.2.4.1	pH.....	55
2.2.4.2	Coordenadas de Cor L*a*b*.....	58
2.2.4.2.1	Parâmetro L*	59
2.2.4.2.2	Parâmetro a*	62
2.2.4.2.3	Parâmetro b*	65
2.2.4.3	Atividade antioxidante	69

2.2.4.4	TBARS	69
2.2.5	Análise espectroscópica por FTIR.....	73
2.2.6	Determinações Microbiológicas	74
2.2.6.1	Mesofilos	74
2.2.6.2	Psicrotróficos	78
2.2.6.3	Bactérias de ácido láctico	81
2.2.6.4	Enterobacteriaceae	85
2.2.6.5	Pseudomonas spp.	89
2.2.6.6	Fungos (Bolores e leveduras)	93
2.2.7	Análise Sumária das variáveis	96
2.2.7.1	Análise Físico-químicas	96
2.2.7.2	Análise Microbiológicas.....	99
2.2.8	Análise Sensorial.....	103
2.2.9	Correlações de pearson.....	107
2.2.10	Análise Quimiométrica.....	109
2.2.11	Regressão PCR e PLS-R.....	117
CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO		144
CAPÍTULO V- Referências Bibliográficas		146
Anexo 1.....		155
Anexo 1I		156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fêmea Maronesa (http://www.marones.pt/ , 2015).....	3
Figura 2: Estrutura da Mioglobina (adaptado (Maqsood, <i>et al.</i> , 2012).....	7
Figura 3: Oxidação da mioglobina adaptado de Suman and Joseph (2013).....	8
Figura 4: Fruto <i>Citrus x sinensis</i> L. osbeck do jardim botânico da UTAD.....	26
Figura 5: Folha de <i>Laurus nobis</i> L. do jardim botânico da UTAD.....	27
Figura 6: Arbusto de <i>Mytus Communis</i> L. do jardim botânico da UTAD	28
Figura 7: Esquema da leitura da amostra com o cristal de ATR adaptado de (Ismail, <i>et al.</i> , 2006).....	32
Figura 8: Placa de 96 poços do método de MIC adaptado de (Sarker, <i>et al.</i> , 2007).....	38
Figura 9: Princípio do método de determinação da capacidade antioxidante com ABTS ⁺	41
Figura 10: Análise da amostra por FTIR-ATR.....	43
Figura 11: Gráfico de evolução do pH da carne embalada em Aerobiose com os óleos essenciais de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C	56
Figura 12: Gráfico de evolução do pH da carne embalada a vácuo com os óleos essenciais de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C	57
Figura 13: Gráfico de evolução do parâmetro L* da cor de carne picada embalada em Aerobiose com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C.....	59
Figura 14: Gráfico de evolução do parâmetro L* da cor de carne picada embalada a vácuo com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C	61
Figura 15: Gráfico de evolução do parâmetro a* da cor de carne picada embalada em Aerobiose com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C.....	62
Figura 16: Gráfico de evolução do parâmetro a* da cor de carne picada embalada a Vácuo com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C	64
Figura 17: Gráfico de evolução do parâmetro b* da cor de carne picada embalada em Aerobiose com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C.....	66
Figura 18: Gráfico de evolução do parâmetro b* da cor de carne picada embalada a vácuo com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C	68
Figura 19: Gráfico de evolução da oxidação lipídica pelo método de TBARS de carne picada embalada a aerobiose com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C...70	
Figura 20: Gráfico de evolução do TBARS de carne picada embalada a vácuo com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C	72

Figura 21: Espectro de FTIR das amostras de OE de louro e murta no tempo 0h e 336 h embaladas em aerobiose	73
Figura 22: Espectro de FTIR das amostras de OE de louro e murta no tempo 0h e 336 h embaladas a vácuo	74
Figura 23: Gráfico de evolução dos microrganismos mesófilos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas de 2°C e 8°C	75
Figura 24: Gráficos de evolução dos microrganismos mesófilos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas de 2°C e 8°C.....	77
Figura 25: Gráfico de evolução dos microrganismos psicrótróficos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas de 2°C e 8°C	79
Figura 26: Gráficos de evolução dos microrganismos psicrótróficos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C.....	81
Figura 27: Gráficos de evolução das bactérias do ácido láctico (BAL) nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas 2°C e 8°C	82
Figura 28: Gráficos de evolução das bactérias do ácido láctico (BAL) nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C	84
Figura 29: Gráficos de evolução das <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas 2°C e 8°C	86
Figura 30: Gráficos de evolução das <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embalada a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C	88
Figura 31: Gráficos de evolução das <i>Pseudomonas</i> spp. nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas 2°C e 8°C	90
Figura 32: Gráficos de evolução das <i>Pseudomonas</i> spp. nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C.....	92
Figura 33: Gráficos de evolução dos Fungos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas 2°C e 8°C.....	93
Figura 34: Gráficos de evolução dos Fungos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C	95
Figura 35: Gráfico de evolução das análises físico-químicas à temperatura de 2°C em aerobiose	97
Figura 36: Gráfico de evolução das análises físico-químicas à temperatura de 8°C em aerobiose	98

Figura 37: Gráfico de evolução das análises físico-químicas à temperatura de 2°C em Vácuo	99
Figura 38: Gráfico de evolução das análises físico-químicas à temperatura de 8°C em Vácuo	99
Figura 39: Gráfico de evolução da microbiota à temperatura de 2°C em aerobiose ..	100
Figura 40: Gráfico de evolução da microbiota à temperatura de 8°C em aerobiose	101
Figura 41: Gráfico de evolução das bactérias analisadas relativamente às temperaturas de 2°C em Vácuo	102
Figura 42: Gráfico de evolução das bactérias analisadas relativamente às temperaturas de 8°C em Vácuo	103
Figura 43: Gráfico de evolução da avaliação global de frescura das amostras de controlo, OE de laranja, louro e murta em embalagem de aerobiose às temperaturas de 2°C e 8°C	104
Figura 44: Gráfico de evolução da avaliação global de frescura das amostras de controlo, OE de laranja, louro e murta em embalagem de vácuo às temperaturas de 2°C e 8°C	106
Figura 45: Gráfico das observações obtido por PCA para os OE's em aerobiose utilizando variáveis microbiológicas e físico-químicas	110
Figura 46: Gráfico das observações obtido por PCA para os OE's em vácuo utilizando variáveis microbiológicas e físico-químicas	111
Figura 47: Gráfico das observações obtido por PCA utilizando variáveis espectrais	112
Figura 48: Gráfico das observações resultante da análise discriminante para o controlo em função da AGF utilizando as variáveis espectrais	113
Figura 49: Gráfico das observações resultante da análise discriminante para o OE de louro em função da AGF utilizando as variáveis espectrais	115
Figura 50: Gráfico das observações resultante da análise discriminante para o OE de murta em função da AGF utilizando as variáveis espectrais	116
Figura 51: Regressão PLS-R e PCR	119
Figura 52: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para o pH das amostras Controlo	120
Figura 53: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para o TBARS do Controlo	121
Figura 54: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os Mesófilos das amostras Controlo	123

Figura 55: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os <i>Psicrotróficos</i> das amostras Controlo	124
Figura 56: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para BAL das amostras Controlo	126
Figura 57: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para <i>Enterobacteriaceae</i> das amostras Controlo.....	127
Figura 58: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para <i>Pseudomonas</i> spp. das amostras controlo	129
Figura 59: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os Fungos das amostras Controlo	130
Figura 60 : Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para o pH do OE de murta	132
Figura 61: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para o TBARS do OE de murta.....	133
Figura 62: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os mesófilos do OE de murta.....	135
Figura 63: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os psicrotróficos do OE de murta	136
Figura 64: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para BAL de murta	138
Figura 65: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para <i>Enterobactereaceae</i> de murta.....	139
Figura 66: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para <i>Enterobactereaceae</i> de murta.....	141
Figura 67: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para Fungos de murta.....	142
Figura 68: Estrutura química dos compostos principais dos óleos essenciais (Bakkali, <i>et al.</i> , 2008; Jayasena e Jo, 2013a).....	155
Figura 69: Ficha de análise sensorial	156

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 : Micorganismos deteriorativos e patogénicos associados à carne fresca e derivados (adaptado(Borch, <i>et al.</i> (1996); Jayasena and Jo (2013a))	6
Tabela 2: Mecanismo da oxidação lipídica adaptado de Kerrihard, <i>et al.</i> (2015)	9
Tabela 3: Compostos característicos da carne adaptado de (Calkins e Hodgen, 2007)	12
Tabela 4: Exemplos de espécies de microrganismos que ocorrem durante o armazenamento da carne crua em diferentes condições adaptado de Doulgeraki, <i>et al.</i> (2012).	21
Tabela 5: Valores de absorção dos diferentes grupos funcionais (Machado, 2013).	31
Tabela 6: Adição dos OE's na carne picada	40
Tabela 7: Amostragem de acordo com a embalagem e tempo de armazenamento (dias)	40
Tabela 8: Rendimento da extração dos OE's	49
Tabela 9: Concentração mínima inibitória dos OE's em µL/mL	50
Tabela 10: Compostos voláteis principais de OE de <i>Myrtus Communis</i> L., <i>Laurus Nobilis</i> L. e <i>Cirtus Sinensis</i> L. osbeck determinados por GC-MS	52
Tabela 11: Valores de pH (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose. 56	
Tabela 12: Valores de pH (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalados a vácuo.	58
Tabela 13: Valores do parâmetro L* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose	60
Tabela 14: Valores do parâmetro L* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo 61	
Tabela 15: Valores do parâmetro a* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose	63
Tabela 16: Valores do parâmetro a* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo 65	
Tabela 17: Valores do parâmetro b* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose	67

Tabela 18: Valores do parâmetro b* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo	68
Tabela 19: Resultados da atividade antioxidante dos OE's	69
Tabela 20: Valores de TBARS (mg de malonaldeído/ 100g de amostra, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose	71
Tabela 21: Valores de TBARS (mg de malonaldeído/ 100g de amostra, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo	72
Tabela 22: Contagens de mesófilos (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose	76
Tabela 23: Contagens de TVC (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo	78
Tabela 24: Contagens de psicrotóxicos (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose	80
Tabela 25: Contagens de psicrotóxicos (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo	81
Tabela 26: Contagens de BAL (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose	83
Tabela 27: Contagens de BAL (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo	85
Tabela 28: Contagens das <i>Enterobacteriaceae</i> (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose	87
Tabela 29: Contagens das <i>Enterobacteriaceae</i> (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo	89

Tabela 30: Contagens das <i>Pseudomonas</i> spp. (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose	91
Tabela 31: Contagens das <i>Pseudomonas</i> spp. (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo	92
Tabela 32: Contagens de Fungos (log ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada em aerobiose	94
Tabela 33: Contagens de Fungos (log ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo.....	96
Tabela 34: Avaliação global de frescura (cm, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada em aerobiose	105
Tabela 35: Avaliação global de frescura (cm, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo.....	107
Tabela 36: Correlação de Pearson das amostras de controlo e com OE's para ambas as embalagens a 8°C e 2°C	108
Tabela 37: Fatores de determinação da PCA em função das variáveis microbiológicas e físico-químicas	111
Tabela 38: Matriz de confusão para o conjunto de amostras de controlo de calibração e para validação cruzada com base nas observações dos dados espectrais para AGF.	114
Tabela 39: Matriz de confusão para o conjunto de amostras de OE de Louro de calibração e para validação cruzada com base nas observações dos dados espectrais para AGF.	115
Tabela 40: Matriz de confusão para o conjunto de amostras de OE de Murta de calibração e para validação cruzada com base nas observações dos dados espectrais para AGF.	117
Tabela 41: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo no pH.....	120
Tabela 42: Calibração e Validação de PCR e PLS-R de controlo no TBARS	122
Tabela 43: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo nos Mesófilos.	123
Tabela 44: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo no <i>Psicotróficos</i>	125

Tabela 45: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo para as BAL ...	126
Tabela 46: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo para as <i>Enterobacteriaceae</i>	128
Tabela 47: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo para as <i>Pseudomonas</i> spp.	129
Tabela 48: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo para os Fungos	131
Tabela 49: Características das regressões PCR e PLS-R do pH do OE de Murta	132
Tabela 50: Características das regressões PCR e PLS-R de TBARS do OE de Murta.....	134
Tabela 51: Características das regressões PCR e PLS-R dos Mesófilos do OE de Murta	135
Tabela 52: Calibração e Validação de PCR e PLS-R dos Psicrotróficos do OE de Murta ...	137
Tabela 53: Calibração e Validação de PCR e PLS-R do valor de contagens de BAL do OE de Murta	138
Tabela 54: Calibração e Validação de PCR e PLS-R do valor de contagens de <i>Enterobacteriaceae</i> do OE de Murta.....	140
Tabela 55: Calibração e Validação de PCR e PLS-R do valor de contagens de <i>Enterobacteriaceae</i> do OE de Murta.....	141
Tabela 56: Calibração e Validação de PCR e PLS-R do valor de contagens de Fungos do OE de Murta.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS

μL- Microlitro

AP- Embalagem de aerobiose

ATR – Reflexão total atenuada

BAL – Bactérias do ácido láctico

DA – Análise discriminante (do inglês “*discriminant analysis*”)

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

g- Grama

GC – Cromatografia gasosa

h – Horas

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

Lag – Fase de latência

Log ufc/g – Logaritmo das unidades formadoras de colônias por grama

MAP – Atmosferas modificadas

MDA – Malonaldeído (mg/100g)

mg- Miligrama

min. - Minutos

mL- Mililitro

MS – Espectroscopia de massa

nm- Nanômetro

OE- Óleo essencial

PC – Componentes principais

PCA – Análise em componentes principais

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PCR – Regressão por componentes principais

pH – Potencial hidrogeniônico

PLS-R – Regressão por mínimos quadrados parciais

RMSEC – Raiz quadrada do erro médio de calibração

RMSECV – Raiz quadrada do erro médio de validação

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

vol.- Volume

Resumo

Os óleos essenciais (OE) podem ser utilizados como conservantes de alimentos para melhorar a segurança alimentar, reduzindo o desenvolvimento da microbiota e aumentando o tempo de vida útil da carne de bovino.

O objectivo deste estudo foi avaliar o efeito de OE de plantas e frutas de ocorrência natural no norte de Portugal sobre a deterioração de carne picada de carne Maronesa armazenados em 2 e 8 ° C, sob diferentes condições de embalagem, bem como avaliar o grau de deterioração através da aplicação de espectroscopia de infravermelho.

A utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), combinada com quimiometria, permite estimar os valores de pH, TBARs e contagens de microorganismos e, ainda, discriminar as amostras que foram tratadas com os diferentes OE e diferenciar o seu grau de frescura.

Para produzir OE as folhas de louro (*Laurus nobilis* L.) e de murta (*Myrtus Communis* L.) foram colhidas no jardim botânico da UTAD e a casca da laranja (*Citrus sinensis* L.) no mercado local. As folhas e cascas secas foram submetidas ao método de hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo Clevenger.

A carne de bovina fresca (*M. semitendinosus* e *M. semimembranosus*) de raça DOP-Maronesa (machos; n = 3) foram obtidos a partir do mercado local e transportados para o laboratório após 72h do seu abate. Depois da carne ser cortada e picada, obtiveram-se amostras de 40 g que foram embalados individualmente em duplicado em duas condições diferentes: aerobiose (Aero) e vácuo (Vac), com e sem um OE. As amostras foram armazenadas a 2 a 8 °C e analisadas imediatamente em 0,1,2,3,5,7,10,14,21,28 e 35 dias para microbiológica, cor ($L^* a^* b^*$), pH, oxidação lipídica e análise sensorial. O painel treinado para análise sensorial avaliou cada amostra 60 minutos após o fim do armazenamento. Os microrganismos analisados foram mesófilos e psicrótróficos totais, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp, BAL e Fungos. O OE com melhor efeito foi o OE de murta em todas as análises elaboradas. Também se obtiveram resultados positivos quando as amostras são embaladas em vácuo e armazenadas à temperatura de 2°C.

Abstrat

Essential oils (EO) can be used as food preservatives to improve food hygiene, reducing the development of the microbiota and increasing the shelf life of beef.

The aim of this study was to evaluate the effect of EO of naturally occurring plants and fruit from the north of Portugal on the spoilage of Maronesa minced beef stored at 2 and 8°C under different packaging conditions as well as evaluate the spoilage level by the application of infrared spectroscopy.

The use of infrared spectroscopy in Fourier transform (FTIR) combined with the use of chemometrics enables the quantitative prediction of the pH value, TBARs and microorganism counts and to discriminate the samples that were treated with different essential oils and differentiate their degree of freshness.

To produce EO, bay leaves (*Laurus nobilis* L.), myrtle (*Myrtus communis* L.) were obtained from the botanical garden of UTAD and orange peel (*Citrus sinensis* L.) from the local market. The leaves and peels were subjected to hydrodistillation using a Clevenger type apparatus.

Fresh beef (semitendinosus and semimembranosus) of DOP-Maronesa breed (males; n=3) were obtained from local market and transported to the laboratory. After cut and minced, 20 g samples were individually packed in duplicate in two different conditions: air (Aero) and vacuum (Vac) with and without one EO. Samples were stored at 2 and 8°C and analyzed immediately at 0,1,2,3,5,7,10,14,21,28 and 35 days for microbiological, colour (L*a*b*), pH, lipid oxidation and sensory analysis. A panel of assessors evaluated each sample after 60 min at each storage end time for color and spoiled odor. The microorganisms analyzed were total mesophilic and total psychrotrophic, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp, BAL and Fungi.

CAPITULO I-

Revisão Bibliográfica

1.1 Enquadramento temático

A carne bovina tem sido amplamente consumida na Europa, ocupando o segundo lugar em termos de produção e consumo (8 000 000 toneladas) (Panagou, *et al.*, 2014), constituindo uma fonte de nutrientes essenciais para o desenvolvimento humano. Contém proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerais, gorduras e outros nutrientes essenciais, apesar de existirem dados epidemiológicos que estabelecem uma relação entre o consumo desta e o aumento do risco de aparecimento de doenças cardiovasculares, metabólicas e cancerígenas (Pereira e Vicente, 2013; Zhang *et al.*, 2010).

A carne é um dos alimentos mais perecíveis, sendo também um substrato com condições propícias à multiplicação de microrganismo deteriorativos e patogénicos e de fenómenos oxidativos (Kodogiannis *et al.*, 2014).

Para além dos métodos microbiológicos, químicos e sensoriais vulgarmente utilizados na avaliação da qualidade e segurança das carnes, a indústria deste setor beneficiaria com a implementação de processos e métodos de quantificação da vida útil que sejam rápidos, ou seja, métodos que permitam estimar a deterioração dos produtos, por forma a evitar desperdícios e aumentar o rendimento financeiro. Alguns métodos que estão a ser utilizados atualmente na indústria alimentar incluem o FTIR (espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier). Estes métodos, baseiam-se na estimativa da atividade metabólica dos microrganismos e alterações bioquímicas que provocam a formação de subprodutos metabólicos que contribuem para o aumento da deterioração (Kodogiannis *et al.*, 2014).

A carne picada apresenta uma deterioração mais precoce que a carne não picada, devido a ter uma elevada área de superfície exposta ao meio ambiente, dependendo a sua taxa de deterioração de alguns fatores como, a composição da carne, as condições de higiene dos utensílios de picagem, durante o corte e o seu armazenamento (Limbo *et al.*, 2010). Esta carne deve estar armazenada a uma temperatura não superior a 2°C por um período máximo de até 6 dias após o abate do animal (Regulamento(CE) Nº 853 do parlamento 2004). Sendo que o que é mais importante no controlo da deterioração desta carne é a contaminação microbiana e o sua multiplicação, por forma a aumentar a sua conservação e segurança do produto (Limbo *et al.*, 2010).

Segundo o Regulamento(CE) Nº 853 do parlamento (2004) a carne fresca é “carne não submetida a qualquer processo de preservação que não a refrigeração, a congelação ou a ultracongelação, incluindo carne embalada em vácuo ou em atmosfera controlada” e a definição

de carne picada corresponde a “carne desossada que foi picada e que contém menos de 1% de sal”.

Na atualidade, apesar das melhorias a nível da higiene no abate de animais e nas técnicas de produção, a segurança alimentar continua a ser um problema importante na saúde pública, dado que 30% da população dos países industrializados sofrem ainda de toxinfecções alimentares, tendo aumentado a notificação das mesmas nas últimas décadas (WHO, 2015). Na carne e derivados, existem microrganismos patogénicos como por exemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 (enterohemorrágica), *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium* spp. e parasitas (*Cryptosporidium* e trematodes), são de elevada importância devido a serem responsáveis por uma morbilidade e mortalidade significativa na população em geral, aumentando a incidência nos grupos de risco, como crianças, idosos e imunocomprometidos (Jayasena e Jo, 2013a; WHO, 2015).

Os surtos de origem alimentar microbiana, realçaram interesse na pesquisa de formas inovadoras para diminuir/ inibir o desenvolvimento de microrganismos nos alimentos, para se manter a qualidade, segurança e frescura da carne, ou seja, aumentando o tempo de vida útil.

A qualidade da carne bovina depende do tipo de genótipo, sexo, peso, idade de abate e da alimentação do animal (Dunne *et al.*, 2009), assim como por fatores externos como o tempo e temperatura de armazenamento (Aït-Kaddour *et al.*, 2011).

Para os consumidores a cor da gordura da carne de bovino é um fator importante para a qualidade, em que este termo qualidade é subjetivo, sendo dependente das regiões, visto que os consumidores da Europa mediterrânea como o caso de Portugal, aferem que uma cor de gordura branca ou pálida a carne apresenta uma qualidade superior (Dunne *et al.*, 2009). Porém, a cor da gordura amarela está associada à alimentação à base de erva ou forragens, devido a acumularem carotenóides no tecido adiposo, podendo considerar-se esta carne mais saudável na perspetiva nutricional, devido aos ácidos gordos e ao teor de antioxidantes presentes (Dunne *et al.*, 2009). Como tal, o consumidor procura não só uma carne de bovino de qualidade, mas também uma variabilidade nas características de qualidade de cada espécie animal, sendo cada vez mais procuradas carnes provenientes de animais alimentados à base de pastoreio tradicional como as raças bovinas DOP (Aït-Kaddour *et al.*, 2011; Dunne *et al.*, 2009).

Uma das formas inovadoras é a aplicação de embalagens com propriedades antimicrobianas, outra a adição de aditivos naturais como por exemplo os óleos essenciais (OE's). Com a utilização destes, pode ocorrer uma redução do consumo de sal, levando a uma

diminuição da incidência de doenças cardiovasculares, bem como uma redução da carga microbiana da carne (Appendini e Hotchkiss, 2002; WHO, 2015).

Este trabalho teve por objetivos efetuar a aplicação de espectroscopia de infravermelhos FTIR para avaliar o tempo de vida útil de hambúrgueres de carne de bovino Maronesa, com a adição de óleos essenciais, embalados em aerobiose e sob vácuo e armazenados a 2 e 8°C.

1.2 Carne de bovino “Maronesa”

A raça Maronesa é uma das 10 raças bovinas Autóctones em Portugal, em que a sua carne é certificada com o selo de garantia da União Europeia no mercado português designado de DOP (Denominação de Origem Protegida). Este termo é usado para descrever alimentos que são produzidos, processados e elaborados numa certa área (Luykx e van Ruth, 2008), ou seja, os produtos que obtenham a certificação com este selo, são produzidos tradicionalmente, isto é neste caso, num sistema extensivo, nomeadamente em regime de pastoreio entre a serra do Marão e Alvão (<http://www.marones.pt/>, 2015; Mateus e Russo-Almeida, 2015).



Figura 1: Fêmea Maronesa (<http://www.marones.pt/>, 2015)

A carne é classificada como de elevada qualidade, dando ênfase às suas características sensoriais, em que exibe um aroma simples e delicado, um “flavor” e uma suculência de qualidade elevada (Mateus e Russo-Almeida, 2015; Saraiva, 2008). Na vitela (abatida com 5-9 meses de idade), a carne apresenta uma cor rosa com alguma gordura distribuída uniformemente e apresentando cor branca; no novilho (abatido com 9-24 meses), a carne tem um cor vermelha clara, em que o músculo de grão finíssimo tem uma consistência firme e humedecido e com alguma gordura intramuscular cor de marfim; na vaca (abatida com 2 a 4 anos de idade), a cor

da carne é vermelha escura tendo abundância em gordura intramuscular de cor de marfim e o músculo tem uma consistência firme e húmido. Assim, aumenta o valor comercial e a sua aceitabilidade no mercado, quer como carne fresca quer como produtos transformados (<http://www.marones.pt/>, 2015; Mateus e Russo-Almeida, 2015). Sendo no entanto, necessário assegurar a rastreabilidade do produto, bem como garantir as condições necessárias ao produto, ou seja, encontrar-se com as suas características de carne fresca sem apresentar deterioração (Mateus e Russo-Almeida, 2015).

1.3 Deterioração da carne fresca

Por definição, a deterioração das carnes, pode ser considerada qualquer alteração que torne o produto inaceitável para consumo humano. Esta alteração pode ocorrer por formação de mucosidade, lesões físicas evidentes, alterações químicas (oxidação e consequente alteração de cor), bem como pelo desenvolvimento da microbiota deteriorativa do alimento que origina odores e sabores desagradáveis (off- flavors), entre outros fatores (Casaburi *et al.*, 2014; Gram *et al.*, 2002; Nychas *et al.*, 2008). Segundo o Regulamento (CE) N.º 178/2002 (2002) um género alimentício é considerado não seguro não apenas porque é prejudicial à saúde do consumidor, mas também se não for próprio para consumo humano.

Para os consumidores, a definição nem sempre é evidente, visto terem como critérios qualitativos para a não aquisição da carne, a ausência de cor avermelhada, presença de odores fortes e desenvolvimento de muco superficial. A deteção da deterioração é processo subjetivo por parte do consumidor, sendo influenciado pela cultura, considerações económicas e avaliação sensorial superficial (Ammor *et al.*, 2009; Nychas *et al.*, 2008).

Na indústria alimentar, quer para os consumidores quer para os comerciantes, existe uma elevada perda de carne (40%) devido à deterioração da mesma (Sun e Holley, 2012).

A deterioração da carne é maioritariamente resultante da atividade metabólica de uma variedade de microrganismos (Sun e Holley, 2012), pela composição diversificada de nutrientes essenciais e perecíveis na natureza, tornando assim suscetível o desenvolvimento de microrganismos deteriorativos e patogénicos (Jayasena e Jo, 2013a; Zhou *et al.*, 2010). A proporção da microbiota presente varia com fatores intrínsecos, nomeadamente pH e a_w e fatores extrínsecos (Jayasena e Jo, 2013a). Todavia, para se poder aferir que a deterioração do alimento é devido a uns microrganismos específicos, tem que existir uma avaliação combinada

de alguns parâmetros microbiológicos, químicos e sensoriais (Gram *et al.*, 2002). A oxidação lipídica da carne durante o seu armazenamento é outro motivo para a rejeição da mesma (Fasseas *et al.*, 2008).

1.4 Tipos de deterioração

1.4.1.1 Deterioração microbiana

A deterioração microbiana pode ser definida como alterações que ocorrem no substrato disponível durante a proliferação de bactérias que estão presentes na carne (Nychas *et al.*, 2008).e desempenha um papel de elevada relevância devido a ser a causa mais comum da deterioração, devido à diversidade da população microbiana envolvida (Casaburi *et al.*, 2014; Gram *et al.*, 2002; Jayasena e Jo, 2013a).

A deterioração microbiológica da carne depende essencialmente da a_w , do tipo de embalagem, composição dos gases do interior da embalagem, temperatura e condições de armazenamento (Nowak *et al.*, 2012).

Apesar dos alimentos estarem em refrigeração, a aplicação de conservantes químicos e aplicações de condições desfavoráveis ao desenvolvimento microbiano, estima-se que cerca de 25% é alterado pós-abate, devido a este tipo de deterioração (Gram *et al.*, 2002).

A deterioração microbiana de uma matriz é atualmente estudada pelos métodos microbiológicos, combinados com métodos físico químicos (pH, a_w e temperatura), variando estes métodos consoante o comportamento da matriz. Existem três tipos de comportamentos com possível interação na matriz, o antagonismo dos microrganismos, o tipo metabolismo, bem como a comunicação entre células (Gram *et al.*, 2002). No entanto, a avaliação do grau de deterioração da carne é realizado de forma subjetiva com base em critérios qualitativos ou demorados, não fornecendo uma resposta imediata (Argyri *et al.*, 2013)

Os principais microrganismos deteriorativos e patogénicos associados à matriz carne fresca encontram-se evidenciados na Tabela 1. Estes podem causar uma deterioração mais rápida (Jayasena e Jo, 2013a), dependendo do potencial de deterioração dos microrganismos, em que este potencial é a capacidade de uma cultura para produzir os metabolitos que estão associados à deterioração de um alimento em particular (Gram *et al.*, 2002).

Tabela 1 : Microrganismos deteriorativos e patogênicos associados à carne fresca e derivados (adaptado(Borch *et al.* (1996); Jayasena and Jo (2013a))

Microrganismo	Gênero/ Espécie
<u>Microrganismos deteriorativos</u>	
Bactéria	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Brochothrix thermosphacta</i> <i>Moraxella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Klebsiella</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Alcaligenes</i>
Leveduras	<i>Candida</i> <i>Torulopsis</i>
Bolores	<i>Rhizopus</i> <i>Mucor</i> <i>Sporotrichum</i> <i>Fusarium</i> <i>Monilia</i> <i>Aspergillus</i>
<u>Microrganismos patogênicos</u>	<i>Salmonella spp.</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Campylobacter spp.</i> <i>Aeromonas hydrophilla</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Mycobacterium spp.</i>

Os microrganismos deteriorativos podem ser divididos em, bactérias Gram positivo (*Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Brochothrix thermosphacta* e *Moraxella*), bactérias Gram negativo (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*) (Sun e Holley, 2012).

1.4.1.2 Deterioração química

Segundo Doulgeraki *et al.* (2012), bem como já mencionado anteriormente, a carne é um alimento muito perecível, devido à sua composição química, favorecendo a deterioração química, microbiológica e sensorial. A deterioração química desenvolve-se devido às alterações bioquímicas que ocorrem na carne dos animais pós-abate (Zór *et al.*, 2012). Essas alterações provocam a oxidação lipídica e a oxidação da mioglobina (Limbo *et al.*, 2010),

A mioglobina evidenciada na Figura 2, é pigmento importante na cor da carne, devido a conter a grupo prostético heme que é responsável pela cor (Maqsood *et al.*, 2012; Suman e Joseph, 2013).

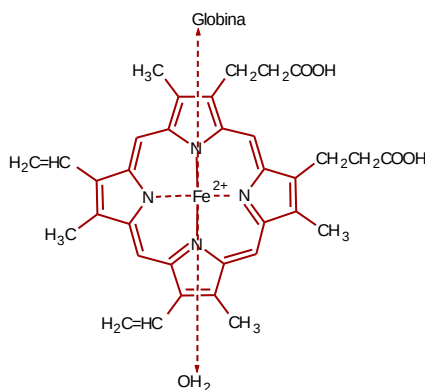


Figura 2: Estrutura da Mioglobina (adaptado (Maqsood *et al.*, 2012).

Vários fatores alteram a oxidação da mioglobina, nomeadamente o pH, a temperatura, a presença de oxigénio e a sua pressão parcial, bem como a oxidação lipídica (Faustman *et al.*, 2010).

A oxidação da mioglobina deve-se à reação do ião ferro (Fe^{2+}) com o oxigénio, formando a oximioglobina, esta com o tempo de armazenamento vai oxidar o ião ferro a férrico (Fe^{3+}) que leva à formação da metamioglobina (Figura 3) (Antoniewski e Barringer, 2010). A temperatura e o pH elevados favorecem a oxidação da mioglobina, por outro lado, uma elevada pressão parcial de oxigénio favorece a formação da metamioglobina (Faustman *et al.*, 2010).

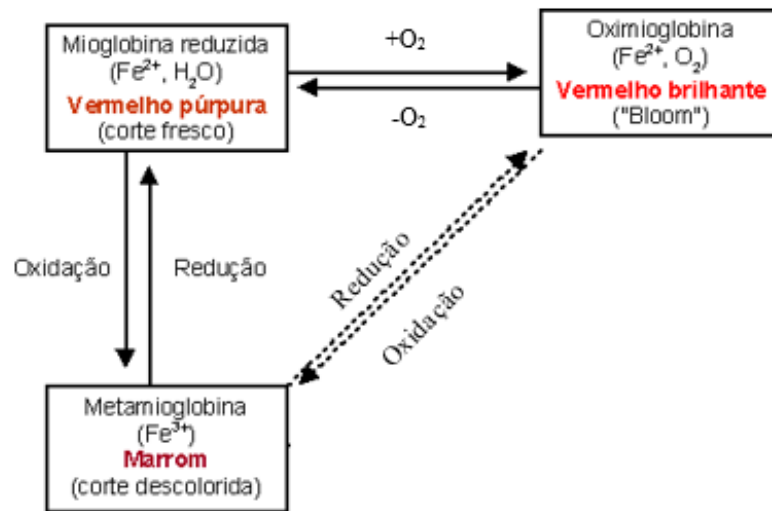


Figura 3: Oxidação da mioglobina adaptado de Suman and Joseph (2013).

Segundo Faustman *et al.* (2010), alterações na oximioglobina estão interligadas com a oxidação lipídica, isto porque, os produtos secundários formados na oxidação lipídica como α , β aldeídos reagem com a oximioglobina, acelerando a formação de metamioglobina.

As reações bioquímicas que estão correlacionadas com a perda de cor, isto é, a oxidação da mioglobina, são hoje em dia revertidas com a adição de antioxidantes (sintéticos e naturais) (Faustman *et al.*, 2010). Como mencionado por Faustman *et al.* (2010), a adição de α -tocoferol e óleos essenciais, devido a conterem propriedades antioxidantes, retardaram a oxidação lipídica na carne de várias espécies de animais.

A deterioração química da carne picada é causada devido à oxidação da mioglobina e consequentemente a oxidação lipídica como já referido, resultando um conjunto de odores desagradáveis, ranço e cor indesejável, a qual ocorre mais precocemente devido a uma maior área de superfície exposta ao ar (Limbo *et al.*, 2010).

1.4.1.2.1 Oxidação lipídica

Por definição, a oxidação lipídica é a classificação geral dada às interações químicas que ocorrem entre as espécies reativas com o oxigênio (ROS) e os ácidos gordos insaturados, podendo existir uma elevada variedade de reações e produtos químicos formados (Kerrihard *et al.*, 2015).

A oxidação lipídica é um fenómeno complexo induzido por oxigénio, na presença de radicais livres, iões metálicos, pigmentos, calor e fotossensibilizantes, desempenhando um

papel importante na saúde humana devido a auxiliar o desenvolvimento de cancro, doença de Alzheimer e Parkinson, entre outras (Dairi *et al.*, 2014). Como tal, tem vindo a desenvolver-se três áreas importantes de investigação sobre a oxidação lipídica que são a peroxidação lipídica, a formação de malonaldeído e a produção de colesterol, ambos provocam as doenças acima mencionadas devido às lesões nas proteínas provocadas pelas ruturas nas membranas celulares (Medina-Meza *et al.*, 2014).

A oxidação lipídica primária é designada por iniciação, seguindo-se a fase secundária (propagação) como ilustrado na tabela 2 que leva à formação de produtos secundários designados de radicais livres. Estes radicais livres reagem com o oxigénio presente (Filgueras *et al.*, 2010), causando modificações indesejáveis a nível sensorial nomeadamente na cor, cheiro e sabor. Estes produtos secundários são quantificados pela determinação de substâncias reativas de ácido tiobarbiturico (TBARS) (Leygonie *et al.*, 2012).

A fase de iniciação começa com a perda de um hidrogénio, formando um radical livre de aquilo ($R^\bullet$) que irá reagir com oxigénio para formar radicais livres designados de radical peróxido ($ROO^\bullet$), este por sua vez irá reagir com o oxigénio de outro lípido instaurado formando um produto primário da auto-oxidação (hidroperóxido $ROOH$) (Medina-Meza *et al.*, 2014). O peróxido formado irá sofrer uma propagação e formar produtos secundários como cetonas e aldeídos, como o caso do malonaldeído, propanal, hexanal entre outros (Faustman *et al.*, 2010), que provocam odores desagradáveis (Suman e Joseph, 2013) a ranço (Calkins e Hodgen, 2007).

Tabela 2: Mecanismo da oxidação lipídica adaptado de Kerrihard *et al.* (2015)

Iniciação	Formação de radicais livres $RH \longrightarrow R^\bullet + H^\bullet$
Propagação	Reações em cadeia com os radicais livres $R^\bullet + {}^3O_2 \longrightarrow ROO^\bullet$ $ROO^\bullet + R'H \longrightarrow ROOH + R'^\bullet$ $RO^\bullet + R'OOH \longrightarrow ROO^\bullet + ROH$ $RO^\bullet + R'H \longrightarrow ROH + R'^\bullet$
Terminação	Formação de produtos sem radicais livres $ROO^\bullet + R'^\bullet \longrightarrow ROOR'$ $R^\bullet + R'^\bullet \longrightarrow RR'$ $RO^\bullet + R'O^\bullet \longrightarrow ROOR'$ $RO^\bullet + R^\bullet \longrightarrow ROR'$

(RH – Ácido gordo insaturado; $R^\bullet$ – Radical livre; $ROO^\bullet$ – Radical peróxido; e $ROOH$ – Hidroperóxido)

A peroxidação lipídica é a auto-oxidação de lípidos (ácidos gordos e esteróides), em que esta auto-oxidação é o principal mecanismo de oxidação das gorduras, formando uma reação de radicais livres com a presença de oxigénio e/ou uma fonte de energia externa como o calor, consistindo nas 3 fases enunciadas na tabela 3 (Medina-Meza *et al.*, 2014).

A oxidação lipídica esta relacionada com a oxidação das proteínas, sendo que provoca alterações na carne pela formação de agregados de proteínas através de ligações intermoleculares covalentes e não covalentes reagindo com o malondialdeído, estando estes fatores relacionados com fatores pró-oxidativos, como radicais livres, pigmentos heme, oxidação lipídica e oxidação enzimática (Leygonie *et al.*, 2012).

O malondialdeído (MDA) é um dos produtos mais importantes da oxidação lipídica, devido à sua capacidade de ligação cruzada com grupos amina das proteínas, enzimas e ADN, para a sua quantificação utiliza-se o método de TBARS com o ácido tiobarbiturico formando uma cor rosa quando submetido a uma determinada temperatura e um determinado tempo (Medina-Meza *et al.*, 2014).

Segundo Calkins and Hodgen (2007), o grau de oxidação da carne depende da sua composição lipídica em ácidos gordos insaturados e fosfolípidos (quanto maior esta composição maior será a oxidação), bem como depende da composição proteica, concentração do oxigénio presente, quantidade de enzimas, teores de vitaminas antioxidantes (vitamina E), à quantidade de água livre presente, à presença de iões metálicos (Fe^{2+}) e à presença de aditivos (sais). A oxidação lipídica da carne aumenta com o aumento do ferro na mioglobina (Faustman *et al.*, 2010).

A oxidação lipídica é um fator importante para a determinação da vida útil e aceitação da carne fresca pelo consumidor (Bingol e Ergun, 2011), e está associada à perda de qualidade da carne (Maqsood *et al.*, 2012). Grande parte da produção de off-flavors e perda de cor da superfície da carne (Faustman *et al.*, 2010; Filgueras *et al.*, 2010) está associada à oxidação lipídica. A perda de cor da carne ocorre pela oxidação do pigmento de oximioglobina (cor vermelha brilhante) a metamioglobina (cor castanha) (Faustman *et al.*, 2010),

Na carne picada, a oxidação lipídica é superior ao observado para porções de carne, devido ao processo de picagem incorporar oxigénio, aumentando assim a área de superfície em contacto com o oxigénio, diminuindo a vida útil desta carne (Esmer *et al.*, 2011; Faustman *et al.*, 2010).

São utilizadas varias estratégias para diminuir a oxidação lipídica, com a redução da incidência de fatores que a auxiliam, ou seja, reduzindo o teor de oxigénio e de iões metálicos

presentes na matriz, bem como facultando níveis de energia mínimos (baixas temperaturas e pouca luminosidade) (Kerrihard *et al.*, 2015). Uma das estratégias utilizadas consiste na adição de antioxidantes sintéticos como o caso do BHT (butil-hidroxitolueno) que era utilizado industrialmente, no entanto têm propriedades carcinogénicas sendo assim substituídos por antioxidantes naturais como OE de plantas aromáticas (orégãos, alecrim, sálvia, entre outros) (Huang *et al.*, 2011).

1.4.1.3 Alterações sensoriais

Segundo Faustman *et al.* (2010), as propriedades sensoriais da carne contribuem significativamente para o valor e qualidade da mesma, realçando que a cor é a propriedade mais importante, visto que, a perda da cor característica da carne leva a uma aparência não apelativa. (Faustman *et al.*, 2010).

O consumidor considera a cor da carne um sinónimo de qualidade, principalmente a carne vermelha fresca, devido a indicar a frescura e salubridade da mesma (Troy e Kerry, 2010).

A textura da carne também é um fator importante para o consumidor (Calkins e Hodgen, 2007).

Vários fatores intrínsecos interferem com a cor da carne, como o pH o tecido muscular do animal e a atividade mitocóndria, bem como a genética e a dieta do animal (Suman e Joseph, 2013).No entanto, existem outros inúmeros fatores extrínsecos que têm uma influência negativa na textura, cor, sabor e cheiro da carne, como a temperatura, quantidade presente de oxigénio e a humidade(Zhou *et al.*, 2010).

Durante a oxidação lipídica, em que contribui para a deterioração sensorial da carne (Filgueras *et al.*, 2010), são produzidos composto como hexanal, que contribui para o sabor e aroma da carne, entre outros como evidenciados na tabela 3 (Calkins e Hodgen, 2007).

Tabela 3: Compostos característicos da carne adaptado de (Calkins e Hodgen, 2007)

Nome do composto	Característica dos aromas e sabores
Benzaldeído	Óleo de amêndoa, amêndoa amarga, a queimado
Benzeno	Aroma agradável e distinto
Butamina-sec	Frutos do mar, cebola, verde
Butanal	Verde, assado e maltado
3- Careno	Doce e odor picante (agradável)
Cilcobutanol	Assado
2,2,6 Trimetilhexano	Hortelã e acetona
2,4-Decadienal	Sabor a gordura, a laranja, a frango
Decanal	Aldeído ceroso, laranja, casca de frutos cítricos
2- Decanal	Sebo, laranja
1,3-Bis(1,1-dimethylethyl) benzeno	Carne cozida
5-Ethylcyclopent-1-enecarboxaldehydo	Perfume
N,N-Dimethyl 1,2-ethanediamina	Amônia
2-Pentilfurano	Manteiga
2,4-Heptadienal	Gordura
Heptanal	Óleo, ranço
1-Heptanol	Perfume, erva verde
2-Heptanona	Canela, picante, frutado
6-Metil-2-heptanona	Mentol
Hexanal	Gordura
Hexano	Gordura podre
Hexanol	Madeira, frutado, erva cortada
2-Etil-hexanol	Resina, flor verde
2-Hexanol	Banana verde
Limoneno	Citrino, frutado, limão
3-Metilbutanal	Maça
Metilsalicato	Frio
2,4-Nomadienal	Gordura, gramíneo, picante
Nonanal	Floral, frutado, gramíneo
2-Nonanona	Sabão, floral verde
2-Nonenal	Pepino, lírio, papel, gordura
Octadecanal	Óleo
Octanal	Adstringente, casca de laranja, limão
1-Octanal	Citrino, noz, musgo, gordura
3-Metil-3-octanona	Erva, manteiga, resina, gasolina
2-Octanal	Verde, gordura, suínos
(Z)-3-Octeno	Frutado, maçãs ultra maturadas
1-Octan-3-ol	Cogumelos, composto excretado de insectos
2-Octen-1-ol	Citrino verde
3- Octen-2-ona	Noz, terra, feno, cogumelo
Pentanal	Amargo, picante, amêndoa amarga
Pentano	Sabor a aquecido, oxidado
1-Pentanal	Óleo de linhaça, frutos
α -pineno	Pinheiro, frutado, citrino
β -pineno	Pinheiro, frutado, citrino, resina
Pipenazina	Salgado
Propanol	Álcool
Estireno	Odor intenso e penetrante
2-Tridecenal	Doce, picante
Undec-4-enal	Feromonas de animais

As bactérias são normalmente as principais responsáveis pela diminuição da qualidade da carne, devido à descoloração e viscosidade superficial, ao off-flavor causado por reações (bio) químicas por consequência da degradação das proteínas da carne e do aumento significativo do pH, assim como às alterações na textura (Jayasena e Jo, 2013a), levando a que a primeira avaliação esteja relacionada com a avaliação sensorial. Para além disso, a carne pode ter um elevado número de bactérias e não ser considerado inaceitável a nível sensorial, no entanto, um elevado número de microrganismos (7 a 8 log ufc/g) permite estabelecer por si só a vida útil (Gram *et al.*, 2002; Jayasena e Jo, 2013a).

Segundo Leygonie *et al.* (2012), o tempo de vida útil da carne depende da aparência, sabor, cor e textura, no entanto numa análise sensorial, o sabor é a característica mais difícil de determinar ou quantificar. Sendo possível quantificar a qualidade e frescura da carne através da relação existente entre o desenvolvimento da microbiota e as alterações químicas que ocorrem durante o seu armazenamento (Argyri *et al.*, 2011), por métodos quimiométricos como PCA (análise em componentes principais) (Aït-Kaddour *et al.*, 2011).

1.4.2 Fatores envolvidos na deterioração

A qualidade da carne depende do estado fisiológico, da disseminação antes, durante e após o abate, bem como da carga microbiana inicial, dependendo a qualidade microbiológica não só das condições mencionadas anteriormente, mas também da temperatura de armazenamento e distribuição (Nychas *et al.*, 2008), podendo a deterioração da carne resultar de vários fatores intrínsecos e extrínsecos (Ammor *et al.*, 2009).

1.4.2.1 Fatores extrínsecos

1.4.2.1.1 Temperatura

A temperatura é dos principais fatores que afeta a deterioração da carne, pelo que a monitorização da temperatura é um pré-requisito no controlo da cadeia alimentar, quer no armazenamento quer na distribuição (Nychas *et al.*, 2008; Sun e Holley, 2012). Segundo o descrito no Regulamento(CE) Nº 853 do parlamento (2004), tem que se manter a carne a uma temperatura de 7°C, as miudezas a uma temperatura de 3°C e a carne picada a 2°C, desde a desmancha até ao armazenamento.

A aplicação de diferentes temperaturas de armazenamento da carne leva a que haja multiplicação de diferentes microrganismos, podendo afetar a *fase lag* (fase da adaptação metabólica), fase exponencial e a fase estacionária dos mesmos (Doulgeraki *et al.*, 2012).

Quando a carne é submetida a baixas temperaturas, ou seja, a temperaturas de refrigeração que são inferiores ao intervalo ótimo do desenvolvimento microbiano, irá retardar o crescimento de microrganismos, levando a um aumento de tempo de vida útil (Sun e Holley, 2012; Zhou *et al.*, 2010). Contudo, quando submetida a carne a temperatura de refrigeração, também ocorre um desenvolvimento de microrganismos psicrótróficos (Jay *et al.*, 2005).

Segundo a investigação de Argyri *et al.* (2011), o prazo de validade da carne de bovino picada diminui com o aumento da temperatura de armazenamento. As temperaturas elevadas de armazenamento também aceleram a oxidação lipídica da carne (Liu *et al.*, 2012).

1.4.2.2 Fatores intrínsecos

1.4.2.2.1 pH

O pH é um fator determinante na qualidade da carne, visto que alterações no pH provocam alterações no desenvolvimento dos microrganismos e consequentemente a sua deterioração. Quando o animal esteve no repouso adequado antes da sua morte, 1% de glicogénio existente no músculo do animal, é convertido em ácido láctico e, consequentemente, diminuindo o pH da carne após o *rigor mortis* de valores de 7,4 para 5,6 no caso da carne de bovino (Jay *et al.*, 2005).

O pH elevado pode ser provocado, pelos efeitos do stress térmico que causam a redução do glicogénio muscular, sendo esta a principal fonte de energia para o metabolismo, em que este stress é provocado por temperaturas superiores a 35 °C (Kadim *et al.*, 2008). Um pH *post mortem* elevado é um fator importante na deterioração da carne, acompanhado por uma elevada capacidade de retenção de água, escurecimento da cor, textura pegajosa, força de corte diminuída (Kadim *et al.*, 2008).

O pH da carne afecta a cinética do desenvolvimento de microrganismos como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., BAL e *B. thermosphacta*, devido ao facto de pequenas diferenças no pH poderem evidenciar diferenças significativas na concentração de lactato, aumentando assim a multiplicação de *Pseudomonas* spp. devido à sua atividade proteolítica. No entanto, a diminuição do pH pode ser provocada pela cinética de crescimento das BAL (Argyri *et al.*, 2011).

Quando a carne atinge um pH ótimo para os microrganismos (pH entre 6,6 a 7,5 no caso dos deteriorativos) (Jay *et al.*, 2005). Todavia, é possível a multiplicação dos microrganismos acima e abaixo do pH ótimo, provocando um aumento da fase de *lag*, sendo esta fase maior ou menor consoante o tempo necessário para repor os valores de pH ótimos para o crescimento dos microrganismos (Jay *et al.*, 2005).

Segundo o estudo de Argyri *et al.* (2011), a carne de bovino picada embalada em aerobiose e em MAP com e sem óleo essencial de orégãos, quando colocada em armazenamento (0°C e 5°C) apresentava um pH dentro da normalidade da carne fresca, no entanto, em aerobiose obteve-se um aumento do pH consoante o tempo de armazenamento, porém em MAP com e sem óleo observou-se uma diminuição do pH com o aumento do tempo de armazenamento.

1.4.2.2.2 Atividade da água

A atividade da água (a_w) é a razão entre a pressão de vapor de água do substrato do alimento e a pressão de vapor de pura à mesma temperatura (Jay *et al.*, 2005). Sendo um fator importante para a vida útil do alimento, devido a poder auxiliar na inibição ou na multiplicação dos microrganismos, quer deteriorativos quer patogénicos (Liu *et al.*, 2014). A a_w é influenciada por alguns fatores como o pH, o potencial oxidação redução e a temperatura (Jay *et al.*, 2005).

Há uma elevada perda da a_w na carne, devido à diminuição do pH *post mortem* e à perda de adenosina trifosfato (Yudthavorasit *et al.*, 2014) (Leygonie *et al.*, 2012). A carne apresenta uma a_w entre 0,95 a 0,98, sendo uma a_w ótima para a deterioração da carne visto que, as bactérias necessitam de valores de a_w mais elevados que os bolores, isto é, as bactérias deteriorativas não crescem em valores de a_w inferiores a 0,91, nem os bolores em valores inferiores a 0,80 (Jay *et al.*, 2005).

Quando há uma redução da a_w para valores inferiores aos ótimos, há uma *fase lag* maior e, por sua vez, uma fase exponencial e uma fase estacionária menores (Jay *et al.*, 2005). No entanto, existe maior crescimento de microrganismos quando a matriz tem a temperatura ótima para a sua multiplicação (Jay *et al.*, 2005).

1.5 Microbiota da carne

A microbiota da carne tem vindo a ser amplamente estudada, nomeadamente o estudo da fisiologia bacteriana, devido a poder efetuar-se a caracterização da microbiota envolvida na deterioração. Várias espécies podem estar associadas à deterioração (Doulgeraki *et al.*, 2012), referindo-se géneros de microrganismos presentes inicialmente na carne como *Acinetobacter*,

Pseudomonas, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, bactérias do ácido lático, e diferentes gêneros da família de *Enterobacteriaceae* (Doulgeraki *et al.*, 2012).

Alguns dos microrganismos presentes na carne, são provenientes do trato intestinal e do ambiente antes durante e após o abate, tendo sido tal comprovado por estudos onde se encontrou uma relação entre *Enterobacteriaceae* das superfícies onde se realiza o abate e processamento da carne (carne picada) e as encontradas nas carcaças (Nychas *et al.*, 2008).

No entanto, todos os microrganismos mencionados têm características diferentes, como tal, a sobrevivência e desenvolvimento dos mesmos pode ser afetada em função de fatores como a temperatura, presença ou ausência de oxigênio e dióxido de carbono e pH (Doulgeraki *et al.*, 2012).

A qualidade global da carne, quando armazenados a temperaturas de refrigeração ou até em congelção, é afetada pelo efeito da bactéria deteriorativa *Brochothrix thermosphacta*, sendo uma das dominantes juntamente com *Pseudomonas* spp, BAL e *Enterobacteriaceae* (Casaburi *et al.*, 2014).

1.5.1 Principal Microbiota da Carne

1.5.1.1 Bactérias do ácido lático

As bactérias do ácido lático são amplamente encontradas em carne fresca armazenada em refrigeração, nomeadamente os gêneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (Nieminen *et al.*, 2011). Possuem forma de bacilos ou de cocos, sendo bactérias Gram positivos anaeróbias aerotolerantes sem formação de esporos, catalase negativa, e um pH ótimo de crescimento entre valores de 4,0 a 4,5 e uma temperatura ótima de crescimento 30°C (mesófilos) ou 42°C (termófilos) (Sabo *et al.*, 2014).

As bactérias do ácido lático têm a capacidade de acidificar os alimentos pela formação de ácido lático, reduzindo o pH para valores próximos de 4, sendo este ácido responsável pela redução dos microrganismos deteriorativos e patogênicos que sejam sensíveis ao meio ácido, aumentando a vida útil do produto (Sabo *et al.*, 2014).

1.5.1.2 *Brochothrix thermosphacta*

O gênero *Brochothrix* está dividido em duas espécies *Brochothrix thermosphacta* e *Brochothrix campestris* (Casaburi *et al.*, 2014). Este gênero têm como características, serem

bactérias ubiqüitárias, Gram positivo, oxidase negativas, não móveis, nem formadoras de esporos, homofermentativas e anaeróbias facultativas, apresentando-se em cadeias filamentosas curtas ou longas (Casaburi *et al.*, 2014). São capazes de se multiplicar com uma concentração de 10% de cloreto de sódio (sal) e em temperaturas de refrigeração, (Gribble e Brightwell, 2013); o seu pH ótimo de crescimento varia entre valores de 5,0 a 9,0, e a sua temperatura ótima de crescimento é entre 0°C a 30°C (Nowak *et al.*, 2012)

Brochothrix thermosphacta foi isolado pela primeira vez em carne de porco, sendo hoje em dia encontrado em todos os tipos de carnes e seus derivados, bem como em frutos do mar (Casaburi *et al.*, 2014). Está associada à deterioração da carne fresca, visto estar adaptada a crescer em carne, quer em condições de aerobiose quer em condições de anaerobiose, armazenada em refrigeração, pelas suas propriedades bioquímicas que se adaptam aos diferentes padrões de crescimento (Casaburi *et al.*, 2014; Doulgeraki *et al.*, 2012). É considerada uma bactéria de elevada importância na deterioração da carne, apresentando odores a deterioração após os primeiros dias de armazenamento, com perda de cor e off-flavors desagradáveis (Casaburi *et al.*, 2014). Por vezes pode ser a bactéria dominante, sendo encontrada quem em embalagens de aerobiose, vácuo ou MAP (Doulgeraki *et al.*, 2012). Segundo Casaburi *et al.* (2014), a diferenciação do odor causado por esta bactéria em relação a uma amostra não inoculada, foi determinada a concentrações bacterianas de 10^8 UFC/g.

O substrato preferencial de crescimento é a glucose, contudo, é capaz de fermentar outros açúcares como a ribose, frutose e maltose, mostrando a capacidade de ativar vias metabólicas para degradar os açúcares (Casaburi *et al.*, 2014).

1.5.1.3 *Pseudomonas* spp.

São microrganismos ubiqüitários e pertencem à sub classe do *Proteobacteria*, sendo amplamente distribuídas em alimentos frescos como a carne, legumes e frutos do mar (Jay *et al.*, 2005).

Pseudomonas spp. são bacilos Gram negativos aeróbios que apresentam flagelos com mobilidade, oxidase e catalase positivas e são sensíveis ao pH e à a_w e não se desenvolvem a pH inferior a 4,5 e a a_w inferior a 0,97 (Jay *et al.*, 2005).

São predominantes em carne frescas vermelhas e em carnes de aves, em aerobiose, produzindo odores desagradáveis devido ao metabolismo dos aminoácidos e da atividade proteolítica das proteínas (Esmer *et al.*, 2011).

Pseudomonas spp. isoladas da carne fresca deteriorada em aerobiose e sob temperaturas de refrigeração estabelecidas pelos regulamentos para avaliação de carne, são *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. lundensis* e *P. putida*, sendo referido que *P. fluorescens* tem uma abundância superior no início do armazenamento da carne fresca que a psicotrófica *P. fragi*, a qual com o aumento do tempo de armazenamento vai se tornando mais abundante, levando a que seja relevante na deterioração da carne fresca, como tal, esta aparece em condições de aerobiose e anaerobiose enquanto que as outras espécies de *Pseudomonas* desenvolvem-se maioritariamente em aerobiose (Doulgeraki *et al.*, 2012).

1.5.1.4 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é uma família de bactérias Gram negativos e são abundantes em ambientes húmidos, como por exemplo em superfícies de matadouros, sendo muito comum a sua presença na carne fresca (Doulgeraki *et al.*, 2011).

Esta família tem géneros patogénicos muito importantes como *Salmonella*, *E.coli* O157:H7 e géneros deteriorativos (Doulgeraki *et al.*, 2011). Segundo Doulgeraki *et al.* (2011), os géneros de maior importância na deterioração da carne de bovino são *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Proteus* e *Hafnia*, tendo sido isolado *Citrobacter freundii* e *Proteus vulgaris* na carne picada de bovino (Doulgeraki *et al.*, 2012). Estes géneros na sua natureza psicotrófica são ambíguos (Doulgeraki *et al.*, 2011).

S. liquefaciens membro da família *Enterobacteriaceae* é o mais abundante quando a carnes está sob condições de MAP e pode ser considerado um indicador de higiene, enquanto que sob condições de vácuo (anaerobiose) o membro mais comum nas carnes de suíno e bovino é *Hafnia alvei* por não ser adaptável na presença de oxigénio mas é psicrotolerante, ambos os membros mencionados são amplamente detetados em carne picada de bovino (Doulgeraki *et al.*, 2011).

1.5.1.5 *Fungos*

Os fungos (bolores e leveduras) são encontrados em vários produtos alimentares, bem como na natureza ambiente (água, solo, plantas). Assim, a contaminação da carne e produtos cárneos pode ocorrer através da contaminação do ar, equipamentos, água, ingredientes e pelo contacto humano, podendo provocar lesões graves, devido a serem capazes de produzir metabolitos secundários tóxicos como as micotoxinas que são uma ameaça à saúde humana (Tournas *et al.*, 2011).

Os fungos são representativos de um conjunto de organismos deteriorativos e oportunistas nas carnes e produtos de carnes, têm como característica de metabolismo ser lento (Tournas *et al.*, 2011), necessitam de oxigênio, visto que são aeróbios, no entanto possuem uma característica de anaerobiose facultativa, crescem num intervalo de pH mais extenso que as bactérias, sendo o seu pH ótimo de 6,5 (Jay *et al.*, 2005).

Os bolores são fungos filamentosos que se desenvolvem em matéria orgânica, crescem sob uma forma de algodão e têm, uma rápida propagação (2-3 dias) e uma elevada resistência ao calor quando são esporulados. Não se reproduzem com valores da a_w inferiores a 0,80, no entanto reproduzem num amplo intervalo de pH entre valores de 1,5 a 11. Os bolores mais comuns na deterioração da carne de bovino fresca são o *Rhizopus*, *Mucor* e o *Aspergillus*, originando mucos na carne (Jay *et al.*, 2005).

As leveduras possuem uma forma redonda ou alongada mas cremosa com cores creme, rosa ou vermelhas, possuem um crescimento e uma reprodução mais rápida que a dos bolores, no entanto não crescem a valores da a_w inferiores a 0,88, mas crescem num amplo intervalo de valores de pH de 2,5 a 8,5. Apresentam ainda uma capacidade de crescimento em carne embalada a vácuo, visto que estas crescem em ambientes anaeróbios (baixa concentração de oxigênio), sendo as leveduras mais encontradas em carne de bovino as do género *Candida* (Jay *et al.*, 2005).

1.5.1.6 Mesófilos

São considerados mesófilos, todos os microrganismos que crescem entre temperaturas 20°C a 45°C, sendo a sua temperatura ótima de crescimento entre 30°C a 40°C (Jay *et al.*, 2005).

1.5.1.7 Psicrótróficos

Psicrótróficos são os microrganismos que crescem entre temperaturas de 0°C a 7°C, produzindo colónias visíveis entre 7 a 10 dias de incubação, sendo estas condições mais favoráveis aos microrganismos Gram-negativos do que aos Gram-positivos (Jay *et al.*, 2005). Os microrganismos psicrótróficos crescem à temperatura de refrigeração em carnes frescas, ovos, peixes, entre outros alimentos, no entanto, são incapazes de crescer a temperaturas superiores a 30°C (Jay *et al.*, 2005).

1.6 Estratégias de aumento de vida útil de carnes frescas

A vida útil de um produto é definido como o período de tempo desde o embalagem até que as propriedades do produto permaneçam aceitáveis para utilização do consumidor (Lorenzo e Gómez, 2012).

A vida útil e a qualidade da carne fresca são influenciadas pelas características iniciais da carne, as condições e técnicas de armazenamento. A vida útil é dependente de fatores importantes como a aparência, cor, sabor, textura, a oxidação lipídica e o desenvolvimento microbiano (Gómez e Lorenzo, 2012).

Na indústria alimentar, havia uma elevada perda devido à deterioração da carne fresca, pelo que ao longo dos anos foram sendo desenvolvidas técnicas adequadas para aumentar a vida útil e garantir a qualidade e segurança da carne fresca (Sun e Holley, 2012; Zhou *et al.*, 2010). As técnicas utilizadas são para retardar a deterioração microbiana, a oxidação lipídica e, conseqüentemente, as alterações sensoriais (Zhou *et al.*, 2010).

As técnicas de preservação mais utilizadas têm sido a aplicação de embalagens em aerobiose, sob vácuo e embalagem de atmosfera modificada e a utilização de compostos antimicrobianos e antioxidantes (os óleos essenciais, lisozima, nisina e quitosana). Vários autores referem que a adição de produtos químicos tem efeitos potencialmente cancerígenos e tóxicos, enquanto que a utilização de compostos naturais, em substituição da adição de compostos sintéticos, é benéfica para a saúde, devido à redução de radicais livres e do ponto de vista de segurança alimentar (Hayes *et al.*, 2010; Jayasena e Jo, 2013a; Sun e Holley, 2012; Zhou *et al.*, 2010).

Contudo, estes métodos são complementares ao método mais utilizado, a refrigeração (Jayasena e Jo, 2013a).

1.6.1 Aplicação de embalagens

A embalagem tem um papel muito importante para aumentar a vida útil do produto, retardando a degradação da qualidade e salvaguardando a segurança alimentar (Gómez e Lorenzo, 2012). Assim, apresenta um efeito benéfico para a carne, reduzindo a perda de cor, o desenvolvimento de cheiro e sabor desagradável, alterações na textura, a perda de nutrientes e o crescimento de microrganismos (Zhou *et al.*, 2010). No entanto, a vida útil da carne fresca embalada, é influenciada por fatores como, o tipo de plástico (filme), a temperatura de armazenamento e os aditivos utilizados (Zhou *et al.*, 2010). De salientar que a sobrevivência

dos microrganismos é seriamente influenciada pela composição do ambiente gasoso envolvente da carne, como evidenciado na Tabela 4 (Doulgeraki *et al.*, 2012).

Tabela 4: Exemplos de espécies de microrganismos que ocorrem durante o armazenamento da carne crua em diferentes condições adaptado de Doulgeraki *et al.* (2012).

Microbiota	Condições de armazenamento		
	Aerobiose	MAP	Vácuo
<i>Aeromonas</i> spp.	+	-	+
<i>Acinetobacter</i> spp.	+	+	+
<i>B. thermosphacta</i>	+	+	+
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	+
<i>Listeria</i>	+	+	-
<i>Moraxella</i> spp.	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	+	-	+
<i>Yersinia</i> spp.	+	-	+

(+ existem crescimento e – não existe crescimento)

No armazenamento das carnes frescas em refrigeração, as embalagens são apenas impermeáveis à humidade, variando o tipo de filme usado para os diversos gases (Zhou *et al.*, 2010). Assim, podemos classificar as embalagens em três tipos, a embalagem em aerobiose (permeável ao O₂), a embalagem com atmosfera modificada e a embalagem a vácuo (Gómez e Lorenzo, 2012; Zhou *et al.*, 2010).

A embalagem a vácuo ou a embalagem de atmosfera modificada têm uma eficácia elevada no aumento de vida de prateleira da carne fresca, visto que ambas sofrem uma modificação da atmosfera que é propícia à redução do desenvolvimento de microrganismos, diminuindo a concentração de oxigénio presente e aumentando a concentração de dióxido de carbono (Sun e Holley, 2012).

A aplicação da embalagem protege a deterioração rápida dos produtos. Segundo o estudo elaborado por Nerin *et al.* (2006) em bifes de carne de bovino, relatando-se da incorporação de extrato de alecrim incorporado na película de poliprolino (constituente da embalagem ativa), este extrato aumenta a estabilidade da mioglobina pela inibição da oxidação dos lípidos e consequentemente da formação de metamioglobina.

1.6.1.1 Embalagem a vácuo

Para que a embalagem a vácuo tenha uma excelente impermeabilidade ao oxigénio tem que ser constituída por um filme que possua três camadas, acetato de etilo de vinilo nas camadas externas e cloreto de polivinilideno no interior (Zhou *et al.*, 2010).

Apresenta uma boa eficácia na carne devido à inexistência de oxigénio (O₂), induzindo a uma redução de reações de oxidação e da deterioração (Zhou *et al.*, 2010), visto que, reduz a multiplicação de bactérias aeróbias, inibindo assim *Pseudomonas* spp., causando uma mudança no processo deteriorativos para multiplicação de bactérias do ácido láctico (Kadim *et al.*) e *Enterobacteriaceae* e por vezes *B. thermosphacta*. Porém, outros microrganismos podem causar a deterioração da carne nesta embalagem, como *Clostridium* spp. e *Sh. putrefaciens*, o último tendo um crescimento superior em pH mais elevado (Gram *et al.*, 2002). Segundo Nychas *et al.* (2008), as bactérias associadas à deterioração da carne embalada a vácuo e armazenadas a uma temperatura entre 0-4°C, são *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, *Sh. putrefaciens*.

Nesta embalagem, os microrganismos associados à deterioração são os anaeróbios facultativos como *B. thermosphacta*, BAL e *Clostridium* spp. e deve-se em especial ao crescimento de *Enterobacteriaceae* (Doulgeraki *et al.*, 2012).

1.6.1.2 Embalagem de atmosfera modificada

A embalagem de atmosfera modificada é um dos métodos com maior eficácia no aumento da vida útil de carne fresca, pela redução da deterioração da carne, tendo em conta a estabilidade da cor e da oxidação (Esmer *et al.*, 2011; Limbo *et al.*, 2010), sendo amplamente utilizado na indústria alimentar, baseando-se esta eficácia na atividade antimicrobiana apresentada pelo CO₂ e pela mudança provocada na microbiota deteriorativa (Limbo *et al.*, 2010).

A embalagem de atmosfera modificada (MAP) recomendada para a carne, tem que ser impermeável à humidade e ao gás, com a finalidade do ambiente da embalagem permanecer constante (Zhou *et al.*, 2010). Há no entanto, a MAP com elevado teor de O₂ e a MAP com baixo teor de O₂, sendo que, a primeira embalagem mencionada (elevado teor de oxigénio) é a mais usual com um teor de O₂ de 70-80% para estimular a oxidação da mioglobina, originando assim uma cor vermelha mais atrativa ao consumidor. Também possibilita a inibição do crescimento dos microrganismos anaeróbios e beneficia a multiplicação de microrganismos aeróbios (Limbo *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010).

Os principais gases inseridos na embalagem são, azoto, dióxido de carbono, oxigénio e árgon, podendo ainda se considerar a adição de pequenas quantidades de monóxido de carbono (não permitido legalmente), visto ser o importante para a manutenção de uma carne vermelha brilhante (Zhou *et al.*, 2010). O azoto é o gás em maior quantidade, visto que, é um gás inerte que não é absorvido pela carne nem reage com os pigmentos da mesma, mantendo-se na íntegra a percentagem inicial induzida, porém, o dióxido de carbono reage com a carne, alterando as propriedades da carne e da embalagem (Zhou *et al.*, 2010). Como referido anteriormente, inibe o crescimento microbiano quando incorporado a 20-30%, sendo que se se adicionar a níveis de CO₂ inferiores a 15% não inibe o crescimento dos microrganismos de um modo satisfatório; quando é adiciona a níveis de CO₂ superiores a 40% ocorre um colapso na embalagem devido a este ser absorvido pela carne (Lorenzo e Gómez, 2012).

É de extrema importância a temperatura de armazenamento das carnes embaladas em MAP, pois quando são colocadas a temperaturas mais elevadas que o sugerido (2°C), não só existe um crescimento dos microrganismos, como também há um aumento das reações químicas e uma mudança na atmosfera da embalagem, contribuindo estas alterações para uma deterioração antes do prazo de validade ter terminado (Limbo *et al.*, 2010).

Nas carnes cruas embaladas por esta técnica, durante armazenamento em refrigeração, têm como bactérias predominantes na matriz microrganismos anaeróbios facultativos, as BAL (Rahkila *et al.*, 2012) e *Brochothrix thermosphacta*, devido à sua capacidade de crescer em temperaturas baixas e numa atmosfera rica em CO₂ (Doulgeraki *et al.*, 2012; Nieminen *et al.*, 2011).

O estudo de Argyri *et al.* (2011), demonstrou que a carne de bovino picada quando embalada em MAP com OE de orégão aumentou a vida útil, bem como lhe conferiu um aroma e cor vermelha agradável comparando com a carne embalada em MAP sem OE e embalada em aerobiose.

1.6.1.3 Embalagem de aerobiose

As embalagens de aerobiose são muito utilizadas, devido a ter uma excelente permeabilidade ao O₂ e da humidade, controlando o cheiro, sabor e cor da carne, ou seja, servem para melhorar a proteção do alimento e aumentar a sua vida útil (Zhou *et al.*, 2010).

Na carne fresca embalada em aerobiose, as bactérias aeróbias são as predominantes na matriz, ou seja, *Pseudomonas* spp., consumindo a glicose disponível nos tecidos (Sun e Holley, 2012). Quando estas embalagens são submetidas a temperaturas de refrigeração baixas leva a

um desenvolvimento de *Pseudomonas*; quando submetidas a temperatura de refrigeração mais elevada leva a um desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* (Doulgeraki *et al.*, 2012)

Podemos ainda referir a embalagem antimicrobiana, que tem como finalidade reduzir o crescimento dos microrganismos por ser constituída por compostos antimicrobianos (Zhou *et al.*, 2010). Zhou *et al.* (2010), menciona um estudo efetuado com nisina em meio de cultura com alimentos líquidos, em que apresentou efeito em microrganismos patogénicos, *L.monocytogenes*, *Escherichia Coli* O₁₅₇:H₇ e *Salmonella Enteritidis*. Esta técnica é apelativa para as indústrias, devido à sua simplicidade e eficácia, porém, tem como desvantagem, os valores de migração de compostos ativos necessitarem de ser termostáveis para que haja um cumprimento dos limites de resíduos máximos em alimentos, impostos pela legislação.

1.6.2 Adição de óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE's) são considerados aditivos naturais, devido a serem obtidos a partir de plantas aromáticas e medicinais (Jayasena e Jo, 2013a), localizadas em clima temperado como é o caso dos países mediterrânicos.

Podem ser extraídos da planta completa incluindo folhas, flores, raízes e sementes (Bakkali *et al.*, 2008; Jayasena e Jo, 2013a). Pode existir uma variabilidade na composição dos OE's extraídos, na qualidade e na quantidade, devido a fatores como o clima, a idade da planta, a fase do ciclo da planta, o órgão utilizado da planta e a composição do solo, sendo de extrema relevância a obtenção da menor variabilidade possível destes fatores (Bakkali *et al.*, 2008).

A forma de extração mais comum dos OE's é realizada pelo método de hidrodestilação (Bakkali *et al.*, 2008).

Os OE's são compostos orgânicos de baixo peso molecular, muito complexos na sua constituição devido a conterem cerca de 20 a 60 compostos com concentrações diferentes entre óleos essenciais. Existem três grandes grupos de compostos principais em concentrações elevadas (20 a 70%) como é o caso dos terpenos, terpenóides e compostos aromáticos como se ilustra na Figura 12 no Anexo I (Bakkali *et al.*, 2008).

Os compostos dos OE's que apresentam atividade antimicrobiana são os terpenóides e os fenilpropanóides e os que apresentam atividade antioxidante são os compostos fenólicos (Hyldgaard *et al.*, 2012). Os OE's são uma alternativa interessante para diminuir a microbiota da carne, devido às características antioxidantes e antimicrobianas (Jayasena e Jo, 2013a), bem

como ao facto de serem antissépticos devido às propriedades medicinais, fungicidas, bactericidas e antivíricas (Bakkali *et al.*, 2008).

Segundo Doulgeraki *et al.* (2012), a aplicação de OE's reduz significativamente as contagens microbianas da carne embalada em aerobiose. Em estudos *in vitro* com OE's crescimento das bactérias deteriorativas *L. sakei*, *L. curvatus*, *C. maltaromaticum*, *B. thermosphacta*, *Ps. fluorescens* e *S. liquefaciens* foi afetado. O efeito antimicrobiano é superior nas bactérias Gram positivos devido a serem mais suscetíveis que as Gram negativos, que contém lipopolissacaridos na sua membrana, tornando-a hidrofílica, enquanto que a barreira das bactérias Gram-positivas é hidrofóbica e a dos OE's hidrofóbica.

Os OE que relevaram maior potencial antimicrobiano foram os provenientes de tomilho, alecrim, cravo, manjerona, manjerição, orégãos, erva-cidreira, coentros e gengibre, sendo os mais utilizados e comercializados na atualidade (Jayasena e Jo, 2013a).

Os OE's apresentam atividade antioxidante pela existência de compostos fenólicos na sua constituição como já referido, sendo o carvacrol, eugenol, geraniol, chavicol, mentol, linalol, citronelol e timol os principais compostos responsáveis (Jayasena e Jo, 2013b). Os compostos fenólicos atuam como íman (captadores) dos radicais livres formados na oxidação lipídica, visto que doam um eletrão ao radical livre. O anel presente na estrutura dos compostos fenólicos reduz a energia do radical livre, fazendo com que os radicais resultantes desta ligação (dos compostos fenólicos com os radicais livres), reajam com outros radicais formando espécies não radicalares (que não reajam) (Jayasena e Jo, 2013b). Estes compostos atuam ainda como inibidores dos sistemas enzimáticos responsáveis pela iniciação da reação de oxidação da carne (Jayasena e Jo, 2013b).

Contudo os OE's apresentam algumas limitações quando inoculados na matriz (carne), como a redução do efeito da atividade antimicrobiana e antioxidante deste na carne comparativamente com o estudo *in vitro*, devido a existirem interações dos OE's com a estrutura da carne (gordura, hidratos de carbono, sais e proteínas) (Jayasena e Jo, 2013b).

1.6.2.1 Óleo essencial de Laranja

Citrus x sinensis L. osbeck é amplamente cultivada e a mais consumida no mundo dentro do género *Citrus* (Jing *et al.*, 2014). Pertence à família Rutaceae (Uysal *et al.*, 2011).



Figura 4: Fruto *Citrus x sinensis* L. osbeck do jardim botânico da UTAD

O OE de laranja pode ser extraído de diversos órgãos como a casca, folhas e flores, sendo este OE utilizado como aroma para os alimentos, licores e bebidas (Jing *et al.*, 2014).

O OE da casca de laranja apresenta uma mistura de compostos, no entanto é maioritariamente constituído por terpenos e sesquiterpenos que são suscetíveis à luz, oxigénio e humidade, quando expostos a estes fatores o OE oxida facilmente (Galvão *et al.*, 2015).

O OE apresenta atividade antioxidante, antimicrobiana, germicida e anticancerígena (Uysal *et al.*, 2011). Sendo que, o composto principal do OE é o limoneno que tem atividade antioxidante, bem como os compostos α -pineno, β -pineno e γ -terpineno apresentam atividade antimicrobiana (Uysal *et al.*, 2011). Segundo Galvão *et al.* (2015), o limoneno representa 98% do OE e os restantes 2% estão distribuído pelos compostos mircene, α -pineno, e alguns aldeídos monoterpenos.

1.6.2.2 Óleo essencial de Louro

Laurus nobilis L. ou Louro, é uma árvore verde perene aromática que está amplamente distribuída pela Europa e principalmente na região do Mediterrâneo Sul, devido ao clima temperado e subtropical. Pertence à família *Lauraceae* (Julianti *et al.*, 2012) e é rica em OE (Hassiotis e Dina, 2011).

As folhas de Louro (Figura 5) são utilizadas beneficamente não só para culinária, como também para efeitos medicinais como doenças cardíacas, gastrointestinais, asma, diarreia, dores reumáticas, controlo dos diabetes e problemas digestivos (Chen *et al.*, 2014; Julianti *et al.*, 2012). São muito utilizadas como tempero de carnes, peixe, sopas e em bebidas, devido ao seu aroma (Sellami *et al.*, 2011).



Figura 5: Folha de *Laurus nobis* L. do jardim botânico da UTAD

O OE de louro é proveniente das folhas, apresentando atividade antimicrobiana, antioxidante e por consequente um bom conservante de alimentos (Sellami *et al.*, 2011).

O principal composto presente no OE é 1,8-cineol com percentagens que variam de 31,4% a 56%, existindo no entanto compostos como linalool, metil eugenol, eugenol, α -terpinilo de etilo que apresentam um teor significativo ($>10\%$) (Sellami *et al.*, 2011) e um baixo teor ($<10\%$) de eugenol, sabinense β -pineno, α -terpineol e linalilo de etilo (De Corato *et al.*, 2010). Este OE apresenta um aroma característico a picante, que é determinado pelos compostos de benzeno (eugenol, metil eugenol e elemicina) com valores que variam entre 1% a 12%, sendo estes compostos que determinam a qualidade sensorial das folhas de louro de onde foi extraído o OE (Sellami *et al.*, 2011).

Segundo o estudo referido por Silveira *et al.* (2014), o OE de louro apresentou atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram negativo como *Campylobacter jejuni* e após 4 dias da inoculação do OE na carne apresentou atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

1.6.2.3 Óleo essencial de Murta

Myrtus communis L. ou Murta, é uma árvore de pequenas dimensões ou um arbusto verde perene com folhagem densa (Figura 6), pertencente à família Myrtaceae, típica dos países mediterrâneos, sendo uma das espécies mais importantes da família a nível medicinal e aromático (Dairi *et al.*, 2014; Ghasemi *et al.*, 2011).



Figura 6: Arbusto de *Myrtus Communis* L. do jardim botânico da UTAD

O OE da Murta pode ser extraído de diversos órgãos da planta como as folhas, bagas (redonda e com cor azul escura), flores e raízes, para efeitos medicinais, aromáticos e efeitos gastronômicos (Ghasemi *et al.*, 2011).

As folhas são o órgão da planta mais conhecido a nível da extração de OE, visto ser o mais utilizado como condimentos alimentares (Ghasemi *et al.*, 2011), nomeadamente como especiaria para a carne (Hsouna *et al.*, 2014), isto porque as folhas têm um aroma agradável, sendo muito importante a nível da indústria (Pereira *et al.*, 2013).

O OE de murta é caracterizado pelo aroma e sabor agradável (Hsouna *et al.*, 2014), sendo os compostos α -pineno, 1,8-cineol, limoneno, mirtenil de etilo e mirtenol os principais responsáveis (Hsouna *et al.*, 2014).

Todavia, o OE de murta pode ser dividido em dois grupos que são, o de elevado teor em acetato de myrtenyl e baixo teor de α -pineno, e o outro grupo com ausência de mirtenil de etilo e elevado teor de α -pineno e de 1,8-cineol como principais constituintes (Brada *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2009). Os OE de murta proveniente de Portugal, Marrocos, Espanha, Tunísia e Albânia têm a presença de mirtenil de etilo e os países como Grécia, Itália e França têm a ausência deste composto (Brada *et al.*, 2012).

Segundo Dairi *et al.* (2014), o OE das folhas de murta é anti-inflamatório, anti-genotóxico e apresenta efeito antidiabético, antioxidante e antimicrobiano, devido à presença de ácidos fenólicos (ácido cafeico) e os flavonóides (miricitrino, miricetina-3-O ramnosídeo). É também muito usado no tratamento de doenças pulmonares, cavidade oral e como anti-hemorrágico (Ghasemi *et al.*, 2011).

A pesquisa de Hennia *et al.* (2015b) refere que o OE apresenta atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

1.7 Métodos alternativos de análise de alimentos

1.7.1 Métodos de cromatográficos

Os métodos cromatográficos são amplamente utilizados em procedimentos analíticos para determinar, separar e identificar um amplo espectro de compostos nas amostras com matrizes complexas e variáveis (Konieczka e Namieśnik, 2010).

Os métodos cromatográficos podem ser de fase gasosa ou fase líquida podendo ser associados à espectrometria de massa (Harborne e Williams). Destas saliente-se a espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de massa por transferência de prótons de reação (PTR-MS). A espectrometria de massa por cromatografia gasosa (GC-MS) e a técnica associada à espectrometria de fase líquida é cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Luykx e van Ruth, 2008) são as mais frequentemente utilizadas.

A técnica GC-MS é uma técnica instrumental amplamente utilizada para matrizes com compostos voláteis e termicamente estáveis (por exemplo, os óleos essenciais) visto que, apresenta uma elevada reprodutibilidade, sendo baseada na coluna de gás acoplada a um espectro de massa que tem como finalidade de separar os componentes de uma matriz e caracterizá-los individualmente qualitativamente e quantitativamente devido a ionização por impacto de elétrons e determinar a massa dos compostos. No entanto apresenta limitações por ser uma técnica demorada e cara (Luykx e van Ruth, 2008).

A técnica de HPLC é amplamente utilizada por ser uma técnica simples muito valiosa e poderosa na medição de variados compostos como lípidos, vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos e proteínas, compostos quirais e pigmentos. É baseada na separação e quantificação dos compostos da matriz, em que estes são separados através da injeção de amostra na coluna de HPLC (Luykx e van Ruth, 2008).

1.7.2 Métodos de espectroscópicos

Ao longo dos tempos foram desenvolvidas varias técnicas de espectroscopia para análise de alimentos, sendo a espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de Ramam, espectroscopia de fluorescência e espectroscopia no infravermelho com transformada de

Fourrier (Okparanma e Mouazen, 2013). No entanto, é necessária uma análise quimiométrica dos resultados quando são utilizados estas técnicas (Reid *et al.*, 2006).

1.7.2.1 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho (IR) baseia-se na medição da intensidade de absorção da luz infravermelha através de uma amostra, possibilitando a determinação dos grupos funcionais da mesma, visto que cada grupo funcional de uma molécula tem uma frequência vibratória própria (Luykx e van Ruth, 2008).

A radiação de infravermelho divide-se em três gamas que são o infravermelho longínquo, infravermelho médio e infravermelho próximo, com comprimentos de onda 14000-10 cm^{-1} que é adjacente à região microondas com alta energia, podendo ser utilizada para espectroscopia de rotação. A região 4000-400 cm^{-1} é uma energia média e pode ser utilizada para estudar as vibrações fundamentais e estrutura vibratória. A região 14000-4000 cm^{-1} tem energia mais elevada, infravermelho próximo, e pode provocar vibrações harmónicas (Ismail *et al.*, 2006).

É uma técnica não invasiva e não destrutiva, rápida, com baixo custo, execução simples e é amplamente aplicada em investigação relativa a produtos alimentares, devido às bandas de cada região serem facilmente identificáveis como evidenciado na Tabela 5 (Luykx e van Ruth, 2008).

Tabela 5: Valores de absorção dos diferentes grupos funcionais (Machado, 2013).

Grupo Funcional	Número de Onda (cm⁻¹)
-OH	3600-3200
-NH e NH ₂	3300-3000
-CH ₃	2962 (±10); 2872 (±10)
-CH ₂	2926 (±10); 2853 (±10)
-C=O ácidos carboxílicos	1770-1750
-C=O ésteres	1745-1750
-C=O aldeídos	1735-1715
-C=O cetonas	1720-1710
-C=O amidas	1700-1600
-C=N	1670-1618
-C=C (<i>trans</i>)	1678-1665
-C=C (<i>cis</i>)	1662-1648
-N-H	1590-1500
-C-N	1280-1030

A utilização da técnica IR tem aumentado com a utilização de FTIR na análise de alimentos, visto que esta técnica permite uma análise e quantificação rápida dos componentes e, por consequente, um rendimento elevado na análise de amostras (Luykx e van Ruth, 2008).

1.7.2.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia FTIR tem sido amplamente utilizada para identificar compostos numa elevada variedade de áreas, pelo facto de ser uma técnica rápida como já referido, não destrutiva, não invasiva, com baixo preço e sensível (Kodogiannis *et al.*, 2014).

Atualmente tem sido reconhecida como uma técnica poderosa quando acoplada com as técnicas de quimiometria, visto que é útil para o controlo de qualidade de variados produtos alimentares por fornecer informação da composição dos componentes através do espectro, que tem uma região espectral de valores entre 4000 cm⁻¹ a 700 cm⁻¹ (Kodogiannis *et al.*, 2014). Tem sido muito útil para a análise da autenticidade e adulteração dos alimentos (Kodogiannis *et al.*, 2014).

Para aumentar a eficácia desta técnica utiliza-se um acessório que se designa de célula de reflexão total atenuada (ATR) em que a radiação de infravermelhos não é conduzida através

da amostra mas sim através de um cristal com um índice de refração elevado que está em contacto com a amostra (Gómez-De-Anda *et al.*, 2012). O feixe é refletido várias vezes dentro do cristal antes de ser refletido para o detetor, como evidenciado na Figura 7. Quando o feixe atinge a superfície refletora penetra na amostra até uma profundidade de 2λ , onde λ é o comprimento de onda da radiação (Gómez-De-Anda *et al.*, 2012).

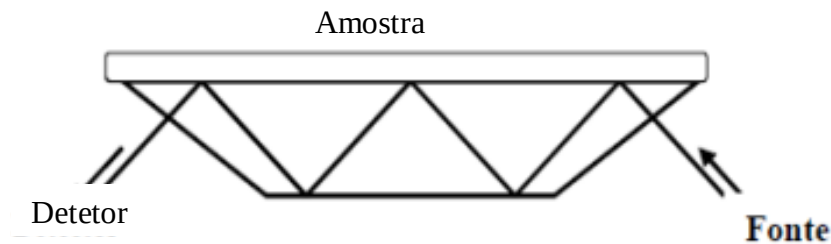


Figura 7: Esquema da leitura da amostra com o cristal de ATR adaptado de (Ismail *et al.*, 2006).

Esta técnica associada a quimiometria permite a deteção de deterioração da carne a nível microbiano com base em análise microbiológica, e a nível químico com base na análise química (Kodogiannis *et al.*, 2014).

1.8 Quimiometria

A quimiometria é a combinação de métodos baseados em lógicas estatísticas e matemáticas para interpretar de forma clara e concisa os dados obtidos em estudos (Shin *et al.*, 2010).

1.8.1 Análise discriminante linear

A análise discriminante linear (LDA) é classificada como um modelo de quimiometria eficaz e incomparável com outros modelos de discriminação a nível estatístico, visto utilizar apenas variáveis úteis e retirar a influência de outras variáveis (Wu *et al.*, 2014). É uma técnica de reconhecimento de padrões, que maximiza a proporção de variância e minimiza entre classe a proporção de variância dentro da classe (Khanmohammadi *et al.*, 2013).

Esta técnica é usada para construir um modelo de classificação de uma matriz de dados e informações conhecidas, ou seja, é utilizada para prever uma classe de dados, criando um modelo limite entre classes de funções discriminantes lineares (Yudthavorasit *et al.*, 2014). Tem

como finalidade garantir a eficiência máxima do modelo, sendo a capacidade preditiva deste modelo avaliado por "leave-one-out" de validação cruzada (Yudthavorasit *et al.*, 2014).

Este procedimento de validação é realizado através da remoção de um cromatograma de cada vez num conjunto de amostragens, repetindo o procedimento em todas as amostragens, sendo os cromatogramas restantes um conjunto de ensaio. Constrói-se com estes cromatogramas uma tabela de contingência; para que este modelo seja aceitável é necessário obter-se uma elevada percentagem de classificação correta (Yudthavorasit *et al.*, 2014).

1.8.2 Análise em componentes principais

A análise em componentes principais (PCA) é um método de estatística multivariada, isto é, uma técnica de análise de dados e é aplicada a uma base de dados multivariada (Rezzi *et al.*, 2007).

A PCA cria um conjunto de eixos ortogonais e novas variáveis conhecidas como componentes principais (PC), sendo que os eixos ortogonais não estão correlacionados com os outros, expressando-se apenas os resultados de variabilidade total de cada PC comparativamente com outros PC's (Shin *et al.*, 2010). Sendo que o PC1 representa sempre a maior variação dos dados (Yudthavorasit *et al.*, 2014). Cada PC é definido por um vetor conhecido como vetor próprio da matriz. Cada valor próprio é a quantidade de desvio explicada por um determinado componente (Shin *et al.*, 2010).

Permite obter uma informação mais generalizada em relação às variáveis estudadas e expressa os resultados de forma a evidenciar as semelhanças e as diferenças das variáveis (Shin *et al.*, 2010). A técnica de PCA é aplicada aos valores médios dos parâmetros estudados (Lorenzo e Gómez, 2012).

1.8.3 Regressão PCR e PLS-R

A regressão em componentes principais (PCR) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS-R) (Aït-Kaddour *et al.*, 2011) são métodos de calibração em análise multivariada.

PCR é um método de calibração básico, mas muito poderoso sendo baseado nas técnicas de PCA. É amplamente utilizado em investigação, visto que este método baseia-se na previsão, sendo que os PC são selecionados com valores próprios (grandes), no entanto sem qualquer relação com a variável de resposta seguindo-se o modelo de regressão construído através de novas variáveis explicativas (Kawano *et al.*, 2015). Pode não ser muito preciso na previsão, se

os valores de componentes principais forem valores próprios pequenos, interferindo assim no erro quadrático médio de calibração (RMSEC) (Kawano *et al.*, 2015). Uma limitação do PCR é que podem ser obtidos modelos de uma variação nas variáveis X de pouca ou nenhuma relevância para as variáveis Y (Rajalahti e Kvalheim, 2011).

PLS-R é uma técnica que generaliza e combina recursos de análise em componentes principais e de regressão múltipla (Aït-Kaddour *et al.*, 2011), que tem por base a extração de um pequeno número de componentes ortogonais latentes (A), com combinações lineares (X) (Argyri *et al.*, 2013). É muito utilizado quando se efetuam leituras de amostras com o FTIR, sendo que a complexidade do modelo PLS-R é determinado pelo número de componentes latentes que foram extraídas dos dados, sendo determinados um por um por validação cruzada no procedimento de formação (Argyri *et al.*, 2013). O número de componentes latentes necessários para produzir o melhor erro quadrático médio (RMSEVC) da validação cruzada é escolhido para a modelagem (Argyri *et al.*, 2013).

1.9 Objetivos

Com a realização deste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito a adição de óleos essenciais de Laranja (*Citrus sinensis* L. osbeck), de Louro (*Laurus nobis* L.) e de Murta (*Myrtus communis* L.) e das temperaturas de armazenamento 2 e 8°C na vida útil de hambúrgueres de carne Maronesa embaladas sob vácuo e em aerobiose, através de métodos microbiológicos, físico-químicos, espectroscópicos e sensoriais.

O objetivo principal deste trabalho consistiu em estudar a utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) combinado com o uso de quimiometria para:

- i) Estimar os valores de pH, TBARs e das contagens de microrganismos;
- ii) Discriminar as amostras que foram tratadas com os diferentes óleos essenciais e diferenciar o seu grau de frescura.~

CAPÍTULO II-

Material e Métodos

2.1 Delineamento experimental

2.1.1 Amostragem

Para a realização deste trabalho foi utilizado *M. semitendinosus* e *M. semimembranosus* (n=3) de animais do sexo masculino de raça Maronesa para o estudo das características microbiológicas, físico-químicas, sensoriais e espectroscópicas da carne de bovino, ao longo do tempo de armazenamento em refrigeração, com e sem adição de óleos essenciais (*Citrus sinensis* L. osbeck, *Laurus nobis* L e *Myrtus communis* L.), em diferentes embalagens.

2.1.1.1 Extração dos óleos essenciais

Utilizaram-se óleos essenciais de Laranja (*Citrus sinensis* L. osbeck), de Louro (*Laurus nobis* L.) e de Murta (*Myrtus communis* L.). O *Laurus nobis* L. e *Myrtus communis* L., foram provenientes do Jardim botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, e *Citrus sinensis* L. provenientes do mercado local sendo de origem portuguesa e classificadas como categoria II.

Para que a extração fosse realizada, foi necessário o processo de secagem das folhas de *Laurus nobis* L. e *Myrtus communis* L. e das cascas de *Citrus sinensis* L. à temperatura de 40-45°C, até obterem peso constante.

A extração efetuou-se pelo método de hidrodestilação com o aparelho de Clevenger com a adaptação do método de Skandamis and Nychas (2001). Num balão de 500 mL, colocaram-se 30g de amostras secas trituradas e adicionaram-se 300 mL de H₂O destilada, durante 3h. Recolheu-se o óleo com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para um frasco fechado hermeticamente e armazenou-se a uma temperatura de 4°C. Congelaram-se os OE's, com o intuito de se separar a água presente no óleo e o OE.

2.1.1.2 Determinação da concentração mínima inibitória

A determinação da concentração mínima inibitória (MIC) tem como objetivo verificar se os OE's atuam na matriz com o efeito antimicrobiano pretendido (Hyldgaard *et al.*, 2012). A MIC foi determinada em microplacas de 96 poços estéreis, pelo método *Mininum Inhibitory Concentration* (MIC) de (Sarker *et al.* (2007)), como ilustrado na Figura 8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bactéria	Antibiótico		Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos
B	Bactéria	Antibiótico		Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos
C	Bactéria	Antibiótico		Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos
D	Bactéria	Antibiótico		Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos
E	Bactéria	Antibiótico		Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos
F	Bactéria	Antibiótico		Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos
G	Bactéria	Antibiótico		Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos
H	Bactéria	Antibiótico		Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos	Compostos

Figura 8: Placa de 96 poços do método de MIC adaptado de (Sarker *et al.*, 2007)

Para a determinação da MIC dos óleos essenciais extraídos, bem como testar o efeito antimicrobiano, utilizaram-se bactérias patogénicas e bactérias deteriorativas, as quais têm sido associadas ao ecossistema da carne .

As bactérias patogénicas utilizadas foram *E.coli* O₁₅₇:H₇ NTCC 29000, *L. monocytogenes* ATCC 0679 e as bactérias isoladas de carne bovina de raça Maronesa, Mesófilos e *Pseudomonas* spp.. Estas encontravam-se congeladas e conservadas, procedeu-se à descongelação e posterior repicagem para BHI (meio propício à multiplicação), tendo-se incubado a temperaturas ótimas de crescimento, durante 24h.

Preparam-se os inóculos com solução salina para se atingir uma concentração de 5×10^6 UFC/ml pela escala de MC farland e sementeira em placas de Petri com os meios seletivos para cada microrganismo.

Colocaram-se 100 µl de BHI estéril em todos os poços e nas colunas 4 a 12 adicionaram-se 100 µl de OE na linha A que irá corresponder a uma concentração de 100%. Dessa linha retiram-se 100 µl para a segunda linha e assim sucessivamente até à linha H. Assim a concentração em cada linha irá ser metade da linha anterior. Adicionaram-se 20 µl do inóculo da bactéria na coluna 1 e nas colunas 4 a 12, que irá ser o controlo negativo e por fim adicionou-se 20 µl de resazurina em todos os poços exceptuando a coluna 3. Colocaram-se as placas a crescer durante 18-24h à temperatura enunciada para cada bactéria.

2.1.1.3 *Análise dos compostos por GC-MS*

A análise foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás Thermo Scientific™ TRACE™ 1300 acoplado a um ISQ™ Série Quadruplo Simples MS (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

A separação dos analitos foi realizada com uma coluna Thermo Scientific TG-5MS coluna (60m x 0.25mm 131 x 0.25µm). O programa de temperatura do forno era: temperatura inicial de 60 ° C, mantida durante 2 minutos, aumentando para 280 ° C a uma taxa de 10,00°C / min e mantida durante 5 minutos. As amostras e padrões foram preparados de fresco antes da análise usando n-hexano (Merck) em 1,0%(v/v) e 0,2%(v/v) de concentrações, respectivamente, e o volume injectado foi 1.0µL utilizando um amostrador automático. O injector foi ajustado de modo (1:5) para dividir, operando a 250 ° C e 165kPa. As temperaturas da linha de transferência de espectrómetro de massa e fonte de iões foram definidos para 280 e 250°C, respectivamente, com a última operação no modo de impacto de electrões (70eV, digitalização em massa gama 30-400amu).

A análise das mesmas amostras foi também realizada utilizando um GC-2010 Shimadzu™ Plus (Shimadzu Corporation, Japão). A separação dos analitos foi realizada com uma coluna Zebtron ZB-5 (30 m x 0,25 milímetros x 0.25µm) utilizando um programa de temperatura do forno semelhante e os parâmetros de injeção / injector, excepto para o fluxo de gás transportador, que foi definida como 82.5kPa. O detetor de temperatura e a potência foi programado para 300°C e 142 75mA, respectivamente, com um fluxo de composição de 5,0 mL / min. Todas as separações analíticas foram efectuadas utilizando hélio 99,9995% como gás portador.

A identificação dos analitos foi realizada por comparação dos índices de retenção Kovats e lineares, usando NIST / EPA / NIH da biblioteca (2011) e outras bibliotecas, e por comparação de padrões verdadeiros.

2.1.1.4 *Adição dos OE's às amostras*

Após a determinação da atividade antimicrobiana de cada óleo essencial e de se determinar com um pré ensaio a carga microbiana inicial da carne de bovino, que foi 10⁵, adicionou-se os OE's à carne previamente picada.

Tabela 6: Adição dos OE's na carne picada

Condição	% MIC	µL/g carne
Louro	2,340	0,234
Laranja	50,000	5,000
Murta	25,000	2,500

2.1.1.5 Preparação, embalagem e acondicionamento das amostras

Após 72 horas post mortem, picou-se o músculo *M. semitendinosus* e *M. semimembranosus*, dividiu-se em lotes de 1110g e armazenou-se em refrigeração a 2°C. Adicionou-se os OE correspondente a cada lote com os µL evidenciados em 2.1.1.4 e homogeneizou-se durante 7 min, assim como o lote sem OE. À posteriori pesou-se 40 g de carne e com o auxílio de uma forma moldou-se um hambúrguer, sendo este embalado e armazenado (como evidenciado na tabela 7) em refrigeração a 2 e a 8°C.

Tabela 7: Amostragem de acordo com a embalagem e tempo de armazenamento (dias)

Embalagem	Tempo de armazenamento (horas)												Total de amostras
	0	1	24	48	72	84	168	240	336	504	672	840	
Aerobiose	1	4	8	8	8	8	8	8	8				63
Vácuo							8	8		8	8	8	48
Total													111
Total 3 repetições													333

No dia de amostragem (dia 0) e em cada dia de armazenamento mencionado, realizou-se a colheita asséptica de amostra para análise microbiológica, bem como a colheita de 1g para análise por FTIR. Efectuaram-se as restantes determinações, como a medição instrumental da cor e análise sensorial da carne embalada (após 60 min da remoção da embalagem). Todas as análises foram realizadas na totalidade das amostras de carne em estudo (tabela 7) (n=333).

2.1.1.6 Determinação Físico-químicas

2.1.1.6.1 pH

A determinação do pH efetuou-se com um medidor de pH WtW 330i, colocado diretamente em 3 zonas da amostra em análise. O valor foi obtido pela media aritmética de três medições.

2.1.1.6.2 Coordenadas de cor L*a*b*

A medição da cor efetuou-se com base no sistema espaço de cor CIE L*a*b* (L* luminosidade, a* coordenada de cromaticidade vermelho verde, b* coordenada de cromaticidade amarelo azul), com o refletômetro Minolta Chromo Meter CR-300, em amostras de carne picada com espessura de 1 a 1,5 cm. A medição realizou-se em três zonas distintas da amostra e o valor obteve-se pela média aritmética dessas três medições.

2.1.1.6.3 Atividade antioxidante

Determinou-se a atividade antioxidante dos OE's pelo método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) adaptado de Harborne and Williams (2000), que envolve reações de transferência de eletrões. Este método apresenta algumas limitações, pois trata-se de um método de determinação por ponto final, não refletindo as diferentes velocidades de reação entre os antioxidantes e oxidantes, e os valores de TEAC de antioxidantes puros não apresentam uma correlação entre estes e o número de eletrões que o antioxidante pode ceder, como demonstrado na Figura 9.

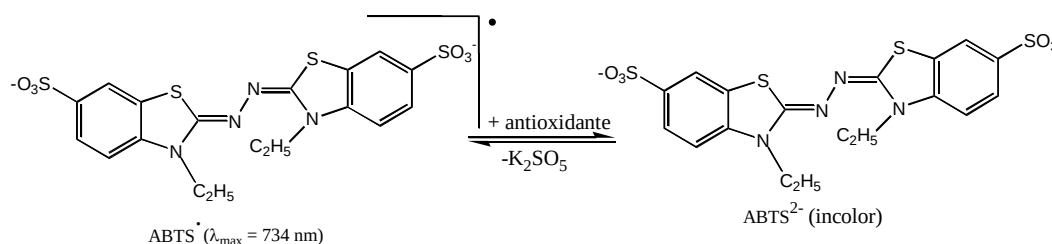


Figura 9: Princípio do método de determinação da capacidade antioxidante com $\text{ABTS}^{+\bullet}$

Pesou-se 19 mg do catião radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ que foram dissolvidos com 5 mL de H_2O com agitação. De seguida efetuou-se a pesagem de 38 mg de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) com a adição de 1 mL de H_2O obteve-se uma concentração final de 140 mM. Aos 5 mL de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ dissolvido, adicionou-se 88 μL da solução de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ previamente preparada (razão 1:0,35).

A mistura deixou-se a reagir no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 h antes da sua utilização. Como o ABTS⁺ e o K₂S₂O₈ reagem estequiometricamente 2:1, a reação anterior resulta na oxidação incompleta do ABTS⁺. A oxidação do ABTS⁺ começa imediatamente após a adição do K₂S₂O₈, mas a absorvância só é máxima e estável após 6 h, o catião radical é estável nesta forma durante dois dias aquando este é armazenado no escuro à temperatura ambiente.

A solução do catião radical ABTS⁺ diluiu-se com etanol numa razão 1:88. Efetuou-se de seguida a leitura da absorvância a 734 nm tendo-se obtido um valor de 0,70±0,02 numa cuvete de 10mm de percurso ótico.

Para a construção da reta de calibração foram adicionados a seis tubos de ensaio 2ml da solução de trabalho ABTS⁺, em seguida adicionou-se aos tubos de ensaio 200, 150, 100, 50, 25 µL da solução de trabalho de Trolox a 0,11mM. Para finalizar adicionou-se 200, 50, 100, 150, 175 mL de água, para se perfazer o volume.

Para o cálculo da percentagem de inibição da amostra, adicionou-se 2 mL de solução de trabalho de ABTS a 25 µL da amostra de cada OE, agitou-se e leu-se a absorvância a 734 nm após terem permanecido 15 min à temperatura ambiente. O cálculo efetuou-se pela fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 * \frac{\text{abs 734nm branco} - \text{abs 734nm amostra}}{\text{abs 734nm branco}}$$

2.1.1.6.4 TBARS

A determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbiturico (TBA) realizou-se segundo o método adaptado de Raharjo *et al.* (1992), para as amostras de aerobiose com os tempos t=0,1,4,5 e 7, de vácuo t=5, 7, 8, 9 e 10.

Pesou-se 5,00 g de amostra picada (em duplicado) e colocou-se num frasco de vidro de 200mL, de seguida, adicionou-se 20 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) com uma concentração de 5% (à temperatura ambiente) e 200 µL de Butil hidroxitolueno (BHT).

Homogeneizou-se em Ultra-Turrax a 13800 rpm por 1 minuto, passou-se tudo para um tubo de centrífuga com o auxílio de uma vareta de vidro e lavou-se o frasco com 4mL de TCA 5%. Colocou-se os tubos calibrados na centrífuga a 10000 rpm durante 5 min, retirou-se o sobrenadante para uma proveta de 25 mL com filtro de Whatman nº 42 que se lavou com 2 mL de TCA 5% e ajustou-se o volume para 25 mL e colocou-se num tubo fechado.

Retirou-se 2 mL do tubo previamente agitado no vortex de cada amostra e misturou-se com 2 mL de TBA 0,08M num tubo, bem como se efetuou o tubo do branco que se colocou

num tubo 2 mL de TCA 5% e misturou-se com 2mL TBA. Incubou-se num banho a 94°C durante 5 min e arrefeceu-se em água corrente, posteriormente leu-se a absorvância do branco e da amostra a 532 nm num espectrofotómetro UV/VIS (Jasco V-530).

Elaborou-se uma curva padrão em que colocou-se 2 ml de soluções de 1,1,3,3-tetrametoxipropano com TCA 5% com diferentes concentrações (0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 8,0 e 10,0 M (em duplicado) de seguida adicionou-se 2 ml de solução TBA 0,08M e incubou-se a 94°C por 5 min, arrefeceu-se em água corrente e leu-se a absorvância a 532 nm. Os resultados foram expressos em mg de de malonaldeído (MDA)/100g de amostra.

2.1.1.7 *Análise por FTIR-ATR*

Os espectros no infravermelho das amostras foram obtidos num espectrómetro de infravermelho (FTIR) com a utilização do acessório ATR com o aparelho ShiMadZu e o programa Lab Solutions IR.

Colocou-se 1g de amostra sobre o cristal do ATR com temperatura de 35/37°C, mediu-se os espectros na região de 2500 a 500 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans. O tempo de obtenção de cada espectro foi aproximadamente 2 min, efectuou-se 3 repetições para cada amostra e limpou-se o cristal com etanol a 96%. Realizou-se um background de 32 scans entre cada amostra. O valor obteve-se pelo cálculo da média das três repetições da amostra.

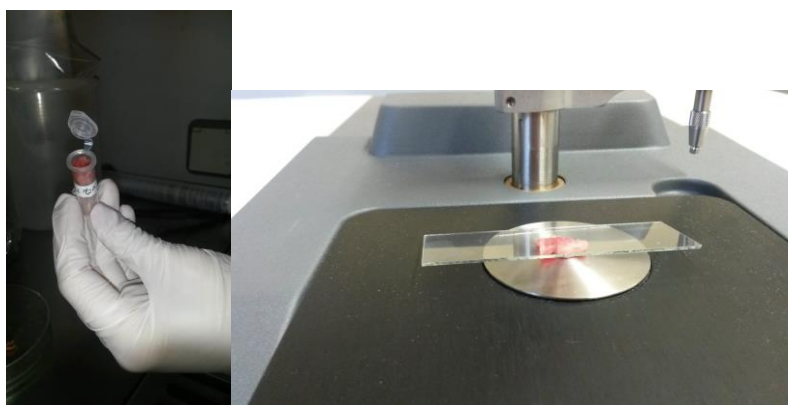


Figura 10: Análise da amostra por FTIR-ATR

2.1.1.8 Determinações microbiológicas

No dia 0 e no final de cada tempo de armazenamento, efetuou-se as determinações microbiológicas de contagem de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., Bolores e leveduras, Bactérias do Ácido Lático (Kadim *et al.*), microrganismos mesófilos (aeróbios totais a 30°C) e microrganismos psicrotróficos (aeróbios totais a 7°C).

2.1.1.8.1 Preparação das diluições e sementeira

Para todos os tempos de armazenamento mencionados em 2.1.1.5 realizou-se a colheita e pesagem de 10g das amostras em condições de assépsia para um saco de *Stomacher* estéril e diluiu-se a amostra com 90 mL de triptona sal (triptona a 0,1% e NaCl a 0,85%, esterilizada a 121°C durante 15 min.). Homogeneizou-se a amostra no *Stomacher* durante 1 min.

Efetuiu-se diluições decimais sucessivas em 9 mL de triptona sal. Após estas diluições, realizou-se a sementeira quer por incorporação quer por superfície, nos respetivos meios de cultura da análise microbiológica de quantificação dos microrganismos mencionados em 2.1.1.8.

2.1.1.8.2 Contagem de microrganismos mesófilos (aeróbios totais a 30°C)

A sementeira realizou-se segundo a norma ISO 4833 (1991), por incorporação de 1 mL da suspensão mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura seletivo PCA (Plate Count Agar) da marca (Liofilchem). As placas após terem sido semeadas incubaram-se a 30°C durante 72 h, procedeu-se à contagem de colónias. Expressou-se de seguida os resultados em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log ufc/g).

2.1.1.8.3 Contagem de microrganismos psicrotróficos (aeróbios totais a 7°C)

A sementeira realizou-se segundo a norma ISO 17410 (2001), por incorporação de 1 mL da suspensão mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura seletivo PCA (Plate Count Agar) da marca (Liofilchem). As placas após terem sido semeadas incubaram-se a 7°C durante 10 dias, procedeu-se à contagem de colónias. Expressou-se de seguida os resultados em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log ufc/g).

2.1.1.8.4 Contagem de Bactérias do ácido láctico

A sementeira realizou-se segundo a norma NF V 04-503 (1988), por incorporação de 1 mL da suspensão mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura seletivo MRS (Man Rogosa Sharpe) Agar da marca (OXOID CM 0361) com dupla camada. As placas após terem sido semeadas incubaram-se a 30°C durante 72 h, procedeu-se à contagem de colónias.

Expressou-se de seguida os resultados em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log ufc/g).

2.1.1.8.5 Contagem de Enterobacteriaceae

A sementeira realizou-se segundo a norma ISO 5552 (1997), por incorporação de 1 mL da suspensão mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura seletivo VRBG (Violet Red Bile Glucose) Agar da marca (Scharlau) com dupla camada. As placas após terem sido semeadas incubaram-se a 37°C durante 24 h, procedeu-se à contagem de colónias típicas de coloração purpura (cor rosa avermelhado, com ou sem halos de precipitação, ou colónias mucóides sem cor definida), repicou-se 5 dessas colónias para Agar nutritivo e incubaram-se a 30°C durante 24 h, de seguida realizou-se a confirmação bioquímica pela prova de oxidase (negativa) e pela capacidade de fermentação da glucose em meio Glucose Agar. Expressou-se de seguida os resultados, em função dos testes de confirmação bioquímicos, em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log ufc/g).

2.1.1.8.6 Contagem de *Pseudomonas* spp.

A sementeira realizou-se segundo a norma ISO 13720 (1995), por incorporação de 1 mL da suspensão mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura seletivo CFC (Cetrimide, Fucidin, Cephaloridine) Agar com *Pseudomonas* agar base de marca (BIOKAR) e suplemento seletivo CFC (BIOKAR). As placas após terem sido semeadas incubaram-se a 30°C durante 24 h, procedeu-se à contagem de colónias e repicou-se 5 dessas colónias para Agar nutritivo e incubaram-se a 30°C durante 24 h, de seguida realizou-se a confirmação bioquímica pela prova de oxidase (positiva) e pela capacidade de crescimento em aerobiose em meio de Kligler (Kligler Iron Agar) da marca (OXOID CM 0033). Expressou-se de seguida os resultados, em função dos testes de confirmação bioquímicos, em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log ufc/g).

2.1.1.8.7 Contagem de Fungos (bolores e leveduras)

A sementeira realizou-se segundo a norma ISO 13681 (1995), por superfície 0,1 mL da suspensão mãe e das respetivas diluições, em meio de cultura seletivo CGA (Chloramphenicol Glucose Agar) de marca (VWR Chemicals). As placas após terem sido semeadas incubaram-se a 25°C durante 5 dias, procedeu-se à contagem de colónias de bolores e leveduras. Expressou-se de seguida os resultados em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log ufc/g).

2.1.1.9 *Análise sensorial*

Elaborou-se a análise sensorial com a finalidade de determinar ao longo do tempo o aparecimento progressivo dos produtos de degradação dos lípidos, causadores de “off-flavores” e consequentemente obter-se o conhecimento do grau de deterioração da carne.

Esta realizou-se pela colaboração de um painel de provadores de 4 a 6 membros, constituído por docentes, técnicos de laboratório e uma aluna de Mestrado, com experiencia em avaliação sensorial de Carne Maronesa.

Efetuuou-se esta análise em todas as amostras (n= 333) 60 min à posteriori a se abrir a embalagem e se colarem em caixas cobertas com película polietileno e em refrigeração a 4°C.

A apresentação de amostras em cada sessão foi aleatória e os dados da avaliação obtiveram-se numa folha de prova de análise sensorial individual (em anexo 1), em que os parâmetros avaliados foram o aspeto, salientado a cor; o cheiro a deteriorado e qual o tipo de cheiro, assim como a apreciação global de frescura. A avaliação das amostras segundo estes parâmetros foi numa escala de 0 a 15 cm relativamente a intensidade de cor (rosa pálido, vermelho, bege/castanho), de cheiro a deteriorado e tipo de cheiro a deteriorado, nomeadamente cheiro adocicado, a manteiga, a ranço, acídico, amoniacal e pútrido.

A frescura da carne foi estabelecida com base na avaliação global de frescura (AGF), considerando-se 0 a 5 cm (inclusive) deteriorada (D), 5 a 10 cm (inclusive) semi-fresca (SF) e 10 a 15 cm fresca (F).

2.1.1.10 *Análise de dados*

A análise de dados realizou-se com base na análise multivariada que consiste em qualquer abordagem analítica que considere o comportamento de duas ou mais variáveis simultaneamente.

A interação entre OE, temperaturas e embalagens, foi avaliada através de ANOVA com o programa STATISTIC 2014, em que considerou-se o efeito não significativo quando $p \geq 0,05$; efeito significativo para $p < 0,05$, efeito muito significativo quando $p < 0,01$ e efeito altamente significativo para $p < 0,001$, determinado pelo teste de Tukey HSD (“Honestly Significantly Different”).

Os espectros obtidos pelo FTIR, bem como as análises físico-químicas, sensoriais e microbiológicas foram submetidos a uma análise de componentes principais (PCA) para verificar as diferenças entre as amostras para uma análise qualitativas. Para uma análise quantitativas, os parâmetros microbiana, físico-químicos e sensoriais, são fatores que

contribuem consideravelmente para a variância do conjunto de dados, e a regressão parcial usando mínimos quadrados de regressão (PLS-R) para as variáveis mencionadas. Esta técnica de calibração multivariada, às vezes chamada análise fatorial, transforma as variáveis originais (FTIR absorvâncias espectros) para novas variáveis (conhecidos como variáveis latentes), que são combinação linear das variáveis originais.

Esta análise multivariada baseou-se em duas etapas, a de calibração e de validação cruzada. Na calibração um modelo matemático foi construído para estabelecer uma correlação entre a matriz de espectros de FTIR (variáveis de previsão, X) e da concentração de analitos de (variáveis de resposta, Y) utilizando um conjunto de observações usualmente designado de conjunto de calibração. No caso da validação cruzada o modelo de calibração desenvolvido, foi utilizado para calcular a concentração de amostras não utilizadas para preparar o modelo, sendo que a variável dependente (Y) representou as classes sensoriais para DA ou o pH medido e contagens bacterianas para análise PLS-R.

A análise multivariada realizou-se com o programa XLSTAT. Aplicou-se a Análise em Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante Linear (DA).

CAPÍTULO III-

Resultados e Discussão

Resultados e discussão

2.2.1 Rendimento dos óleos essenciais

Os OE's de *Laurus Nobilis* L. e de *Citrus Sinensis* L., são reconhecidos como Substancias GRAS (geralmente conhecidas como seguras), pelo (FDA, 2015). O rendimento de extração dos óleos essenciais a partir de louro (*Laurus Nobilis* L.), de murta (*Myrtus Communis* L.) e de casca de laranja (*Citrus Sinensis* L.) obtidos pelo método de hidrodestilação com base no peso seco da planta ou fruto encontra-se representado na tabela 8.

Tabela 8: Rendimento da extração dos OE's

Amostra	Peso amostra (g)	Peso amostra seca (g)	Peso OE (g)	Rendimento do OE (p/p)
Louro	167,97	63,33	0,98	0,58
Laranja	250,88	75,98	1,69	0,67
Murta	231,87	60,33	1,32	0,57

O rendimento da extração dos OE's oscila entre 0,57 (p/p) e 0,67 (p/p), sendo que o menor rendimento foi obtido para murta (0,57 p/p) à semelhança do obtido em estudos de análogos (Aleksic e Knezevic, 2014; Hennia *et al.*, 2015a; Zomorodian *et al.*, 2013) 0,61 (p/p), 0,55 (p/p) e 0,69% (p/p), respetivamente. No entanto, numa região de colheita diferente (Marrocos), (Cherrat *et al.*, 2014) obtiveram um rendimento de extração consideravelmente mais elevado de 0,89% (p/p).

Com um rendimento intermédio a partir de folhas de louro, obteve-se um rendimento de OE de 0,58 (p/p), superior ao obtido por outros autores que referem um rendimento de 0,22 (p/p), 0,45 (p/p) e 0,35 (p/p) (Nehir El *et al.*, 2014; Peris e Blázquez, 2015; Sellami *et al.*, 2011), respetivamente, sendo inferior ao rendimento de 0,86% obtido por (Basak e Candan, 2013).

O OE que obteve maior rendimento foi o OE extraído a partir de laranja, 0,67 (p/p), sendo este superior a 0,42 (p/p) obtido por Uysal *et al.* (2011). Contudo, rendimentos de extração superiores de 1,54 (p/p), 0,98 (p/p), 2,23 (p/p) e 1,8 (p/p) foram reportados por (Ademosun *et al.*, 2015; Y. Chen *et al.*, 2014; Debbarma *et al.*, 2012; Sharma e Tripathi, 2008), respetivamente.

A diferença de rendimentos pode ser devida à idade e ciclo da planta e diversidade de zonas geográficas de colheita das folhas das plantas e das laranjas. (Bakkali *et al.*, 2008).

2.2.2 Resultados da concentração mínima inibitória

A atividade antimicrobiana dos OE's sobre microrganismos patogênicos de referência (*E. coli* O₁₅₇:H₇ NCTC 2900 e *L. monocytogenes* ATCC 679) e isolados de populações bacterianas (*E. coli*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., BAL) obtidos a partir de carne bovina da raça Maronesa foi determinada pela concentração mínima inibitória (MIC). Os resultados da MIC dos OE's relativa a esses microrganismos são apresentados na Tabela 9, expressos em µL/mL.

Tabela 9: Concentração mínima inibitória dos OE's em µL/mL

OE (µL/mL)	<i>E. coli</i> O ₁₅₇ :H ₇ (NCTC 2900)	<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 679)	<i>E. coli</i>	Enterobacteriaceae	<i>Pseudomonas</i>	BAL
			Isolados de carne Maronesa			
Murta	25	25	25	25	50	25
Louro	3,12	50	2,34	3,12	3,12	2,34
Laranja	100	100	50	50	50	50

Na determinação da MIC relativa às bactérias patogênicas *E. coli* O₁₅₇:H₇ e *L. monocytogenes*, verificou-se que as MIC do OE de murta e de laranja foram de 25µL/mL e 100µL/mL, respetivamente. No entanto, o OE de louro apresenta 3,12 % para *E. coli* O₁₅₇:H₇ e de 50% para *L. monocytogenes*.

De acordo com os estudos de (Hsouna *et al.*, 2014) e de (Cherrat *et al.*, 2014), as MIC do OE de murta para *E. coli* O₁₅₇:H₇ e *E. coli*, é de 25 µL/mL e 56 µL/ mL, valores semelhantes e superior à obtida no estudo, respetivamente. No estudo de (Cherrat *et al.*, 2014) a MIC de OE de murta para *Listeria monocytogenes* serotipo CECT 4031 foi de 11,5 L µL/mL, ou seja, superior à MIC obtida pelo OE de murta neste estudo.

A MIC obtida pelo OE de laranja relativa às bactérias *E. coli*, e *Listeria monocytogenes* é superior ao do autor (Debbarma *et al.*, 2012) que obteve 1,0 µL/mL para ambas as bactérias.

Em relação ao OE de louro os autores (Cherrat *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2014) obtiveram níveis inferiores de MIC relativamente a *E. coli*, de 14,0 µL/mL, 2,5 µL/mL e 11 µL/mL respetivamente e *Listeria monocytogenes* de 1,0 µL/mL, 2,5 µL/mL e 11 µL/mL respetivamente, com exceção de *E. coli* O₁₅₇: H₇ para q o autor (Cherrat *et al.*, 2014) obteve 4 µL/mL de MIC.

Em suma, numa forma geral os autores obtiveram valores inferiores aos obtidos no presente estudo, isto é, os óleos essenciais possuem um maior poder antimicrobiano, o que pode estar relacionado com a idade e ciclo da planta e diversidade de zonas geográficas de colheita das folhas das plantas e das laranjas.

Relativamente às bactérias deteriorativas isoladas de carne de bovino de raça “Maronesa”, o OE de louro apresentou níveis de MIC mais baixos do que os outros OE, sendo bactericida com valores de 2,34% para as bactérias do ácido láctico (BAL) e com valores de 3,12% para as populações de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp.. O OE de murta obteve níveis superiores ao OE de louro e inferiores ao OE de laranja, sendo bactericida para 25% para *E. coli*, BAL e *Enterobacteriaceae* e com valores de 50% para as *Pseudomonas* spp.. O OE de laranja obteve o efeito bactericida com a MIC de 50% para todas as bactérias deteriorativas estudadas.

Pode concluir-se que o OE de louro apresenta uma atividade antimicrobiana superior aos outros OE's, o qual pode ser devido à presença de maior quantidade e concentração compostos antimicrobianos ao dos restantes OE's (Tabela 10), apresentando percentagens superiores aos outros OE's em terpenóides e fenilpropanóides. São estes os grupos que apresentam atividade antimicrobiana, com exceção para a bactéria *L. monocytogenes* ATCC 679. O OE de laranja tem uma atividade antimicrobiana inferior, caracterizando-se por ser um OE bacteriostático para as bactérias patogénicas, isto é, não inibe completamente o crescimento das bactérias, apenas inibe parcialmente.

Como tal, os resultados permitem concluir que tal como em outros estudos bactérias Gram positivo são mais suscetíveis à atividade antimicrobiana dos OE's (com exceção da, *Listeria monocytogenes*) possivelmente devido à interação da membrana celular, com os polos hidrofóbicos dos OE's. As bactérias Gram negativo são menos suscetíveis, visto que a membrana externa contém lipo-polissacarídeos que cria uma barreira hidrofílica, tornando-as menos suscetíveis à penetração dos compostos hidrofóbicos dos OE's.

2.2.3 Composição volátil dos óleos essenciais

A composição química dos OE's de *Myrtus Communis* L., *Laurus Nobilis* L. e *Citrus Sinensis* L. foi determinado por GC-MS e GC-TCD.

De acordo com a composição química descrita por diversos autores (Cherrat *et al.*, 2014; Gardeli *et al.*, 2008; Hennia *et al.*, 2015a; Hsouna *et al.*, 2014; Tuberoso *et al.*, 2006; Yadegarinia *et al.*, 2006; Zomorodian *et al.*, 2013), os compostos podem ser classificados em três categorias principais: terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), terpenóides e fenilpropanóides.

A Tabela 10 mostra as percentagens de cada um dos compostos voláteis e do seu tempo de retenção correspondente.

Tabela 10: Compostos voláteis principais de OE de *Myrtus Communis* L., *Laurus Nobilis* L. e *Cirtus Sinensis* L. osbeck determinados por GC-MS

Tempo de	Composto	área		
		<i>Myrtus</i>	<i>Laurus</i>	<i>Citrus Sinensis</i>
7,39	2-Hexenal, (E)-	0,73		
7,40	3-Hexen-1-ol		0,38	
8,24	Nonano	0,25	0,35	0,98
8,49	2-metil-propanil,2-metil, ácido	1,75		
8,89	β -Thujeno		0,22	
9,08	α -Pineno, (D)-	4,41	2,12	1,31
9,83	Sabineno		4,48	1,81
9,96	($\pm$)- β -Pineno		2,01	16,13
10,03	β -Myrceno	0,81	2,35	
10,22	2-metil-lbutanoato Isobutil	0,32		
10,24	Octanal			5,35
10,46	2-metil-butil,2-metil, ácido	0,65		
10,55	3-Careno		0,76	1,09
10,92	D-Limoneno	6,22		29,82
11,01	1,8 cineol	9,86	17,58	
11,04	L-Limoneno			4,92
11,12	β -cimeno			0,31
11,42	γ -Terpineno		0,64	
11,46	1-Octanol			1,94
11,61	trans- β -Terpineol		0,57	
11,85	Diallyl disulfeto		0,81	1,71
12,00	α -Terpinoleno			0,29
12,10	β -Linalool	12,30	19,14	4,05
12,13	Nonanal			1,29
12,24	cis-p-Menta-8-en-1-ol		0,24	
12,59	2-Cyclohexeno-1-carboxaldeído,			0,34
13,02	Citronelal			0,66
13,66	Terpinen-4-ol	0,59	3,11	2,59
13,86	α -Terpineol	2,74	4,47	
13,90	Decanal			8,07
14,00	Mirtenol	1,18		
14,26	2-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-			0,78
14,34	Nerol	0,47	0,96	0,77
14,58	Neral			0,77
14,72	Linalilo o-aminobenzoato	5,88	1,56	
15,03	α -Citral			1,35
15,35	Timol		0,29	
15,55	Undecanal			0,24
15,63	(-) - trans-etilo Pinocarvil	1,15		
15,75	Trissulfureto de di-2-propenil			0,42
15,88	3,7- éster metil de Ácido malónico,		1,45	
15,89	Metil geraniato	0,33		
16,05	Mirtenil de etilo	15,45	1,75	
16,27	2-Oxabiciclo[2.2.2]octan-6-ol, 1,3,3-	0,28		
16,37	α -Terpineol de etilo	2,22	11,35	
16,40	Nerol de etilo		0,52	

Tempo	Composto	área		
		<i>Myrtus</i>	<i>Laurus</i>	<i>Citrus Sinensis</i>
16,54	Eugenol		1,48	
16,69	Geranil de etilo	7,37	0,52	0,28
17,09	Metil-eugenol	1,84	2,13	
17,10	Dodecanal			1,06
17,26	p-Menta-1(7),8-dien-9-ol	0,24		
17,61	Dihidrocuminil de etilo	0,30		
17,72	Cariopileno	0,44		0,35
18,11	(6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] hept-2-en-	0,37		
18,22	α -Cariopileno	0,91		
18,69	β -Selineno		0,70	0,66
18,93	7-Isopropil-7-metil-nona-3,5-diene-	1,69	0,27	
19,14	Azulene, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octaídros-		0,38	
19,19	Elemicino		0,31	
19,21	Etanono, 1,1'-(5-hydroxy-2,2-	0,34		
19,95	(-)-Spatulenol		1,14	
20,05	Epóxido de Isoaromadendreno		0,52	
20,07	Óxido de Cariopileno	0,65		
20,19	Viridiflorol		0,30	
20,34	Ledol		0,26	
20,40	1,2-époxido de Humuleno	1,23		
20,67	1-Òxido de Diepicedreno	0,28		
20,69	τ -Murolol		0,25	
20,87	α -Cadinol		0,25	
20,94	β -Eudesmol		0,53	
	Total	83,23	86,18	89,35
	Terpenos	13,03	14,83	59,45
	Monoterpenos	11,44	12,60	55,69
	Sesquiterpenos	1,35	1,08	0,66
	Terpenóides	68,02	66,30	29,90
	Alcoóis	17,05	28,87	10,13
	Ésteres	36,07	17,16	0,63
	Éteres	13,70	18,38	
	Aldeídos	1,20		19,14
	Fenois	-	1,89	
	Fenilpropanóides	2,18	5,05	

Determinaram-se 32 compostos voláteis do OE de murta que representam 83,23% do conteúdo total: terpenos - 13,03%, 11,44% dos quais são monoterpenos e sesquiterpenos 1,35%; terpenóides - 68,02%, dos quais 17,05% são álcoois, 36,07%, 13,70% ésteres e éteres aldeídos 1,20%; fenilpropanóides 2,18%. De acordo com os estudos de vários autores (Hennia *et al.*, 2015a; Tuberoso *et al.*, 2006; Usai *et al.*, 2015; Yadegarinia *et al.*, 2006; Zomorodian *et al.*, 2013), 1,8-cineol e α -pinene são os principais constituintes dos óleos essenciais de murta, enquanto outros (Cherrat *et al.*, 2014; Gardeli *et al.*, 2008; Hsouna *et al.*, 2014) relatam que o composto principal é o myrtenyl acetate. Isto pode ser explicado porque a composição dos OE's

depende da zona geográfica de colheita. Os compostos 1,8-cineol e α -pinene são predominantes na Grécia, Itália, França e Argélia, enquanto que myrtenyl acetate é prevalente em Portugal, Marrocos, Espanha, Tunísia e Albânia. Portanto, confirma-se que o nosso OE é Português.

Os compostos principais do OE de murta são myrtenil de etilo com 15,45%, β -linalol (12,30%), 1,8-cineol (9,86%), geranil de etilo (7,37%), D-limoneno (6,22%), α -pineno (4,41%), α -terpineol (2,74%), metil eugenol (1,84%) e mirtenol (1,18%). Em relação aos compostos principais foram obtidos resultados semelhantes a outros estudos (Cherrat *et al.*, 2014; Hsouna *et al.*, 2014). Quanto ao mirtenol (1,18%) e metil eugenol (1,84%) foram obtidos em concentrações mais elevadas comparativamente aos observados por (Hsouna *et al.*, 2014) com (0,94%) e (1,17%), respetivamente. Curiosamente, nenhum dos estudos mencionados acima relatam a presença de geranil de etilo.

Relativamente ao OE de louro foram determinados 38 compostos, os quais representam 86,18 % do conteúdo total, sendo que 14,83 % são pertencentes à classe dos terpenos, 66,30% dos terpenoides e 1,89% dos fenilpropanoides, salientando que é o único OE que contém fenóis e não contém aldeídos. Os 6 compostos principais β -linalol (19,14%), 1,8 cineol (17,58), α -terpineol de etilo (11,35%), sabinense (4,48%), α -terpineol (4,47%) e Terpen-4-ol (3,11%) representam 60,13 % da totalidade dos 38 compósitos. Segundo outros autores (Cherrat *et al.*, 2014; Hadjibagher Kandi e Sefidkon, 2011; Sellami *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2014) referem teores superiores para os compostos sabinene e 1,8 cineole, com exceção do composto sabinene determinado pelo autor (Sellami *et al.*, 2011) que obteve um valor inferior (1,00%). Para os compostos linalool e terpin-4-ol, os teores obtidos pelos autores anteriormente mencionados foram inferiores, sem fazerem alusão ao composto α -terpineol de etilo.

Identificaram-se 28 compostos presentes no OE de laranja representando 89,35% da totalidade do OE, sendo composto maioritariamente por terpenos com 59,45%, nos quais 55,69 são monoterpenos, 29,90% terpenóides, em que destes 19,14% e 10,13% são aldeídos e álcoois respetivamente. Não apresentando fenóis, éteres e fenilpropanoides. É representado por 7 compostos principais, D-limoneno (29,82%), β -pineno (16,13%), decanal (8,07%), octanal (5,35%), L-limoneno (4,92%), β -linalol (4,05%) e Terpinen-4-ol (2,59%). Relativamente aos compostos principais foram obtidos teores semelhantes pelos autores (Ademosun *et al.*, 2015; Badawy e Abdelgaleil, 2014; Y. Chen *et al.*, 2014; Sharma e Tripathi, 2008; Silveira *et al.*, 2014) e teores inferiores para os compostos linalool e α -pineno, no entanto estes não identificaram os aldeídos octanal e decanal.

O OE de louro é o OE com maior capacidade antimicrobiana devido a ter maior percentagem de compostos como α -pinene, nerol e terpinen-4-ol que de acordo com (Jing *et al.*, 2014) são os que apresentam capacidade antimicrobiana.

2.2.4 Determinações Físico-químicas

As características físico-químicas das amostras determinaram-se por vários métodos tais como pH, cor $L^*a^*b^*$, atividade antioxidante e TBARS, em função da embalagem e do OE durante o tempo de armazenamento.

2.2.4.1 pH

Os valores médios de pH das amostras de carne picada com os OE's de Laranja, Louro e Murta e sem OE ao longo do período de tempo de armazenamento (horas), apresentam-se na Figura 11 e Tabela 11 para a embalagem em aerobiose e na Figura 12 e Tabela 12 para a embalagem a vácuo.

O pH médio (*post-mortem*) obtido no tempo 0h apresenta um valor aproximadamente de 5,70, o que está de acordo com (Jay *et al.*, 2005) que apresenta valores de 5,70 a 5,90 para carnes vermelhas *post mortem*.

Como está evidenciado na Figura 11 a amostra controlo (s/ OE) à temperatura de 2°C apresenta valores de pH constantes até às 24h e um aumento dos valores para 7,50 às 336h, enquanto que a 8°C apresenta um aumento dos valores até 7,61 às 336h de armazenamento, sendo estes valores superiores aos das amostras com OE's. As amostras com OE de louro e laranja à temperatura de 2°C apresentam um comportamento semelhante havendo uma diminuição do valor de pH nas primeiras 24h, um aumento lento até às 84h e um aumento acentuado até às 336h, apresentando valores inferiores o OE de louro até às 240h. A amostra com OE de murta apresenta valores de pH superiores aos das outras amostras com OE's até às 84h e valores inferiores até às 336h devido a um aumento lento de pH. À temperatura de 8°C todas as amostras apresentam um aumento dos valores de pH, sendo que a amostra com OE de laranja apresentam valores inferiores às restantes até às 72h, passando depois as amostras com OE de murta a apresentar valores inferiores de pH.

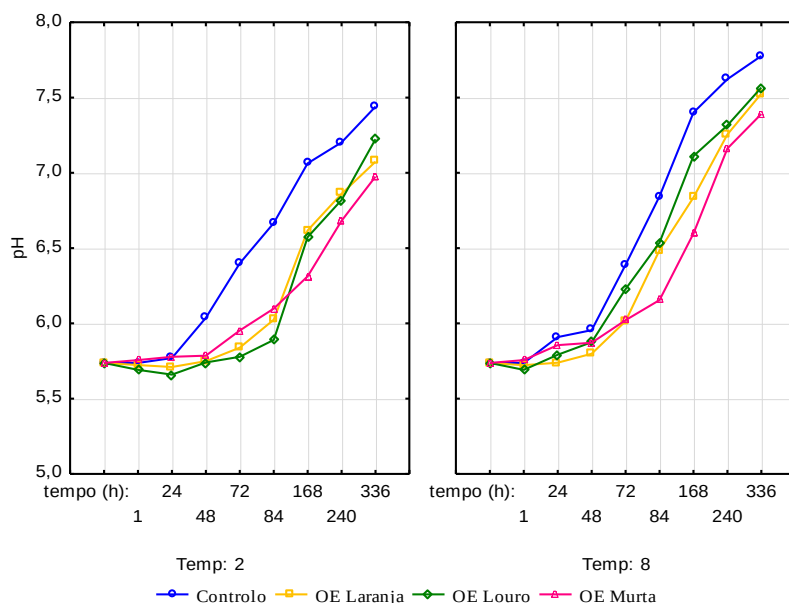


Figura 11: Gráfico de evolução do pH da carne embalada em Aerobiose com os óleos essenciais de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C

Na tabela 11, podemos verificar que as amostras embaladas em aerobiose apresentam diferenças significativas para o efeito da temperatura a partir das 84h e o efeito do OE a partir das 48h de armazenamento. Salienta-se que a amostra com OE de murta difere significativamente do controlo desde as 48h até às 336h, com exceção às 48h. A tabela indica-nos ainda que não existe interação entre efeito temperaturas e OE.

Tabela 11: Valores de pH (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose.

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	Tx OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	5,737±0,009 ^a	5,737±0,008 ^a	ns	5,737±0,013 ^a	5,737±0,013 ^a	5,737±0,013 ^a	5,737±0,013 ^a	ns	ns
1	5,727±0,016 ^a	5,727±0,016 ^a	ns	5,737±0,023 ^a	5,723±0,023 ^a	5,691±0,023 ^a	5,756±0,023 ^a	ns	ns
24	5,729±0,026 ^a	5,824±0,026 ^a	ns	5,839±0,036 ^a	5,725±0,036 ^a	5,726±0,036 ^a	5,817±0,036 ^a	ns	ns
48	5,828±0,031 ^a	5,875±0,031 ^a	ns	5,996±0,040 ^b	5,774±0,040 ^a	5,808±0,040 ^{ab}	5,829±0,040 ^{ab}	*	ns
72	5,992±0,068 ^a	6,163±0,068 ^a	ns	6,394±0,096 ^b	5,927±0,096 ^a	6,003±0,096 ^a	5,987±0,096 ^a	*	ns
84	6,170±0,070 ^a	6,150±0,070 ^b	***	6,755±0,099 ^b	6,255±0,099 ^a	6,214±0,099 ^a	6,126±0,099 ^a	***	ns
168	6,642±0,072 ^a	6,986±0,072 ^b	***	7,232±0,102 ^b	6,727±0,102 ^a	6,842±0,102 ^{ab}	6,454±0,102 ^a	***	ns
240	6,890±0,065 ^a	7,338±0,065 ^b	***	7,412±0,091 ^b	7,057±0,091 ^{ab}	7,067±0,091 ^{ab}	6,922±0,091 ^a	*	ns
336	7,178±0,068 ^a	7,568±0,068 ^b	***	7,608±0,096 ^b	7,299±0,096 ^{ab}	7,395±0,096 ^{ab}	7,183±0,096 ^a	*	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

As amostras de controlo, com OE de laranja, de louro e de murta embaladas a vácuo estão ilustradas na Figura 12. Para ambas as temperaturas há uma diminuição dos valores de pH para todas as amostras sendo esta diminuição menor para a amostra de controlo comparativamente às amostras com OE's. Na primeira hora de armazenamento as amostras com OE's de murta e louro apresentam uma diminuição mais acentuada, sendo que à temperatura de 2°C, de forma geral, as amostras com OE de murta apresenta valores inferiores e à temperatura de 8°C a amostra com OE de laranja apresenta uma diminuição maior até estabilizar às 336h.

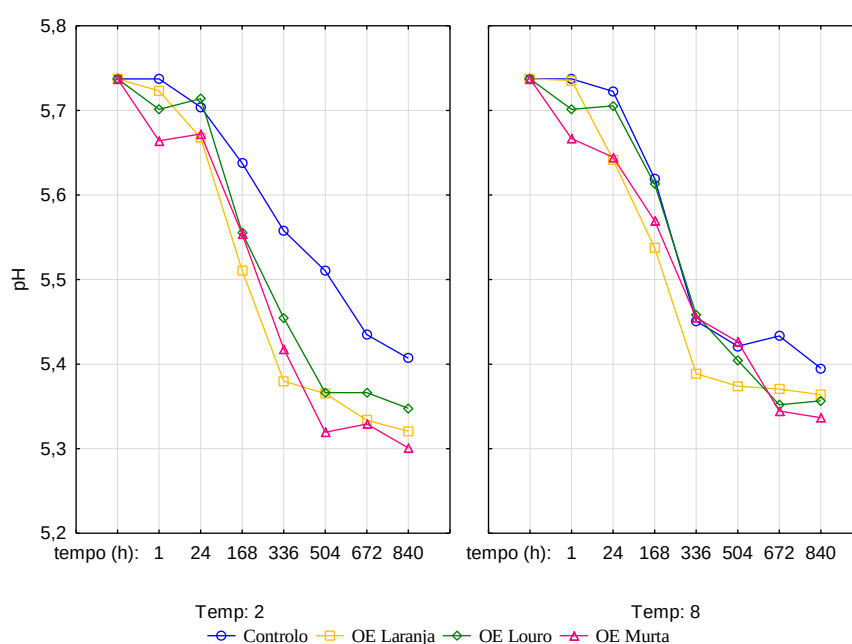


Figura 12: Gráfico de evolução do pH da carne embalada a vácuo com os óleos essenciais de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C

Para as amostras embaladas sob vácuo, não se observaram diferenças significativas entre as temperaturas e entre as amostras com e sem OE's, em cada tempo de armazenamento, como se pode verificar pela leitura da Tabela 12.

Apesar de não se observarem diferenças significativas, os valores de pH são ligeiramente superiores à temperatura de 8°C comparativamente com a temperatura de 2°C em ambas as embalagens. Salvaguardando as exceções das amostras com OE de murta, estas amostras são as que são mais benéficas para o pH da carne em ambas as temperaturas.

Tabela 12: Valores de pH (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalados a vácuo.

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig.	Óleo essencial				Sig.	Tx
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	5,737±0,009 ^a	5,737±0,008 ^a	ns	5,737±0,013 ^a	5,737±0,013 ^a	5,737±0,013 ^a	5,737±0,013 ^a	ns	ns
1	5,706±0,018 ^a	5,710±0,018 ^a	ns	5,737±0,025 ^a	5,729±0,025 ^a	5,701±0,025 ^a	5,665±0,025 ^a	ns	ns
24	5,689±0,018 ^a	5,679±0,018 ^a	ns	5,713±0,026 ^a	5,655±0,026 ^a	5,710±0,026 ^a	5,658±0,026 ^a	ns	ns
168	5,564±0,035 ^a	5,585±0,035 ^a	ns	5,628±0,050 ^a	5,524±0,050 ^a	5,584±0,050 ^a	5,562±0,050 ^a	ns	ns
336	5,453±0,026 ^a	5,438±0,026 ^a	ns	5,504±0,037 ^a	5,384±0,037 ^a	5,456±0,037 ^a	5,437±0,037 ^a	ns	ns
504	5,390±0,027 ^a	5,407±0,027 ^a	ns	5,466±0,038 ^a	5,370±0,038 ^a	5,385±0,038 ^a	5,373±0,038 ^a	ns	ns
672	5,366±0,026 ^a	5,375±0,026 ^a	ns	5,434±0,037 ^a	5,352±0,037 ^a	5,359±0,037 ^a	5,337±0,037 ^a	ns	ns
840	5,344±0,027 ^a	5,363±0,027 ^a	ns	5,401±0,038 ^a	5,342±0,038 ^a	5,352±0,038 ^a	5,319±0,038 ^a	ns	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Após análise dos resultados da evolução do pH com amostras de OE's em diferentes embalagens e em duas temperaturas distintas, pode considerar-se que o pH aumenta em amostras embaladas em aerobiose, possivelmente devido à formação de compostos aminados pela atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. (Argyri *et al.*, 2011).

Sob vácuo há a ausência de oxigénio disponível, havendo assim a multiplicação de BAL, produtoras de ácidos, o que leva a uma diminuição dos valores de pH (Argyri *et al.*, 2011).

2.2.4.2 Coordenadas de Cor $L^*a^*b^*$

A determinação da cor objetiva das amostras de carne é baseada em três coordenadas L^* , a^* e b^* , em que L^* mede a variação da luminosidade entre o preto (0) e o branco (100) correspondente ao escuro e ao claro, o a^* é uma das coordenadas da cromaticidade, e define a cor vermelha para valores positivos e a cor verde para valores negativos e o b^* é a coordenada da cromaticidade que define a cor amarela para valores positivos e a cor azul para valores negativos.

Os resultados da determinação dos parâmetros $L^*a^*b^*$ da cor estão apresentados separadamente de acordo com o tipo de embalagem e óleo essencial nos gráficos de evolução ao longo do período de armazenamento.

2.2.4.2.1 Parâmetro L*

Os valores médios do parâmetro L* das amostras de carne picada com os OE's de Laranja, Louro e Murta e sem OE são apresentados na Figura 13 e Tabela 13 para a embalagem em aerobiose e na Figura 14 e Tabela 14 para a embalagem a vácuo.

O valor médio do parâmetro L* no tempo inicial (0 h) é de 43,81. Pela análise da Figura 13, verifica-se que as amostras controlo apresentam um declínio do parâmetro L* ao longo do tempo em ambas as temperaturas, decrescendo até valores de aproximadamente 39,50 à temperatura de 2°C e para valores de aproximadamente 38,00 à temperatura de 8°C. As amostras inoculadas com OE's têm um aumento da luminosidade em ambas as temperaturas até às 24h, salientando-se as amostras com OE de murta e de laranja até 46,00 e 45,50 para as temperaturas de 2°C e 8°C, respectivamente, e a amostra com OE de louro para valores de 45,20 e 45,00 aproximadamente às temperaturas de 2°C e 8°C, respectivamente.

Às 336h as amostras apresentam um valor de diferença de luminosidade entre as temperaturas, sendo esse valor inferior à temperatura de 2°C. De salientar que as amostras com OE de murta apresentam valores de luminosidade superiores.

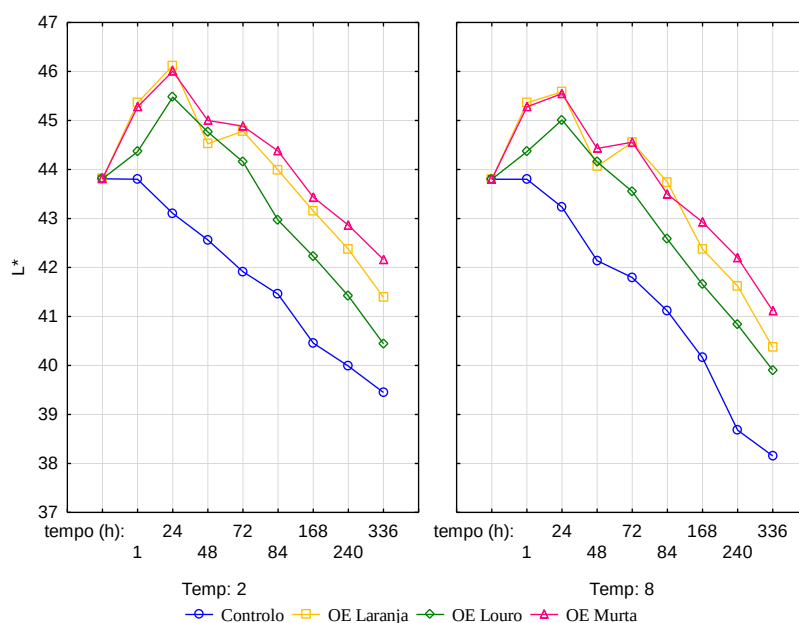


Figura 13: Gráfico de evolução do parâmetro L* da cor de carne picada embalada em Aerobiose com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C.

Na Tabela 13, pode observar-se que não existe qualquer efeito da temperatura e da aplicação de OE's na matriz cárnea, relativo ao parâmetro L*.

Tabela 13: Valores do parâmetro L* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	Tx OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	43,810±0,840 ^a	43,810±0,840 ^a	ns	43,810±0,840 ^a	43,810±0,840 ^a	43,810±0,840 ^a	43,810±0,840 ^a	ns	ns
1	44,701±0,802 ^a	44,701±0,802 ^a	ns	43,800±1,112 ^a	45,360±1,112 ^a	44,363±1,112 ^a	45,280±1,112 ^a	ns	ns
24	45,166±0,692 ^a	44,843±0,692 ^a	ns	43,166±0,979 ^a	45,853±0,979 ^a	45,243±0,979 ^a	45,778±0,979 ^a	ns	ns
48	44,213±1,073 ^a	43,678±1,073 ^a	ns	42,350±1,518 ^a	44,295±1,518 ^a	44,460±1,518 ^a	44,715±1,518 ^a	ns	ns
72	43,934±0,680 ^a	43,613±0,680 ^a	ns	41,853±0,962 ^a	44,668±0,962 ^a	43,853±0,962 ^a	44,720±0,962 ^a	ns	ns
84	43,198±0,609 ^a	42,731±0,609 ^a	ns	41,283±0,861 ^a	43,865±0,861 ^a	42,772±0,861 ^a	43,937±0,861 ^a	ns	ns
168	43,318±0,590 ^a	41,777±0,590 ^a	ns	40,307±0,835 ^a	42,763±0,835 ^a	41,938±0,835 ^a	43,180±0,835 ^a	ns	ns
240	41,661±0,565 ^a	40,833±0,565 ^a	ns	39,333±0,799 ^a	41,997±0,799 ^a	41,127±0,799 ^a	42,532±0,799 ^a	ns	ns
336	40,863±0,511 ^a	39,886±0,511 ^a	ns	38,802±0,723 ^a	40,882±0,723 ^a	40,173±0,723 ^a	41,640±0,723 ^a	ns	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Na Figura 14, pode observar-se que as amostras controlo apresentam um decréscimo nos valores de luminosidade em ambas as temperaturas e uma subida da luminosidade para as amostras com OE's até às 24h. Em todas as amostras o valor do parâmetro L* é superior à temperatura 2°C e na amostra com OE de murta, que obteve também valores superiores, atingiu um valor aproximado de 39,80 às 840h na temperatura de 2°C.

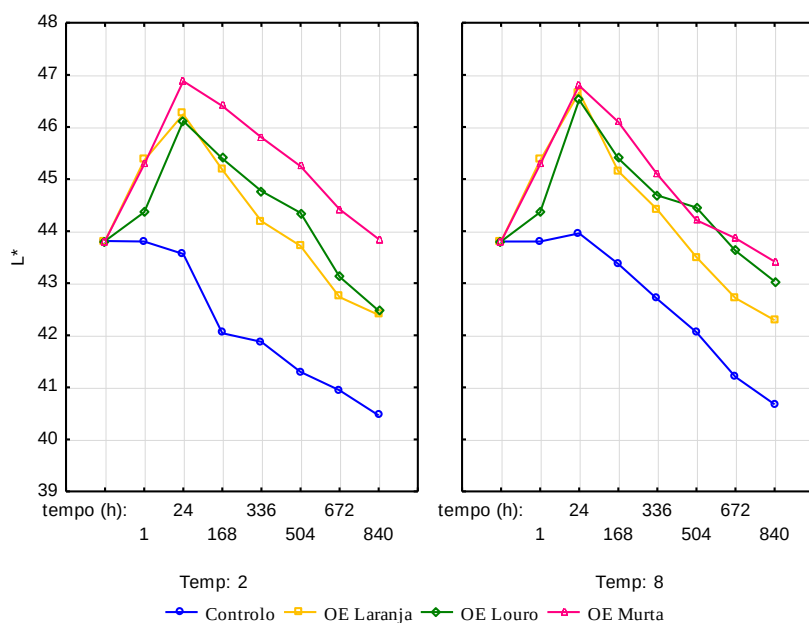


Figura 14: Gráfico de evolução do parâmetro L* da cor de carne picada embalada a vácuo com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C

De modo idêntico à Tabela 13, na tabela 14 verifica-se que neste parâmetro não existem diferenças significativas entre temperaturas e entre OE's, nem interação temperatura x OE's.

Tabela 14: Valores do parâmetro L* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig.	Óleo essencial				Sig.	Tx
	2	8	Temp	Controlo	Laranja	Louro	Murta	OE	OE
0	43,810±0,840 ^a	43,810±0,840 ^a	ns	43,810±0,840 ^a	43,810±0,840 ^a	43,810±0,840 ^a	43,810±0,840 ^a	ns	ns
1	44,701±0,802 ^a	44,701±0,802 ^a	ns	43,800±1,112 ^a	45,360±1,112 ^a	44,363±1,112 ^a	45,280±1,112 ^a	ns	ns
24	45,700±0,822 ^a	45,593±0,822 ^a	ns	43,758±1,163 ^a	46,453±1,163 ^a	46,318±1,163 ^a	46,837±1,163 ^a	ns	ns
168	44,754±0,752 ^a	45,003±0,752 ^a	ns	42,705±1,063 ^a	45,165±1,063 ^a	45,395±1,063 ^a	46,250±1,063 ^a	ns	ns
336	44,158±0,769 ^a	44,222±0,769 ^a	ns	42,286±1,088 ^a	44,302±1,088 ^a	44,728±1,088 ^a	45,445±1,088 ^a	ns	ns
504	44,653±0,708 ^a	43,556±0,708 ^a	ns	41,678±1,000 ^a	43,608±1,000 ^a	44,402±1,000 ^a	44,728±1,000 ^a	ns	ns
672	42,805±0,660 ^a	42,705±0,660 ^a	ns	41,072±0,934 ^a	42,723±0,934 ^a	43,373±0,934 ^a	44,142±0,934 ^a	ns	ns
840	42,293±0,625 ^a	42,354±0,625 ^a	ns	40,68±0,885 ^a	42,341±0,885 ^a	42,754±0,885 ^a	43,630±0,885 ^a	ns	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Após uma análise das Figuras 13 e 14 pode aferir-se que os valores médios do parâmetro de luminosidade é superior na temperatura de armazenamento a 2°C e na embalagem de vácuo.

Em ambas as embalagens as amostras com OE obtiveram valores médios superiores ao valor da amostra de controlo. Os OE's mais benéficos para o parâmetro L^* da cor da carne são a murta e a laranja.

2.2.4.2.2 Parâmetro a^*

Os valores médios do parâmetro a^* em que valores mais positivos possuem maior componente vermelha e valores mais negativos possuem maior componente verde, estão apresentados na Figura 15 e Tabela 15 para a embalagem em aerobiose e na Figura 16 e Tabela 16 para a embalagem a vácuo. O valor inicial do parâmetro a^* é de 22,37 para para as amostras às 0h.

Assim como o observado no parâmetro L^* , na Figura 15 o controlo apresenta um declínio até às 336h de armazenamento em ambas as temperaturas de 2 e 8°C com valores de 15,00 e 14,2 aproximadamente, respetivamente. Com um comportamento também semelhante ao parâmetro L^* , há um aumento do valor de a^* nas amostras inoculadas com OE's, diferindo que o valor se mantém constante durante a 1h e depois aumenta até às 48h, ou seja um aumento da intensidade da cor vermelha, perdendo esta cor a intensidade até às 336h, sendo ele inferior para a amostra de OE de murta com valores aproximados de 20,3 e 19,2 relativo às temperaturas de 2°C e 8°C, respetivamente.

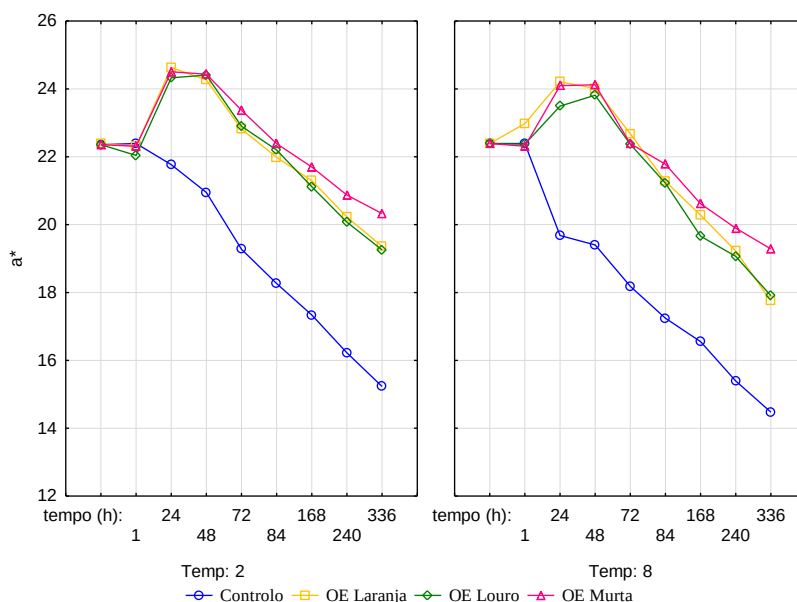


Figura 15: Gráfico de evolução do parâmetro a^* da cor de carne picada embalada em Aerobiose com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C

Analisando a Tabela 15 verifica-se que existe efeito da temperatura e efeito da aplicação dos OE's, não havendo interação no efeito da temperatura e da aplicação dos OE's. Havendo

apenas efeito da temperatura às 168h, e efeito da aplicação dos OE's às 24h, referindo-se que às 24h apenas a amostra com OE de laranja é diferente significativamente da amostra controlo, e das 48h inclusive até às 240h todas as amostras com OE são significativamente diferentes do controlo e às 336h não é só a amostra controlo que é diferente significativamente das outras amostras, como também a amostra com OE de murta é diferente significativamente de todas as amostras.

Tabela 15: Valores do parâmetro a^* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig.	Óleo essencial				Sig.	Tx
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	22,365±0,925 ^a	22,365±0,925 ^a	ns	22,365±1,001 ^a	22,365±1,001 ^a	22,365±1,001 ^a	22,365±1,001 ^a	ns	ns
1	22,533±0,762 ^a	21,233±0,762 ^a	ns	22,393±1,080 ^a	22,643±1,080 ^a	22,207±1,080 ^a	22,310±1,206 ^a	ns	ns
24	23,808±0,631 ^a	22,869±0,631 ^a	ns	20,725±0,892 ^a	24,418±0,892 ^b	23,910±0,892 ^{ab}	24,300±0,892 ^{ab}	*	ns
48	23,514±0,471 ^a	22,838±0,471 ^a	ns	20,175±0,666 ^b	24,140±0,666 ^a	24,110±0,666 ^a	24,278±0,666 ^a	**	ns
72	22,093±0,410 ^a	21,405±0,401 ^a	ns	18,730±0,579 ^b	22,747±0,579 ^a	22,637±0,579 ^a	22,882±0,579 ^a	***	ns
84	21,209±0,401 ^a	20,379±0,401 ^a	ns	17,753±0,567 ^b	21,628±0,567 ^a	21,710±0,567 ^a	22,085±0,567 ^a	***	ns
168	20,363±0,335 ^b	19,278±0,335 ^a	*	16,945±0,473 ^b	20,788±0,473 ^a	20,390±0,473 ^a	21,157±0,473 ^a	***	ns
240	19,349±0,243 ^b	18,395±0,243 ^a	*	15,808±0,344 ^b	19,727±0,344 ^a	19,568±0,344 ^a	20,385±0,344 ^a	***	ns
336	18,543±0,190 ^b	17,354±0,190 ^a	***	14,853±0,268 ^b	18,555±0,268 ^a	18,582±0,268 ^a	19,805±0,268 ^c	***	ns

A

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

A Figura 16, apresenta-nos a evolução das amostras embaladas sob vácuo e armazenadas à temperatura de 2°C e 8°C. Observou-se um valor de a^* constante durante a 1h e um aumento do valor de a^* até às 48h nas amostras inoculadas com OE's de laranja, de louro e de murta, a partir das 48h observa-se um decréscimo do valor de a^* até às 840h. A amostra inoculada com OE de murta obteve o mesmo valor de a^* em ambas as temperaturas de 20,13 aproximadamente.

Observa-se ainda que a amostra controlo obteve um declínio até às 840h, salientando-se o comportamento desta amostra relativamente à temperatura de 8°C que obteve um decréscimo mais acentuado comparativamente à temperatura de 2°C, até ao valor de 10,00, apresentando assim um aumento da componente verde, comparativamente com as amostras inoculadas com OE's.

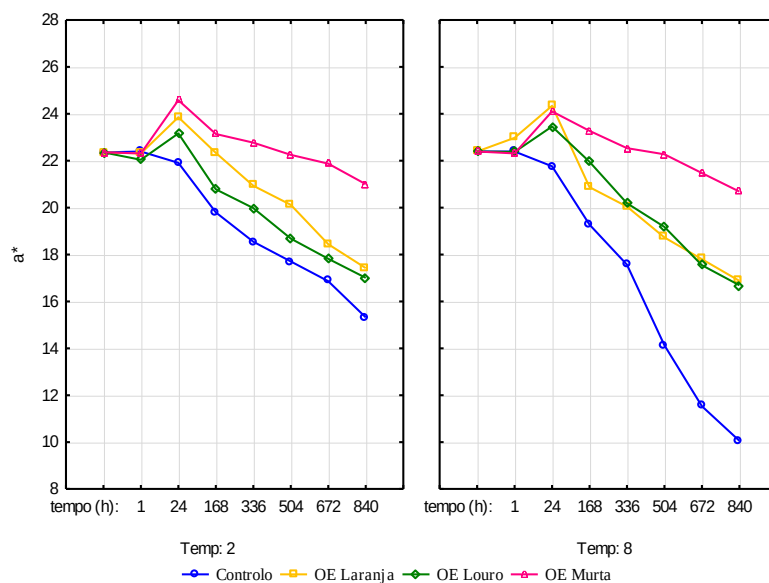


Figura 16: Gráfico de evolução do parâmetro a^* da cor de carne picada embalada a Vácuo com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C

A Tabela 15 apresenta um efeito da temperatura e da aplicação dos OE's nas amostras, assim como interação entre estes efeitos. Havendo apenas diferenças significativas das temperaturas às 168h, e do efeito da aplicação dos OE's às 24h, referindo-se que às 24h apenas a amostra com OE de laranja é diferente significativamente da amostra controlo, e das 48h inclusive até às 240h todas as amostras inoculadas com OE's são significativamente diferentes das amostras controlo, às 336h as amostras de controlo e as amostras com OE de murta são diferentes significativamente das amostras com OE's de laranja e de louro.

Tabela 16: Valores do parâmetro a* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	22,365±0,925 ^a	22,365±0,925 ^a	ns	22,365±1,001 ^a	22,365±1,001 ^a	22,365±1,001 ^a	22,365±1,001 ^a	ns	ns
1	22,533±0,762 ^a	21,233±0,762 ^a	ns	22,393±1,080 ^a	22,643±1,080 ^a	22,207±1,080 ^a	22,310±1,206 ^a	ns	ns
24	23,378±0,729 ^a	23,417±0,729 ^a	ns	21,837±1,030 ^a	24,098±1,030 ^a	23,312±1,030 ^a	24,342±1,030 ^a	ns	ns
168	21,513±0,716 ^a	21,343±0,716 ^a	ns	19,535±1,013 ^a	21,605±1,013 ^a	21,367±1,013 ^a	23,207±1,013 ^a	ns	ns
336	20,558±0,682 ^a	20,083±0,682 ^a	ns	18,057±0,964 ^a	20,488±0,964 ^{ab}	20,085±0,964 ^{ab}	22,653±0,964 ^a	*	ns
504	19,688±0,723 ^a	18,577±0,723 ^a	ns	15,917±1,023 ^a	19,423±1,023 ^{ab}	18,928±1,023 ^{ab}	22,262±1,023 ^b	**	ns
672	18,748±0,676 ^a	17,088±0,676 ^a	ns	14,195±0,957 ^a	18,120±0,957 ^{bc}	17,680±0,957 ^{ab}	21,677±0,957 ^c	***	ns
840	17,687±0,549 ^a	16,075±0,549 ^a	ns	12,687±0,777 ^b	17,147±0,777 ^a	16,847±0,777 ^a	20,843±0,777 ^c	***	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Em suma, as amostras inoculadas com OE de murta apresentam maior componente vermelha que as outras amostras inoculadas com OE's e as amostras de controlo maior componente verde. Sendo esta componente vermelha mais saliente nas amostras embaladas sob vácuo e armazenadas à temperatura de 2°C.

2.2.4.2.3 Parâmetro b*

O valor médio da coordenada b* das amostras de carne picada inoculadas com os OE's de Laranja, Louro e Murta e as amostras de controlo estão evidenciado na Figura 17 e Tabela 17 para a embalagem em aerobiose e na Figura 18 e Tabela 18 para a embalagem a vácuo, apresentando um valor de 10,13 para ambas as embalagens.

Todos os parâmetros de cor estão correlacionados, este parâmetro apresenta um comportamento igual ao dos parâmetros L* e a*, sendo que na Figura 17, as amostras de controlo decrescem ao longo do período de armazenamento, as amostras com OE's mantiveram-se constantes na 1h com exceção da amostra com OE de murta que aumentou logo a partir do tempo 0 até às 24h, bem como as amostras com OE de louro e laranja também aumentaram o valor de b* até às 24h.

Por ordem crescente, a intensidade do aumento da componente amarela foram as amostras com OE's de louro, laranja e murta, em ambas as temperaturas, no entanto, o aumento foi superior na temperatura de 2°C com valores aproximados de 10,8, 11,3 e 12,5,

respectivamente à ordem crescente. À temperatura de 8°C estes valores diminuem cerca de 0,5 valores em todas as amostras no respetivo tempo de armazenamento.

Há ainda um decréscimo do valor de a^* desde as 24h até às 336h, sendo estes decréscimo menor à temperatura de 2°C e nas amostras com OE de murta.

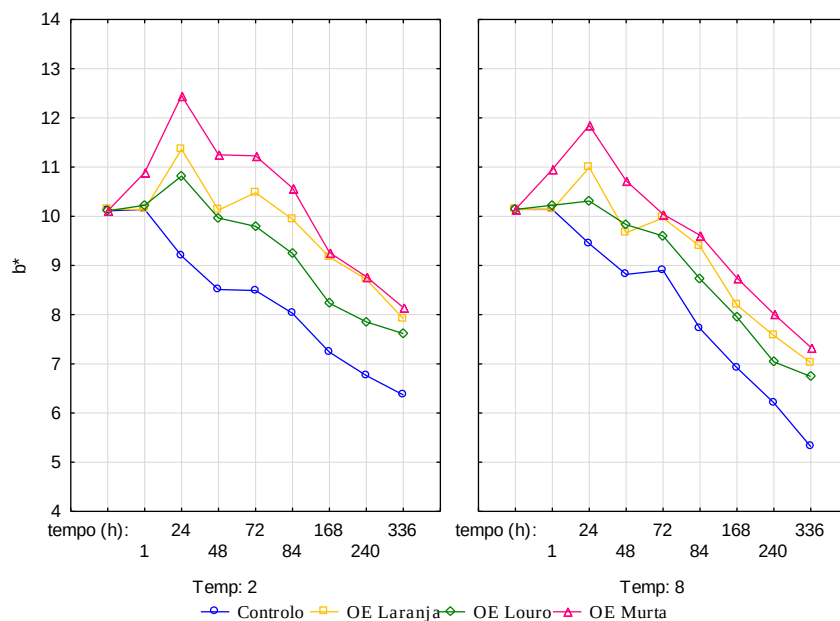


Figura 17: Gráfico de evolução do parâmetro b^* da cor de carne picada embalada em Aerobiose com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C

Observando-se a Tabela 17, existe efeito da temperatura e do efeito da aplicação dos OE's às 240h e 24h, respectivamente. Bem como existe interação entre os dois efeitos. As amostras inoculadas com OE's são parecidas significativamente desde as 24h até às 336h, e as amostras inoculadas com OE de murta são diferentes significativamente das amostras controlo, diferindo assim das amostras com OE's de louro, sendo estas amostras inoculadas com OE's de louro parecidas significativamente das amostras controlo desde as 24h até às 240h.

Tabela 17: Valores do parâmetro b* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig.	Óleo essencial				Sig.	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	10,125±0,282 ^a	10,125±0,282 ^a	ns	10,125±0,402 ^a	10,125±0,402 ^a	10,125±0,402 ^a	10,125±0,402 ^a	ns	ns
1	10,348±0,441 ^a	10,348±0,441 ^a	ns	10,140±0,624 ^a	10,140±0,624 ^a	10,223±0,624 ^a	10,920±0,624 ^a	ns	ns
24	10,956±0,294 ^a	10,649±0,294 ^a	ns	9,318±0,416 ^b	11,178±0,416 ^a	10,563±0,416 ^{ab}	12,150±0,416 ^a	**	ns
48	9,963±0,243 ^a	9,759±0,243 ^a	ns	8,695±0,345 ^a	10,223±0,345 ^{ab}	9,898±0,345 ^{ab}	10,985±0,345 ^b	*	ns
72	9,963±0,243 ^a	9,759±0,243 ^a	ns	8,665±0,457 ^a	9,895±0,457 ^{ab}	9,697±0,457 ^{ab}	10,635±0,457 ^b	*	ns
84	9,445±0,258 ^a	8,861±0,258 ^a	ns	7,872±0,365 ^b	9,662±0,365 ^a	8,985±0,365 ^{ab}	10,093±0,365 ^a	**	ns
168	8,477±0,215 ^a	7,953±0,215 ^a	ns	7,078±0,303 ^b	8,663±0,303 ^a	8,093±0,303 ^{ab}	9,005±0,303 ^a	**	ns
240	8,025±0,188 ^b	7,208±0,188 ^a	**	6,483±0,266 ^b	8,145±0,266 ^a	7,447±0,266 ^{ab}	8,392±0,266 ^a	***	ns
336	7,510±0,175 ^b	6,605±0,175 ^a	**	5,842±0,248 ^b	7,470±0,248 ^a	7,178±0,248 ^a	7,740±0,248 ^a	***	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Nos gráficos de evolução do parâmetro a*, Figura 18, observando-se valores superiores aos da Figura 17, mesmo comportando-se de igual forma em relação a todas as amostras.

Denota-se que o aumento do parâmetro a* à temperatura de 2°C é superior à de 8°C e a ambas as temperaturas da embalagem de aerobiose. O valor do a* às 840 h da amostra com OE de murta que é superior ao valor inicial, bem como a amostra com OE de laranja é igual ao inicial, assim como as amostras com OE de louro e controlo têm um valor próximo do inicial, sendo esse valor superior na amostra de louro comparativamente com a amostra controlo que obtém um valor de 9,7 aproximadamente. O que se relatou em relação à temperatura 2°C não acontece com a temperatura 8°C, em que o controlo apresenta um valor próximo de 8,0 às 840h.

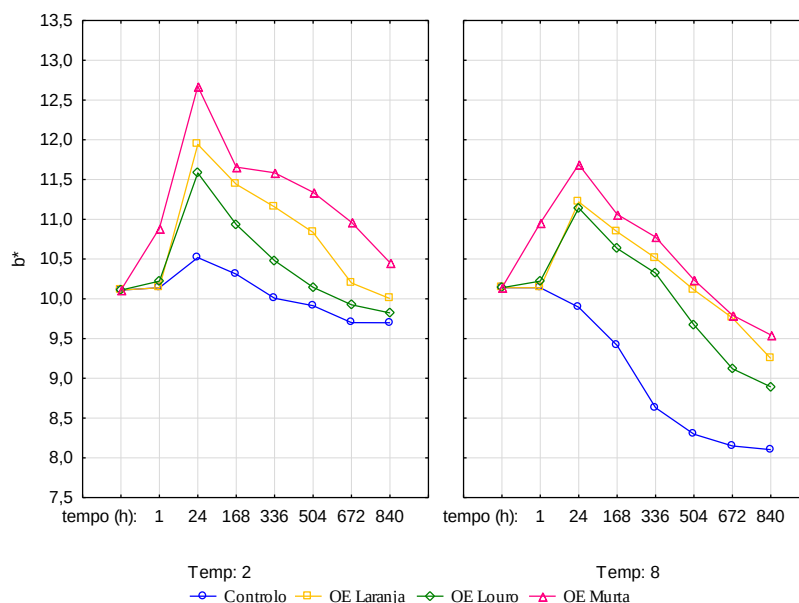


Figura 18: Gráfico de evolução do parâmetro b^* da cor de carne picada embalada a vácuo com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C

Após análise da Tabela 18, pode aferir-se que não há qualquer efeito da temperatura e da aplicação de OE's nas amostras.

Tabela 18: Valores do parâmetro b^* (média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	10,125±0,282 ^a	10,125±0,282 ^a	ns	10,125±0,402 ^a	10,125±0,402 ^a	10,125±0,402 ^a	10,125±0,402 ^a	ns	ns
1	10,348±0,441 ^a	10,348±0,441 ^a	ns	10,140±0,624 ^a	10,140±0,624 ^a	10,223±0,624 ^a	10,920±0,624 ^a	ns	ns
24	11,680±0,495 ^a	10,987±0,495 ^a	ns	10,207±0,701 ^a	11,582±0,701 ^a	11,363±0,701 ^a	12,182±0,701 ^a	ns	ns
168	11,086±0,570 ^a	10,488±0,570 ^a	ns	9,862±0,806 ^a	11,142±0,806 ^a	10,784±0,806 ^a	11,360±0,806 ^a	ns	ns
336	10,807±0,586 ^a	10,061±0,586 ^a	ns	9,318±0,828 ^a	10,834±0,828 ^a	10,403±0,828 ^a	11,181±0,828 ^a	ns	ns
504	10,558±0,562 ^a	9,581±0,562 ^a	ns	9,105±0,795 ^a	10,474±0,795 ^a	9,909±0,795 ^a	10,790±0,795 ^a	ns	ns
672	10,198±0,517 ^a	9,206±0,517 ^a	ns	8,926±0,730 ^a	9,980±0,730 ^a	9,523±0,730 ^a	10,378±0,730 ^a	ns	ns
840	9,995±0,490 ^a	8,948±0,490 ^a	ns	8,903±0,694 ^a	9,627±0,694 ^a	9,358±0,694 ^a	10,001±0,694 ^a	ns	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Para a coordenada b^* obteve-se efeito das temperaturas e efeito da aplicação dos OE's, bem como existe interação entre os dois efeitos.

Em ambas as embalagens, as amostras com OE obtiveram valores médios de b^* superiores ao valor da amostra de controlo.

Os OE's mais benéficos presentes nas amostras para L^* , a^* e b^* da cor da carne são o OE de murta e de laranja.

2.2.4.3 Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante dos óleos essenciais de laranja, louro e murta está apresentada na Tabela 19 e é expressa por $\mu\text{mol Trolox/g}$ de amostra.

O OE de louro apresenta o valor superior de atividade antioxidante com 18,86 $\mu\text{mol Trolox/g}$ amostra e o OE que apresenta o valor inferior é o de murta com valor de 5,37 $\mu\text{mol Trolox/g}$ amostra.

Tabela 19: Resultados da atividade antioxidante dos OE's

Amostra	Atividade Antioxidante ($\mu\text{mol Trolox/g}$ amostra)
Louro	18,86
Laranja	6,74
Murta	5,37

Estes resultados podem ser devidos ao fato do, OE de louro ter uma maior percentagem de compostos voláteis com atividade antioxidante, como o linalool e eugenol, o OE de laranja e de murta apresentarem compostos antioxidantes como o limonene, e o linalool, (em que este último está em menor % que o OE de louro). bem como ao OE de louro conter fenóis (compostos fenólicos), enquanto que os outros dois OE não contêm.

Segundo (Moura 2014) os resultados da atividade antioxidante em extrato de película de uvas com valores de 8,13 $\mu\text{mol Trolox/g}$ amostra a 13,13 $\mu\text{mol Trolox/g}$ amostra, pode aferir-se que o OE de louro apresenta maior atividade antioxidante.

2.2.4.4 TBARS

Os resultados da avaliação da oxidação lipídica das amostras em estudo obtido pelo método de determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS), estão evidenciados na Figura 19 e Tabela 20 para a embalagem de aerobiose e na Figura 20 e Tabela 21 para a embalagem a vácuo. Os resultados foram expressos por mg de malonaldeído /100g de amostra. Sendo o malonaldeído um composto resultante da oxidação lipídica da carne.

O valor inicial btido para a carne fresca de bovino picada foi de 0,129 mg de malonaldeído/100g de amostra.

A Figura 19 apresenta-nos informação de que em ambas as temperaturas as amostras sofrem um aumento de teores de TBARS a partir das 72h, sendo este aumento superior à temperatura de 8°C.

Todas as amostras de 2°C apresentam o mesmo comportamento, em que os níveis de TBARS das amostras mantém-se constante até às 48h, verificando-se que as amostras com OE de laranja e de murta apresentam uma oxidação lenta até às 84h, com valores inferiores a 0,20 mg de malonaldeído /100g de amostra. A amostra controlo apresenta teores de TBARS que aumentam de forma mais evidente, obtendo-se um valor de aproximadamente de 0,75 mg de malonaldeído/100g de amostra às 336h.

À temperatura de 8°C as amostras com OE's apresentam valores constantes até às 24, verificando-se um aumento exponencial da amostra controlo, obtendo valores de 1,05 mg de malonaldeído /100g de amostra.

As amostras com OE's apresentam sempre valores de TBARS inferiores aos obtidos nas amostras controlo em ambas as temperaturas isto pode confirmar que os OE's apresentam atividade antioxidante como evidenciado anteriormente. As amostras com OE de murta apresentam valores inferiores de TBARS comparativamente às outras amostras em ambas as temperaturas.

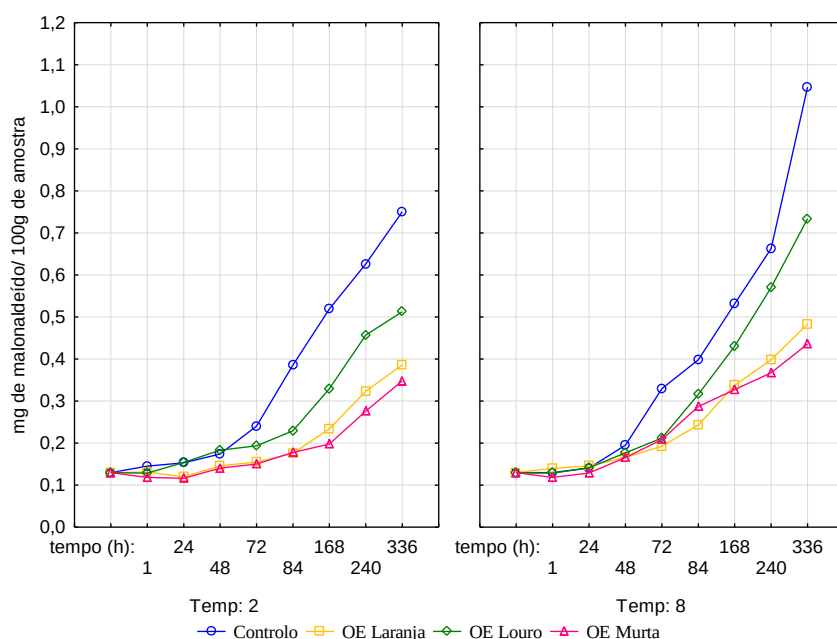


Figura 19: Gráfico de evolução da oxidação lipídica pelo método de TBARS de carne picada embalada a aerobiose com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C

Na Tabela 20, podemos verificar um efeito da temperatura de armazenamento e da aplicação de OE a partir das 72h até às 336h, com exceção das 84h de armazenamento. As amostras controlo apresentam diferenças significativas com todas as amostras inoculadas com OE, não diferindo estes últimos entre si, exceto às 336h de armazenamento em que as amostras com OE de Murta e Laranja diferem significativamente das amostras com OE de Louro.

Tabela 20: Valores de TBARS (mg de malonaldeído/ 100g de amostra, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig.	Óleo essencial				Sig.	T x
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	0,129±0,003 ^a	0,129±0,003 ^a	ns	0,129±0,004 ^a	0,129±0,004 ^a	0,129±0,004 ^a	0,129±0,004 ^a	ns	ns
1	0,129±0,004 ^a	0,129±0,004 ^a	ns	0,138±0,006 ^a	0,136±0,006 ^a	0,129±0,006 ^a	0,118±0,006 ^a	ns	ns
24	0,136±0,006 ^a	0,139±0,006 ^a	ns	0,147±0,009 ^a	0,133±0,009 ^a	0,148±0,009 ^a	0,123±0,009 ^a	ns	ns
48	0,161±0,008 ^a	0,176±0,008 ^a	ns	0,185±0,011 ^a	0,156±0,011 ^a	0,180±0,011 ^a	0,153±0,011 ^a	ns	ns
72	0,185±0,012 ^a	0,236±0,012 ^b	**	0,285±0,017 ^b	0,174±0,017 ^a	0,203±0,017 ^a	0,179±0,017 ^a	***	ns
84	0,242±0,024 ^a	0,311±0,024 ^a	ns	0,392±0,034 ^a	0,209±0,034 ^a	0,273±0,034 ^a	0,232±0,034 ^a	ns	ns
168	0,320±0,024 ^a	0,407±0,024 ^b	*	0,525±0,034 ^b	0,286±0,034 ^a	0,380±0,034 ^a	0,263±0,034 ^a	***	ns
240	0,421±0,026 ^a	0,500±0,026 ^b	*	0,644±0,037 ^b	0,361±0,037 ^a	0,514±0,037 ^a	0,322±0,037 ^a	***	ns
336	0,499±0,029 ^a	0,675±0,029 ^b	***	0,899±0,041 ^c	0,435±0,041 ^a	0,623±0,041 ^b	0,392±0,041 ^a	***	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Na Figura 20, que representa todas as amostras embaladas sob vácuo, verifica-se um ligeiro aumento do valor médio até às 840 h de armazenamento.

À temperatura de 2°C os teores de TBARS apresentam um aumento lento, atingindo valores médios de 0,21 mg de malonaldeído /100g de amostra às 840 h de armazenamento nas amostras controlo, sendo que as amostras com OE apresentam valores inferiores à do controlo, bem como têm uma diminuição da oxidação lipídica até às 24h.

À temperatura de 8°C verificam-se valores superiores de TBARS na amostra de controlo com 0,55 mg de malonaldeído /100g amostra às 840h, e as amostras com OE's obtêm teores médios inferiores a 0,30 mg de malonaldeído /100g de amostra.

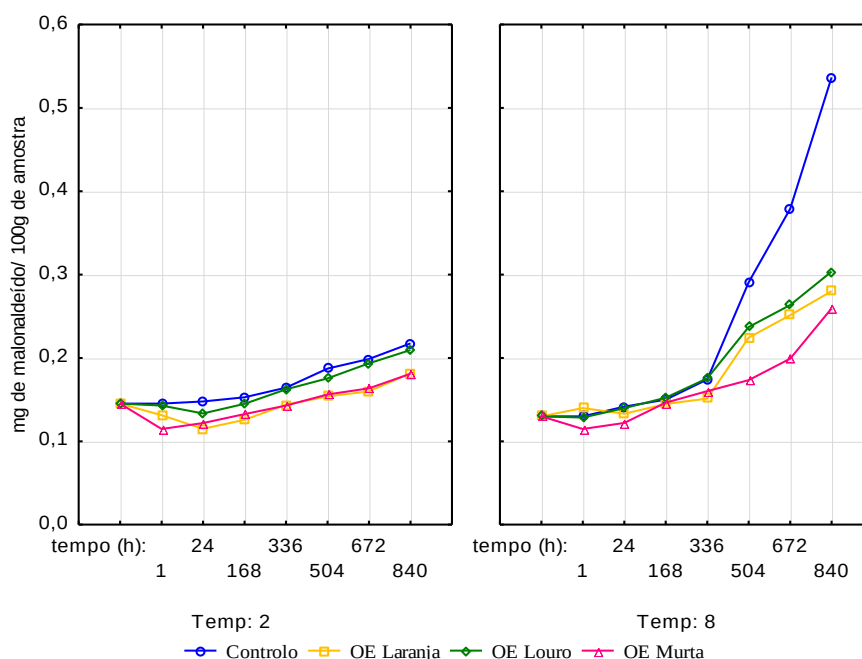


Figura 20: Gráfico de evolução do TBARS de carne picada embalada a vácuo com os OE de Laranja, Louro e Murta às temperaturas de 2°C e 8°C

Na Tabela 21 podemos observar que existem diferenças significativas entre as amostras controlo e as com OE's, bem como o efeito da temperatura e OE's e interação entre os dois fatores a partir das 504h, sendo essas diferenças na maioria altamente significativas.

A amostra de controlo apresenta diferenças significativas com a amostra de OE de murta e da laranja, diferem das amostras controlo desde esse tempo de armazenamento.

Tabela 21: Valores de TBARS (mg de malonaldeído/ 100g de amostra, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig.	Óleo essencial				Sig.	T x
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	0,129±0,003 ^a	0,129±0,003 ^a	ns	0,129±0,004 ^a	0,129±0,004 ^a	0,129±0,004 ^a	0,129±0,004 ^a	ns	ns
1	0,129±0,004 ^a	0,129±0,004 ^a	ns	0,138±0,006 ^a	0,136±0,006 ^a	0,129±0,006 ^a	0,118±0,006 ^a	ns	ns
24	0,130±0,004 ^a	0,134±0,004 ^a	ns	0,145±0,006 ^a	0,124±0,006 ^a	0,137±0,006 ^a	0,122±0,006 ^a	ns	ns
168	0,139±0,005 ^a	0,148±0,005 ^a	ns	0,151±0,008 ^a	0,135±0,008 ^a	0,149±0,008 ^a	0,139±0,008 ^a	ns	ns
336	0,153±0,006 ^a	0,165±0,006 ^a	ns	0,169±0,008 ^a	0,148±0,008 ^a	0,169±0,008 ^a	0,152±0,008 ^a	ns	ns
504	0,168±0,006 ^b	0,231±0,006 ^a	***	0,239±0,009 ^c	0,189±0,009 ^{ab}	0,206±0,009 ^{bc}	0,165±0,009 ^a	***	*
672	0,179±0,006 ^a	0,273±0,006 ^b	***	0,289±0,009 ^c D	0,206±0,009 ^{ab}	0,229±0,009 ^a	0,181±0,009 ^a	***	***
840	0,197±0,003 ^a	0,345±0,003 ^b	***	0,377±0,005 ^c	0,231±0,005 ^a	0,257±0,005 ^b	0,220±0,005 ^a	***	***

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$);. Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Após uma análise das Figuras 19 e 20 e das Tabelas 20 e 21 pode aferir-se que os valores médios da oxidação lipídica são inferiores na temperatura de armazenamento a 2°C, e na embalagem a vácuo.

Este facto pode ser explicado pelo aumento da oxidação lipídica com o aumento da temperatura pela reação dos radicais livres com o oxigénio presente na embalagem em aerobiose.

Em ambas as embalagens as amostras com OE obtiveram valores médios inferiores ao valor da amostra de controlo. Também se verificou que, os OE's mais benéficos para diminuir a oxidação lipídica são o OE de murta e de laranja, o que é concordante com os resultados da atividade antioxidante apresentados anteriormente.

2.2.5 Análise espectral por FTIR

As Figuras 21 e 22 apresentam-se os espectros de FTIR dos OE's de louro e murta embalados em aerobiose e sob vácuo respetivamente, nas temperaturas de 2°C e 8°C no tempo 0 h e 336 h de armazenamento. A região do espectro que se utilizou foi entre 1750 e 950 cm^{-1} , sendo nesta região que se encontram os picos relevantes para classificar a amostra. Todas as análises quimiométricas foram realizadas em função desta região dos espectros.

Na embalagem de aerobiose, na Figura 21, nas amostras com OE de louro e de murta no tempo 0 h obtêm uma absorvância inferior à do tempo 336 h de armazenamento, no entanto é superior na amostra com OE de louro. Observam-se três picos importantes, o pico maior com valores superiores a 0,15 u.a. aos 1627 cm^{-1} , em que segundo o mencionado pela literatura na (Tabela 5), são detetadas amidas II (C=N), no pico com valores de 0,10 u.a. aos 1530 cm^{-1} detetou-se amins I (N-H) e o ultimo pico aos 1076 cm^{-1} com 0,05 u.a foi detetado amidas I (C-N).

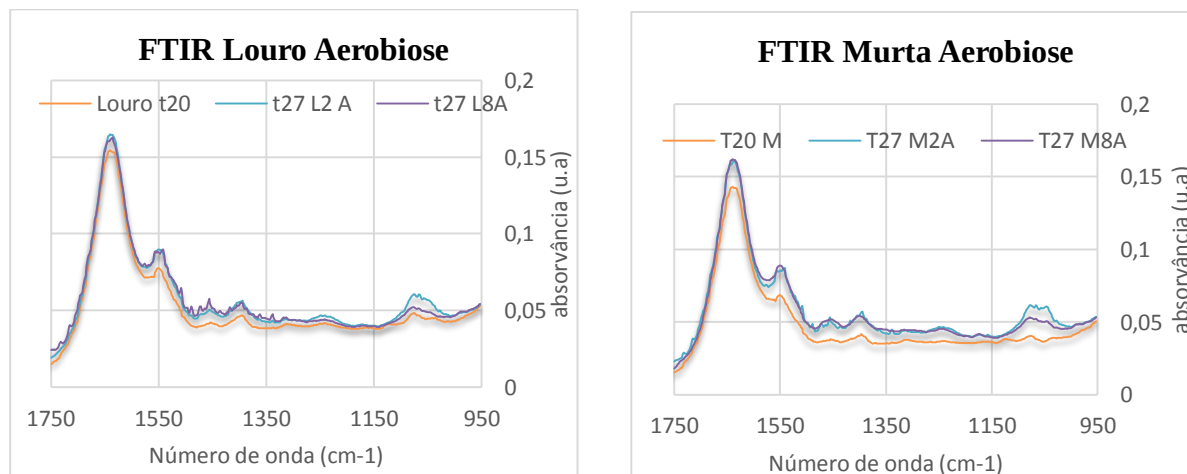


Figura 21: Espectro de FTIR das amostras de OE de louro e murta no tempo 0h e 336 h embaladas em aerobiose

Na embalagem de vácuo, Figura 22, na amostra de OE de murta no tempo 0 h obtém uma absorvância superior à do tempo 336 h na temperatura de 8°C e, valores de absorvância superiores à amostra com OE de murta de 2°C.

As amostras com OE's de louro, apresentam quatro picos importantes, com 0,15 u.a. aos 1635 cm^{-1} , segundo o mencionado pela literatura na (Tabela 5), são detetadas amidas II (C=N), no pico com valores de 0,08 u.a. aos 1541 cm^{-1} detetou-se aminas I (N-H), e com 0,06 u.a aos 1061 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} com 0,06 u.a foi detetado amidas I (C-N).

Relativamente às amostras com OE's de murta, apresentam cinco picos importantes, com 0,13 u.a. aos 1626 cm^{-1} e o pico com 0,05 u.a aos 1387 são detetadas amidas II (C=N), no pico com valores de 0,06 u.a. aos 1533 cm^{-1} detetou-se aminas I (N-H), e com 0,06 u.a aos 1062 cm^{-1} e 1038 cm^{-1} com 0,06 u.a foi detetado amidas I (C-N).

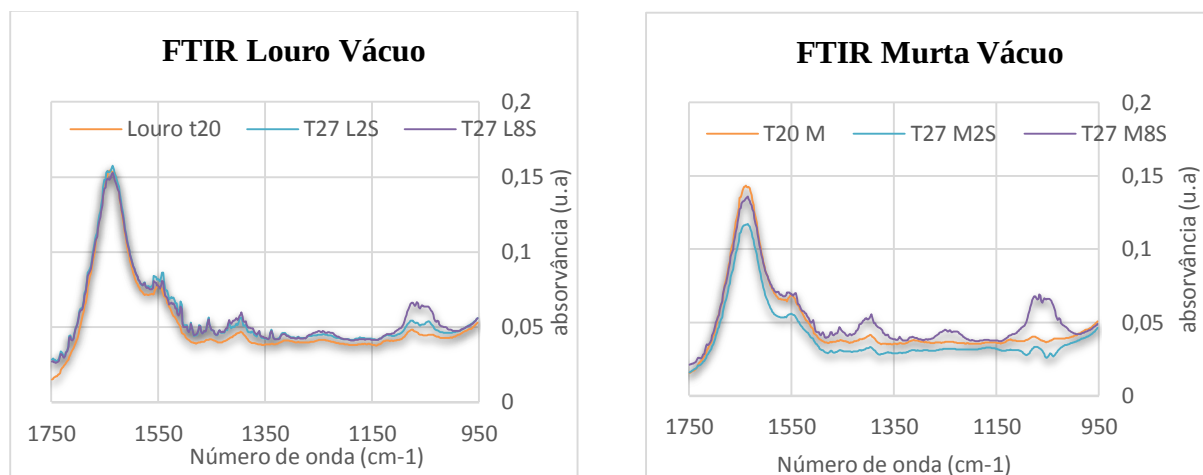


Figura 22: Espectro de FTIR das amostras de OE de louro e murta no tempo 0h e 336 h embaladas a vácuo

2.2.6 Determinações Microbiológicas

As determinações microbiológicas foram feitas em relação aos microrganismos mesófilos (TVC), psicrotróficos, bactérias do ácido láctico, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e Fungos para as amostras com OE de laranja, louro e murta, bem como a amostra controlo embaladas em aerobiose e nas de vácuo. Os resultados foram expressos em log ufc/g.

2.2.6.1 Mesófilos

Os resultados dos microrganismos mesófilos (TVC) apresentam-se na Figura 23 e Tabela 22 para a embalagem de aerobiose e na Figura 24 e Tabela 23 para a embalagem sob

vácuo, sendo expressos por log ufc/g amostra. A carga microbiana inicial das amostras, avaliada pelas contagens de mesófilos foi de 5,213 log ufc/ g amostra.

Como se verifica na Figura 23 em ambas as temperaturas as amostras com OE's apresentam uma redução da carga microbiana na 1ªh de armazenamento. À temperatura de 2°C, pode observar-se a multiplicação normal das bactérias, com uma fase de lag até às 48h, uma fase de crescimento exponencial até às 240h e a fase estacionária até às 336h de armazenamento, com exceção da amostras com OE de murta que não apresenta uma fase estacionária, visto que as bactérias ainda estão em fase log (exponencial). Contudo estas amostras, apresentam contagens microbianas inferiores às outras amostras com 9,0 log ufc/g amostra. No tempo final, estas amostras apresentam também uma carga microbiana inferior às restantes amostras armazenadas a temperatura 8°C.

À temperatura de 8°C apenas a amostra de controlo apresenta uma fase *lag* durante a 1h de armazenamento e as amostras com OE's apresentam uma inibição. Ta partir da 1ªh de armazenamento, todas as amostras apresentam uma fase de multiplicação exponencial sendo que as amostras com OE de louro e laranja apresentam essa fase até às 168h, a amostra com OE de murta até às 240h e a amostra controlo até às 336h com um valor de carga microbiana de aproximadamente 11,4 log ufc/g amostra. De seguida, as amostras com OE's apresentam uma fase estacionária.

Conforme apresentado na Figura 23 e na Tabela 22 as amostras com OE de murta são as que apresentam menor carga microbiana em ambas as temperaturas, atingindo teores de 9,0 log ufc/g e 10 log ufc/g às 336h a 2°C e 8°C respetivamente.

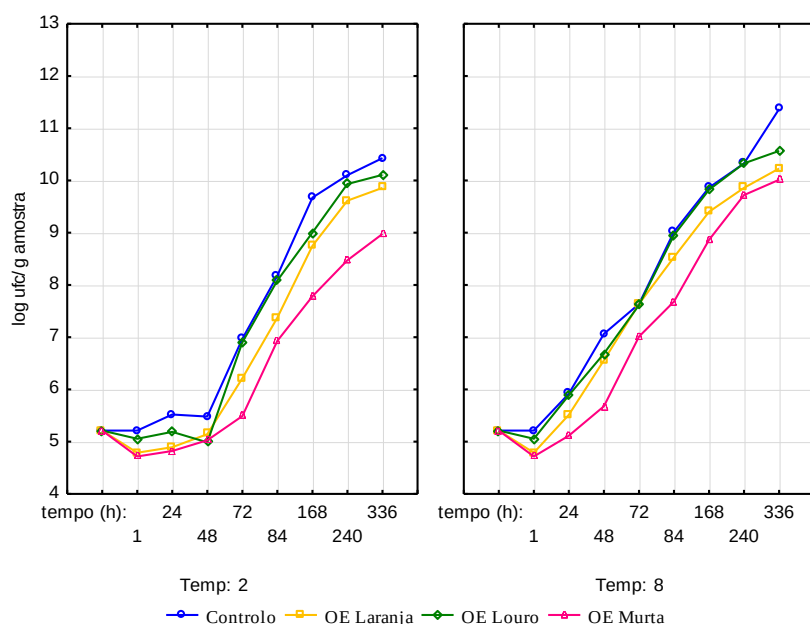


Figura 23: Gráfico de evolução dos microrganismos mesófilos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas de 2°C e 8°C

Analisando a Tabela 22 verifica-se que existe um desenvolvimento microbiano ao longo do período de armazenamento bem como diferenças significativas pelo efeito das temperaturas de armazenamento e pela aplicação de OE's a partir das 48h. Foi ainda observado uma interação muito significativa da temperatura e OE's às 240h e 336h de armazenamento.

A amostra com OE de murta apresenta diferenças significativas das 48h às 336h de armazenamento com a amostra controlo, assim como as amostras com OE de louro e laranja às 168h e 240h de armazenamento. Estas duas ultimas amostras não diferem significativamente entre si.

Tabela 22: Contagens de mesófilos (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	5,213±0,224 ^a	5,213±0,224 ^a	ns	5,213±0,316 ^a	5,213±0,316 ^a	5,213±0,316 ^a	5,213±0,316 ^a	ns	ns
1	4,944±0,250 ^a	4,944±0,250 ^a	ns	5,213±0,353 ^a	4,789±0,353 ^a	5,056±0,353 ^a	4,718±0,353 ^a	ns	ns
24	5,107±0,182 ^a	5,609±0,182 ^a	ns	5,720±0,257 ^a	5,205±0,257 ^a	5,538±0,257 ^a	4,969±0,257 ^a	ns	ns
48	5,160±0,111 ^a	6,496±0,111 ^b	***	6,273±0,157 ^b	5,850±0,157 ^{ab}	5,835±0,157 ^{ab}	5,352±0,157 ^a	*	ns
72	6,395±0,181 ^a	7,475±0,181 ^b	***	7,304±0,256 ^b	6,925±0,256 ^{ab}	7,260±0,256 ^{ab}	6,251±0,256 ^a	*	ns
84	7,641±0,127 ^a	8,547±0,127 ^b	***	8,600±0,180 ^a	7,953±0,180 ^{ab}	8,518±0,180 ^{ab}	7,306±0,180 ^b	***	ns
168	8,880±0,116 ^a	9,489±0,116 ^b	***	9,769±0,164 ^b	9,075±0,164 ^a	9,414±0,164 ^{ab}	8,323±0,164 ^c	***	ns
240	9,531±0,070 ^a	10,059±0,070 ^b	***	10,214±0,099 ^b	9,737±0,099 ^a	10,132±0,099 ^{ab}	9,097±0,099 ^c	***	**
336	9,483±0,104 ^a	10,545±0,104 ^b	***	10,898±0,147 ^c	10,045±0,147 ^{ab}	10,337±0,147 ^{bc}	9,495±0,147 ^a	**	**

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Tal como no comportamento obtido nos gráficos de evolução da Figura 23 a carga microbiana das amostras embaladas sob vácuo (Figura 24) à temperatura de 2°C é no geral inferior à da temperatura de 8°C, bem como a redução da carga microbiana durante a 1h de armazenamento nas amostras com OE's.

À temperatura de 2°C todas as amostras seguem o crescimento normal das bactérias, apresentando a fase de latência, com exceção das amostras com OE de laranja, fase de

crescimento exponencial e fase estacionária, sendo exceção as amostras com OE de murta. A maior fase de crescimento exponencial é da amostra controlo com um aumento de 3 log ufc/g. De salientar as amostras com OE de murta que apresentam uma carga microbiana menor que todas as amostras embalada sob vácuo atingindo uma média de 7,30 log ufc/g de amostra no final do tempo de armazenamento, que constitui um limite aceitável.

À temperatura de 8°C todas as amostras apresentam um comportamento de desenvolvimento microbiano similar ao da temperatura de 8°C embaladas em aerobiose.

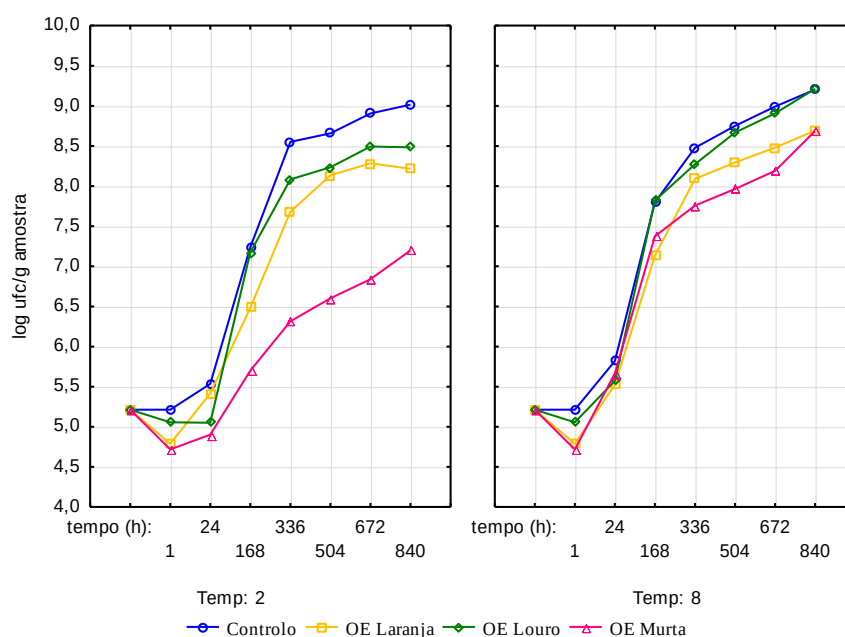


Figura 24: Gráficos de evolução dos microrganismos mesófilos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas de 2°C e 8°C

Na Tabela 23 podemos observar os efeitos da temperatura de armazenamento e da aplicação de OE's nas amostras diferenças significativas às 168h, observando-se ainda uma interação significativa da temperatura e OE desde as 336h. Como já referido a amostra com OE de murta apresenta diferenças significativas em relação à amostra controlo, sendo de forma geral benéfico, visto que reduz o desenvolvimento microbiano.

Tabela 23: Contagens de TVC (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	5,213±0,224 ^a	5,213±0,224 ^a	ns	5,213±0,316 ^a	5,213±0,316 ^a	5,213±0,316 ^a	5,213±0,316 ^a	ns	ns
1	4,944±0,250 ^a	4,944±0,250 ^a	ns	5,213±0,353 ^a	4,789±0,353 ^a	5,056±0,353 ^a	4,718±0,353 ^a	ns	ns
24	5,225±0,234 ^a	5,645±0,234 ^a	ns	5,677±0,331 ^a	5,469±0,331 ^a	5,311±0,331 ^a	5,284±0,331 ^a	ns	ns
168	6,649±0,181 ^a	7,531±0,181 ^b	**	7,517±0,255 ^b	6,809±0,255 ^a	7,496±0,255 ^a	6,537±0,255 ^a	*	ns
336	7,658±0,071 ^a	8,150±0,071 ^b	***	8,515±0,101 ^b	7,886±0,101 ^{ab}	8,178±0,101 ^{ab}	7,036±0,101 ^a	***	***
504	7,907±0,107 ^a	8,419±0,107 ^b	**	8,703±0,152 ^a	8,214±0,152 ^a	8,451±0,152 ^a	7,282±0,152 ^b	***	*
672	8,131±0,091 ^a	8,642±0,091 ^b	**	8,948±0,129 ^b	8,382±0,129	8,700±0,129 ^{ab}	7,514±0,129 ^c	***	*
840	8,228±0,089 ^a	8,949±0,089 ^b	***	9,109±0,125 ^b	8,454±0,125 ^a	8,849±0,125 ^{ab}	7,942±0, AB	***	*

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

A carga microbiana é menor na temperatura de 2°C para ambas as embalagens, as amostras com OE de murta as que apresentam menor carga microbiana particularmente em amostras embaladas sob vácuo a 2°C.

2.2.6.2 Psicrotróficos

Os resultados dos microrganismos psicrotróficos totais estão ilustrados na Figura 25 e Tabela 24 para as amostras embaladas em aerobiose e Figura 26 e Tabela 25 para as amostras embaladas sob vácuo, sendo expressos por log ufc/g amostra.

Em ambas as temperaturas observa-se o mesmo comportamento observado para os mesófilos, apresentando uma redução da carga microbiana psicrotrófica na 1h de armazenamento, bem como existe um crescimento exponencial até às 336h. Salientando-se ainda que as amostras com menor carga microbiana foram as inoculadas com OE de murta. À temperatura de 2°C existe menor carga microbiana que as amostras armazenadas à temperatura de 8°C, como seria expetível.

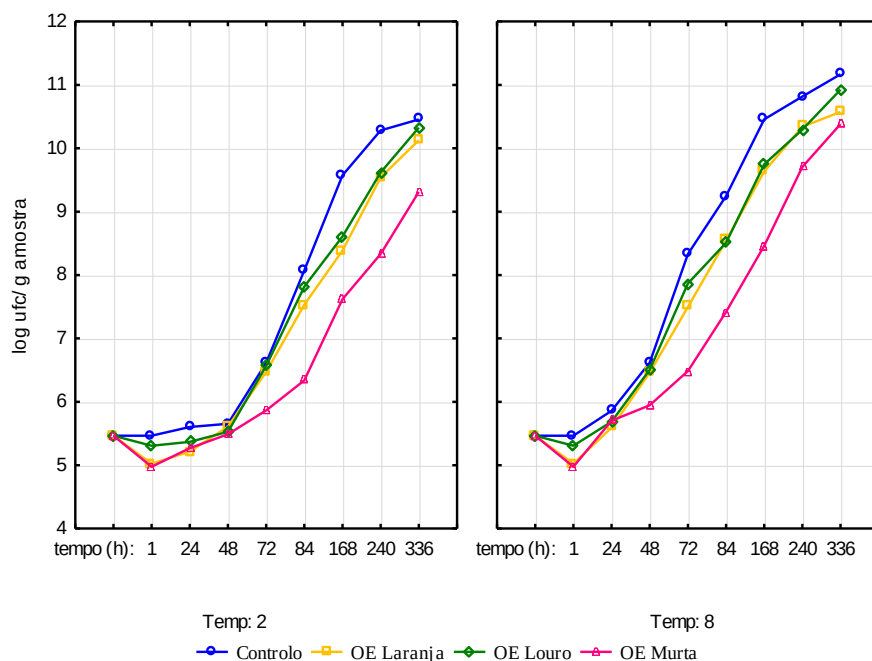


Figura 25: Gráfico de evolução dos microrganismos psicrotróficos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas de 2°C e 8°C

Na Tabela 24 podemos verificar que existem diferenças significativas entre temperaturas a partir das 48h, e entre as amostras com OE's e a amostra controlo a partir das 72h. Verifica-se ainda uma interação da temperatura OE's 336h. Ao longo do período de armazenamento há um desenvolvimento crescimento microbiano sendo que as amostras com OE de murta as que apresentam menor carga microbiana, diferindo significativamente das restantes a partir das 72h.

Tabela 24: Contagens de psicotróficos (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	5,465±0,141 ^a	5,465±0,141 ^a	ns	5,465±0,199 ^a	5,465±0,199 ^a	5,465±0,199 ^a	5,465±0,199 ^a	ns	ns
1	5,193±0,149 ^a	5,193±0,149 ^a	ns	5,465±0,210 ^a	5,024±0,210 ^a	5,307±0,210 ^a	4,975±0,210 ^a	ns	ns
24	5,363±0,176 ^a	5,710±0,176 ^a	ns	5,730±0,250 ^a	5,403±0,250 ^a	5,528±0,250 ^a	5,485±0,250 ^a	ns	ns
48	5,569±0,085 ^a	6,381±0,085 ^b	***	6,134±0,120 ^a	6,033±0,120 ^a	6,016±0,120 ^a	5,716±0,120 ^a	ns	ns
72	6,378±0,119 ^a	7,545±0,119 ^b	***	7,473±0,169 ^a	6,984±0,169 ^a	7,216±0,169 ^a	6,175±0,169 ^b	***	ns
84	7,439±0,143 ^a	8,429±0,143 ^b	***	8,659±0,202 ^a	8,036±0,202 ^a	8,162±0,202 ^a	6,878±0,202 ^b	***	ns
168	8,547±0,130 ^a	9,575±0,130 ^b	***	10,015±0,185 ^c	9,011±0,185 ^a	9,178±0,185 ^a	8,041±0,185 ^b	***	ns
336	10,055±0,051 ^a	10,761±0,051 ^b	***	10,812±0,074 ^b	10,350±0,074 ^a	10,62±0,074 ^{ab}	9,846±0,074 ^c	***	*

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Nas amostras embaladas sob vácuo as contagens de psicotróficos seguem o padrão evolutivo observado para os mesófilos totais. Para as amostras com OE de murta observam-se um valor médio de 7,5 log ufc/g amostra à temperatura de 2°C às 840h de armazenamento de 7,5 log ufc/g, e de aproximadamente 8,5 log ufc/g para as amostras com OE's de murta e de laranja a 8°C no período final de armazenamento.

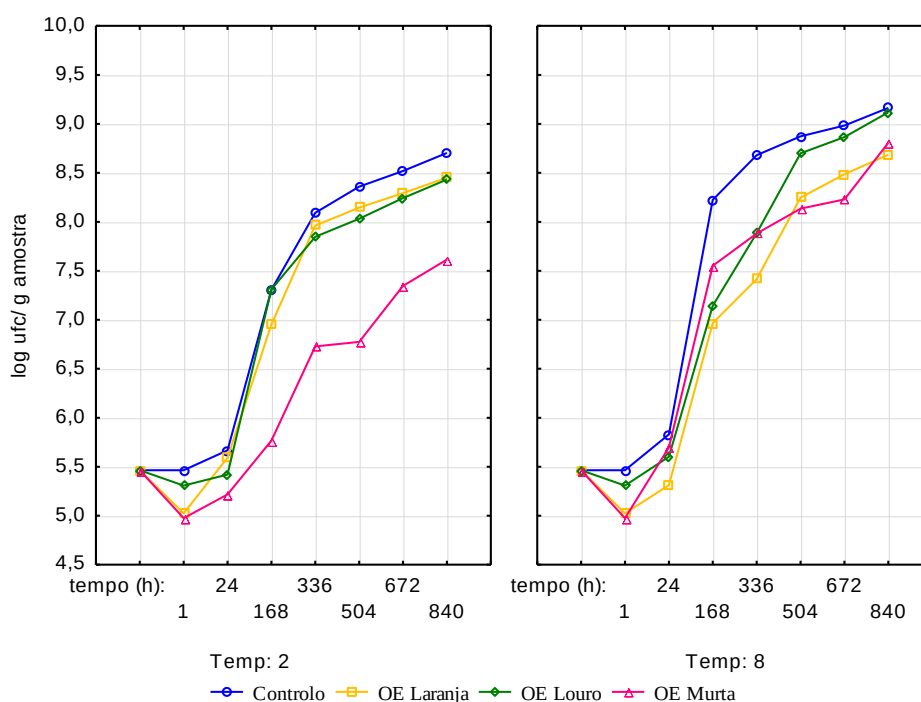


Figura 26: Gráficos de evolução dos microrganismos psicrotróficos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C

Na Tabela 25 pod observar-se o deito significativo da temperatura a a partir das 168h e da aplicação de OE's a partir das 336h. O OE de murta continua a apresentar melhor efeito antimicrobiano na matriz carnea em estudo, visto que além de obter o menor valor da carga microbiana, difere ainda significativamente da amostra controlo a partir das 336h.

Tabela 25: Contagens de psicrotróficos (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig.	Óleo essencial				Sig.	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	5,465±0,141 ^a	5,465±0,141 ^a	ns	5,465±0,199 ^a	5,465±0,199 ^a	5,465±0,199 ^a	5,465±0,199 ^a	ns	ns
1	5,193±0,149 ^a	5,193±0,149 ^a	ns	5,465±0,210 ^a	5,024±0,210 ^a	5,307±0,210 ^a	4,975±0,210 ^a	ns	ns
24	5,474±0,276 ^a	5,610±0,276 ^a	ns	5,749±0,390 ^a	5,452±0,390 ^a	5,511±0,390 ^a	5,457±0,390 ^a	ns	ns
168	6,834±0,203 ^a	7,765±0,203 ^b	**	7,765±0,288 ^a	6,959±0,288 ^a	7,227±0,288 ^a	6,659±0,288 ^a	ns	ns
336	7,657±0,139 ^b	7,965±0,139 ^a	*	8,386±0,198 ^b	7,688±0,198 ^{ab}	7,865±0,198 ^{ab}	7,300±0,198 ^a	**	*
504	7,827±0,125 ^a	8,489±0,125 ^b	**	8,616±0,176 ^a	8,196±0,176 ^a	8,366±0,176 ^a	7,455±0,176 ^b	**	ns
672	8,100±0,097 ^a	8,640±0,097 ^b	**	8,750±0,137 ^c	8,390±0,137 ^a	8,554±0,137 ^a	7,787±0,137 ^b	***	ns
840	8,309±0,089 ^a	8,943±0,089 ^b	****	8,933±0,126 ^a	8,568±0,126 ^{ab}	8,775±0,126 ^a	8,211±0,126 ^b	**	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); **** – extremamente significativo ($p < 0,0001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

A carga microbiana é inferior nas amostras mantidas a 2°C para ambas as embalagens. Na embalagem a vácuo os OE's que apresentam efeito benéfico para a redução destes microrganismos são o de murta e de laranja.

2.2.6.3 Bactérias de ácido láctico

Os valores médios das contagens de bactérias do ácido láctico (BAL) nas amostras controlo e com OE's de laranja louro e murta armazenadas à temperatura de 2 e 8°C, estão representados na Figura 27 e Tabela 26 para as amostras embaladas em aerobiose e na Figura 28 e Tabela 27 para as amostras embaladas a vácuo. A carga microbiana inicial de BAL das amostras de carne picada é de 4,03 log ufc/g amostra.

O crescimento da população de BAL é exponencial para todas as amostras ao longo do período de armazenamento, no entanto, à temperatura de 2°C as amostras com OE de louro e murta apresentam uma redução da carga microbiana até às 1h e 48h, respetivamente. Pode observar-se que a partir das 48h as amostras com OE de louro e laranja apresentam os mesmos valores de carga microbiana. O mesmo acontece com a temperatura de 8°C, havendo uma redução até às 24h e às 1h respectivamente. Obtém-se um valor logarítmico de diferença entre as amostras armazenadas à temperatura de 2 e de 8°C, sendo inferiores à primeira temperatura.

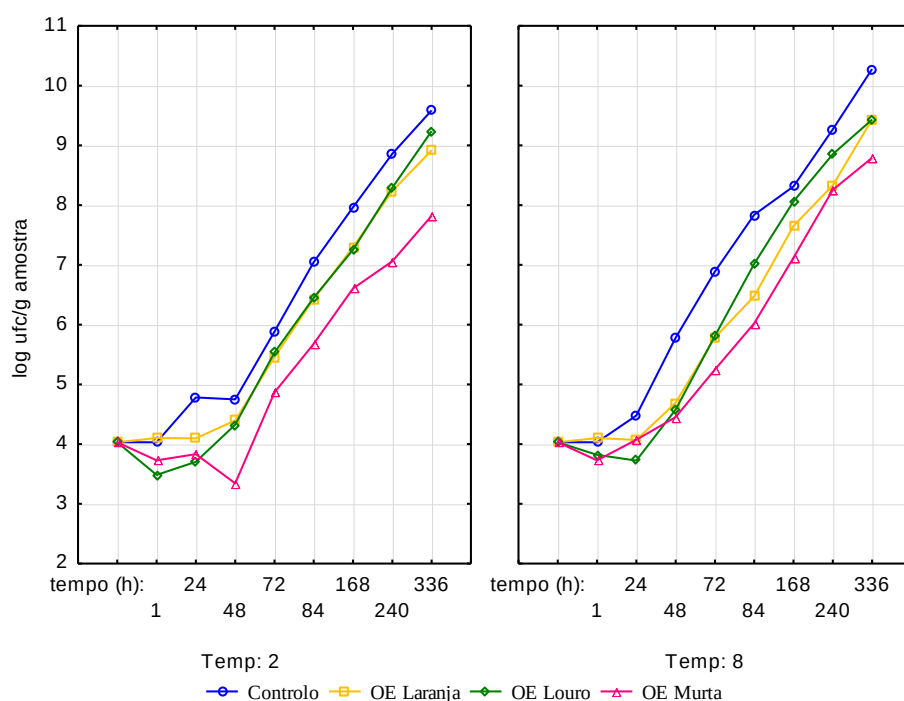


Figura 27: Gráficos de evolução das bactérias do ácido láctico (BAL) nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas 2°C e 8°C

Assim como evidenciado pelos gráficos de evolução apresentados na Figura 27, as amostras com menores níveis de BAL são as que contêm OE de murta. Como podemos observar pela análise da Tabela 26, verificam-se diferenças significativas entre as amostras nas duas temperaturas a partir das 48h e das 240h, de armazenamento, bem como o efeito da adição de OE's entre os OE's às 48h.

Tabela 26: Contagens de BAL (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	4,030±0,577 ^a	4,030±0,577 ^a	ns	4,030±0,816 ^a	4,030±0,816 ^a	4,030±0,816 ^a	4,030±0,816 ^a	ns	ns
1	3,920±0,445 ^a	3,920±0,445 ^a	ns	4,030±0,629 ^a	4,003±0,629 ^a	3,653±0,629 ^a	3,728±0,629 ^a	ns	ns
24	4,103±0,470 ^a	4,086±0,470 ^a	ns	4,629±0,665 ^a	4,082±0,665 ^a	3,715±0,665 ^a	3,952±0,665 ^a	ns	ns
48	4,203±0,189 ^a	4,876±0,189 ^b	*	5,265±0,268 ^b	4,543±0,268 ^{ab}	4,452±0,268 ^{ab}	3,898±0,268 ^a	*	ns
72	5,435±0,258 ^a	5,934±0,258 ^a	ns	6,386±0,364 ^a	5,621±0,364 ^a	5,672±0,364 ^a	5,057±0,364 ^a	ns	ns
84	6,400±0,224 ^a	6,836±0,224 ^a	ns	7,441±0,317 ^b	6,451±0,317 ^{ab}	6,733±0,317 ^{ab}	5,849±0,317 ^a	*	ns
168	7,278±0,180 ^a	7,786±0,180 ^a	ns	8,137±0,255 ^b	7,473±0,255 ^{ab}	7,656±0,255 ^{ab}	6,862±0,255 ^a	*	ns
240	8,112±0,109 ^a	8,677±0,109 ^b	**	9,065±0,155 ^c	8,283±0,155 ^{ab}	8,571±0,155 ^{bc}	7,658±0,155 ^a	***	ns
336	8,890±0,128 ^a	9,484±0,128 ^b	**	9,931±0,180 ^b	9,176±0,180 ^a	9,335±0,180 ^{bc}	8,306±0,180 ^c	***	ns

B

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Na Figura 28, podemos observar que à temperatura de 2°C a amostra de controlo e amostra com OE de laranja apresentam as três fases de desenvolvimento bacteriano ou seja, fase de latência, exponencial e estacionária, sendo a fase exponencial superior na amostra controlo. As amostras com OE de louro e murta apresentam uma redução da microbiota até às 1h e 24h, respetivamente, bem como estas amostras apresentam a fase exponencial e estacionária.

De modo similar as amostras armazenadas à temperatura de 8°C têm o mesmo comportamento que as de 2°C, diferindo apenas que as amostras com OE de louro e murta reduzem os valores de BAL à 1h de armazenamento.

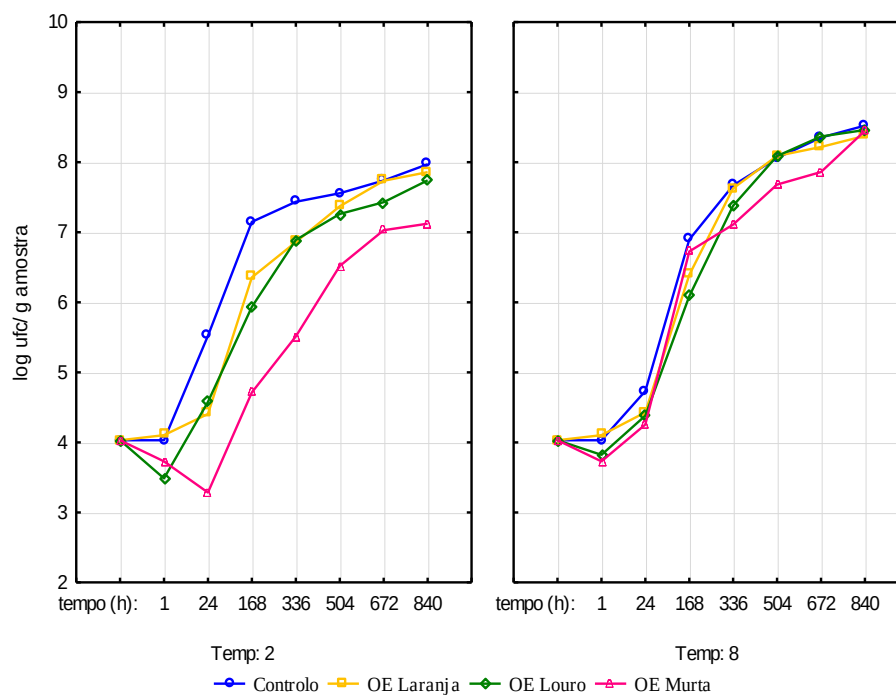


Figura 28: Gráficos de evolução das bactérias do ácido láctico (BAL) nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C

Pode verificar-se que as amostras com menor desenvolvimento microbiano são as com OE de louro e murta, bem como em todas as amostras embaladas a vácuo apresentam menores valores logarítmicos que as embaladas em aerobiose.

A Tabela 27 indica-nos que existem diferenças significativas entre as amostras armazenadas a diferentes temperaturas e um efeito de aplicação de OE's a partir das 168h, observou-se ainda uma interação na temperatura e efeito da aplicação de OE's às 168h e 336h de armazenamento.

Tabela 27: Contagens de BAL (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalado a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	4,030±0,577 ^a	4,030±0,577 ^a	ns	4,030±0,816 ^a	4,030±0,816 ^a	4,030±0,816 ^a	4,030±0,816 ^a	ns	ns
1	3,920±0,445 ^a	3,920±0,445 ^a	ns	4,030±0,629 ^a	4,003±0,629 ^a	3,653±0,629 ^a	3,728±0,629 ^a	ns	ns
24	4,447±0,475 ^a	4,449±0,475 ^a	ns	5,127±0,671 ^a	4,417±0,671 ^a	4,479±0,671 ^a	3,769±0,671 ^a	ns	ns
168	6,038±0,202 ^a	6,525±0,202 ^a	*	7,022±0,285 ^b	6,373±0,285 ^{ab}	6,010±0,285 ^{ab}	5,719±0,285 ^a	*	*
336	6,674±0,105 ^a	7,445±0,105 ^b	***	7,551±0,149 ^a	7,243±0,149 ^a	7,134±0,149 ^a	6,310±0,149 ^b	***	*
504	7,176±0,095 ^a	7,979±0,095 ^b	***	7,808±0,135 ^b	7,730±0,135 ^a	7,674±0,135 ^a	7,099±0,135 ^b	**	ns
672	7,483±0,085 ^a	8,198±0,085 ^b	***	8,044±0,120 ^a	7,975±0,120 ^a	7,898±0,120 ^{ab}	7,444±0,120 ^b	*	ns
840	7,672±0,077 ^a	8,451±0,077 ^b	***	8,247±0,109 ^b	8,117±0,109 ^{ab}	8,100±0,109 ^{ab}	7,784±0,109 ^a	***	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Tal como em todos os microorganismos analisados, as BAL apresentam valores inferiores nas amostras mantidas à temperatura de 2°C em ambas as embalagens, e inferiores na embalagem de vácuo quando comprado as embalagens. As amostras nas quais se obtiveram menores contagens de BAL foram inoculadas com OE's de murta e de louro.

2.2.6.4 *Enterobacteriaceae*

Os valores médios de *Enterobacteriaceae* nas amostras controlo e com OE's de laranja louro e murta armazenadas à temperatura de 2°C e 8°C, estão representados na Figura 29 e Tabela 28 para as amostras embaladas em aerobiose e na Figura 30 e Tabela 29 para as amostras embaladas sobvácuo.

No tempo inicial, nas *Enterobacteriaceae* apresentam um valor de 1,31 log ufc/ g amostra de carne picada.

Ao analisar os gráficos de evolução de *Enterobacteriaceae* nas amostras embaladas em aerobiose (Figura 29), pode aferir-se que à temperatura de 8°C existe um aumento da carga microbiana destas bactérias superior ao das amostras armazenadas à temperaturas de 2°C. As amostras com menores teores de *Enterobacteriaceae* a 8°C são as que contêm OE de murta, com valores aproximados de 3,8 log ufc/g às 336h em aerobiose.

Apenas as amostras com OE de murta apresentam uma redução da carga microbiana nas primeiras 24h à temperatura de 2°C e 1h à temperatura de 8°C.

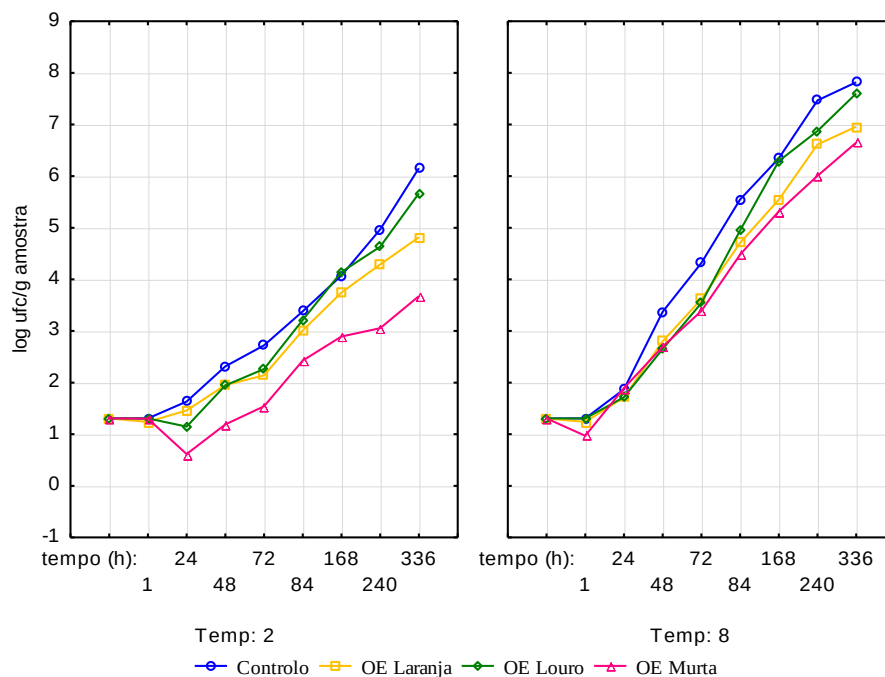


Figura 29: Gráficos de evolução das *Enterobacteriaceae* nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas 2°C e 8°C

Na Tabela 28 observamos diferenças significativas às 48h, e a partir das 72h às 336 de armazenamento a diferença entre as temperaturas era apenas significativa e das 72h às 336h e diferenças altamente significativas. Observou-se ainda um efeito significativo de aplicação dos OE's a partir das 84h.

Tabela 28: Contagens das *Enterobacteriaceae* (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	1,307±0,343 ^a	1,307±0,343 ^a	ns	1,307±0,485 ^a	1,307±0,485 ^a	1,307±0,485 ^a	1,307±0,485 ^a	ns	ns
1	1,205±0,280 ^a	1,205±0,280 ^a	ns	1,307±0,396 ^a	1,239±0,396 ^a	1,306±0,396 ^a	1,136±0,396 ^a	ns	ns
24	1,214±0,249 ^a	1,797±0,249 ^a	ns	1,752±0,395 ^a	1,586±0,395 ^a	1,432±0,395 ^a	1,254±0,395 ^a	ns	ns
48	1,850±0,240 ^a	2,880±0,240 ^b	*	2,843±0,339 ^a	2,375±0,339 ^a	2,298±0,339 ^a	1,943±0,339 ^a	ns	ns
72	2,167±0,194 ^a	3,716±0,194 ^b	***	3,520±0,274 ^a	2,880±0,274 ^a	2,902±0,274 ^a	2,464±0,274 ^a	ns	ns
84	3,007±0,145 ^a	4,919±0,145 ^b	***	4,463±0,205 ^b	3,858±0,205 ^{ab}	4,080±0,205 ^{ab}	3,452±0,205 ^a	*	ns
168	3,714±0,127 ^a	5,874±0,127 ^b	***	5,220±0,180 ^a	4,644±0,180 ^{ab}	5,218±0,180 ^a	4,105±0,180 ^b	**	ns
240	4,236±0,148 ^a	6,739±0,148 ^b	***	6,216±0,209 ^a	5,451±0,209 ^a	5,733±0,209 ^a	4,529±0,209 ^b	***	ns
336	5,077±0,165 ^a	7,256±0,165 ^b	***	6,986±0,233 ^c	5,885±0,233 ^{ab}	6,634±0,233 ^{bc}	5,162±0,233 ^a	***	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Como se pode ver na Figura 30, os valores da carga microbiana são maiores à temperatura de armazenamento de 8°C, o que seria expectável, pois as *Enterobacteriaceae* são microrganismos mesófilos, que não se multiplicaram bem a temperaturas inferiores a 5 log ufc/g (Regulamento (CE) N.º 1441, 2007).

A amostra de controlo apresenta apenas a fase exponencial, atingindo teores de 5,0 log ufc/g às 840h e as amostras com OE's de laranja e de murta apresentam uma fase de lag durante as 24h iniciais, uma fase exponencial de aproximadamente 0,8 valores logarítmicos para a amostra de murta até às 168h e uma fase estacionária até às 840h, bem como a amostra com OE de laranja apresenta uma fase exponencial de 1,5 valor logarítmico até às 336h e uma fase estacionária até às 840h de armazenamento. Salientando-se que a amostra com OE de murta apresenta menores níveis de *Enterobacteriaceae*.

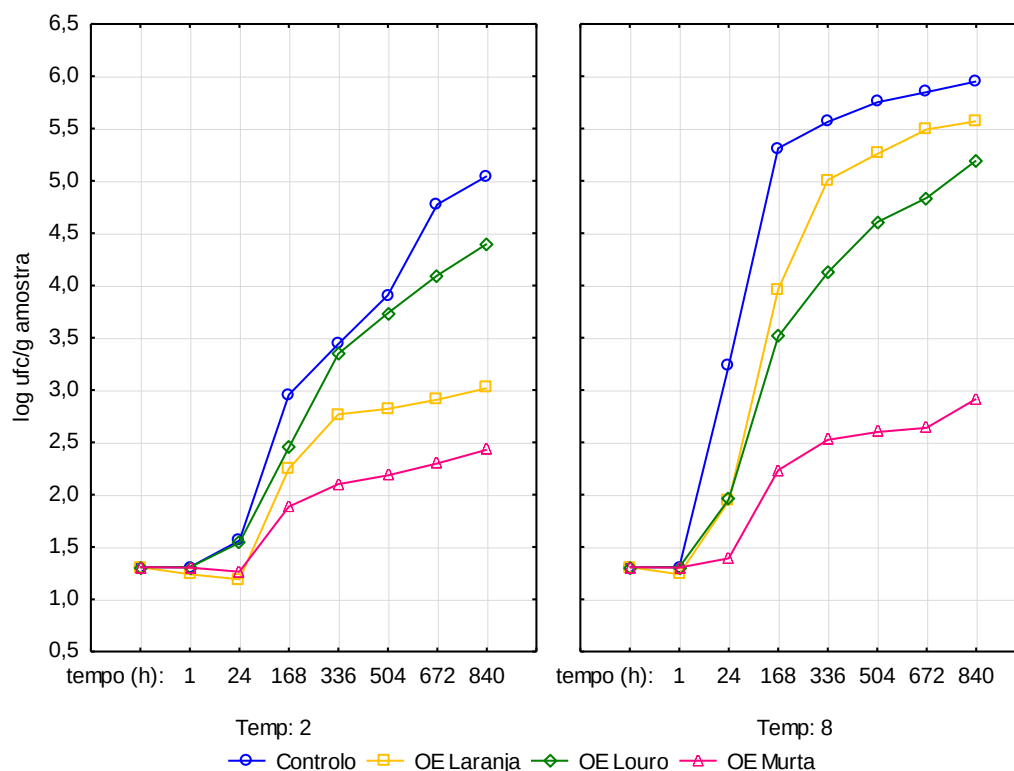


Figura 30: Gráficos de evolução das *Enterobacteriaceae* nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embalada a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C

Pela análise da Tabela 29, pode observar-se que a amostra com OE de murta apresenta um valor muito inferior ao das restantes amostras e existem ainda diferenças significativas pela aplicação de OE's e feita da temperatura a partir das 168h de armazenamento. Não se observou qualquer interação temperatura e OE's.

Tabela 29: Contagens das *Enterobacteriaceae* (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	1,307±0,343 ^a	1,307±0,343 ^a	ns	1,307±0,485 ^a	1,307±0,485 ^a	1,307±0,485 ^a	1,307±0,485 ^a	ns	ns
1	1,205±0,280 ^a	1,205±0,280 ^a	ns	1,307±0,396 ^a	1,239±0,396 ^a	1,306±0,396 ^a	1,136±0,396 ^a	ns	ns
24	1,389±0,262 ^a	2,129±0,262 ^a	ns	2,396±0,371 ^a	1,563±0,371 ^a	1,748±0,371 ^a	1,328±0,371 ^a	ns	ns
168	2,385±0,287 ^a	3,755±0,287 ^b	**	4,133±0,406 ^b	3,106±0,406 ^{ab}	2,980±0,406 ^{ab}	2,060±0,406 ^a	*	ns
336	2,914±0,333 ^a	4,305±0,333 ^b	**	4,502±0,471 ^b	3,888±0,471 ^{ab}	3,736±0,471 ^{ab}	2,312±0,471 ^a	*	ns
504	3,162±0,327 ^a	4,553±0,327 ^b AB	**	4,829±0,463 ^b	4,039±0,463 ^{ab}	4,170±0,463 ^{ab}	2,392±0,463 ^a	*	ns
672	3,520±0,328 ^a AB	4,704±0,328 ^b	*	5,312±0,464 ^b	4,200±0,464 ^{ab}	4,466±0,464 ^a	2,469±0,464 ^b	**	ns
840	3,722±0,353 ^a	4,908±0,353 ^b	**	5,498±0,499 ^b	4,394±0,499 ^{ab}	4,796±0,499 ^a	2,673±0,499 ^a	*	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$);. Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE.

Pode aferir-se que as amostras embaladas a vácuo apresentam menores valores de *Enterobacteriaceae* que as amostras embaladas a aerobiose, principalmente quando armazenadas à temperatura de 2°C como já referido.

2.2.6.5 *Pseudomonas* spp.

Os valores médios de *Pseudomonas* spp. nas amostras controlo e com OE's de laranja, louro e murta armazenadas à temperatura de 2°C e 8°C, estão representados na Figura 31 e Tabela 30 para as amostras embaladas em aerobiose e na Figura 32 e Tabela 31 para as amostras embaladas sob vácuo.

As amostras de carne picada apresentam um valor iniciais médios de 4,798 log ufc/g amostra.

A multiplicação das *Pseudomonas* spp. é superior nas amostras à temperatura de 8°C do que armazenadas à 2°C, verificando-se todas as amostras inoculadas com OE apresentam menor carga microbiana que a amostra controlo. As amostras com OE de murta são as que apresentam menores teores microbianos, observando-se o OE de murta quando colocado em interação com a matriz é o que apresenta maior atividade antimicrobiana. Em ambas as temperaturas, a aplicação do OE de murta implicam a existência de uma redução da multiplicação das *Pseudomonas* spp. durante as primeiras 24h do período de armazenamento.

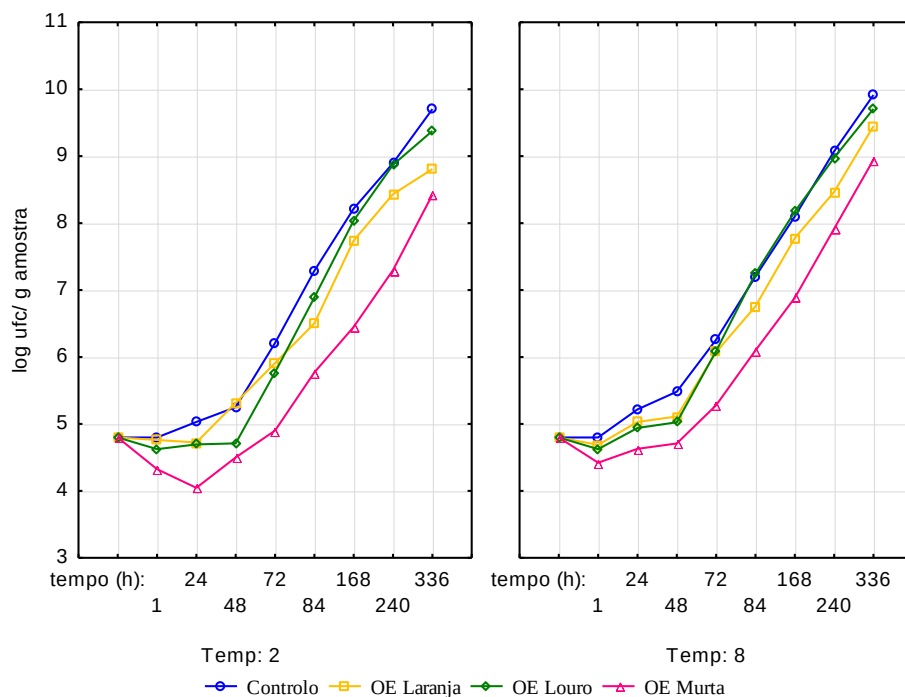


Figura 31: Gráficos de evolução das *Pseudomonas* spp. nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas 2°C e 8°C

Pela análise da Tabela 30, verifica-se em que as amostras com OE de murta são as que apresentam menores valores de *Pseudomonas* e que existem diferenças significativas entre as amostras com OE's e amostra controlo a partir das 72h e entre amostras armazenadas nas duas temperaturas às 336h de armazenamento.

Tabela 30: Contagens das *Pseudomonas* spp. (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial em embalagem de aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	4,798±0,261 ^a	4,798±0,261 ^a	ns	4,798±0,370 ^a	4,798±0,370 ^a	4,798±0,370 ^a	4,798±0,370 ^a	ns	ns
1	4,633±0,246 ^a	4,633±0,246 ^a	ns	4,798±0,348 ^a	4,724±0,348 ^a	4,624±0,348 ^a	4,373±0,348 ^a	ns	ns
24	4,624±0,219 ^a	4,954±0,219 ^a	ns	5,124±0,310 ^a	4,877±0,310 ^a	4,818±0,310 ^a	4,337±0,310 ^a	ns	ns
48	4,944±0,197 ^a	5,082±0,197 ^a	ns	5,367±0,278 ^a	5,214±0,278 ^a	4,867±0,278 ^a	4,604±0,278 ^a	ns	ns
72	5,699±0,127 ^a	5,925±0,127 ^a	ns	6,235±0,179 ^a	5,991±0,179 ^a	5,931±0,179 ^a	5,091±0,179 ^b	**	ns
84	6,612±0,146 ^a	6,826±0,146 ^a	ns	7,245±0,207 ^a	6,629±0,207 ^{ab}	7,068±0,207 ^a	5,934±0,207 ^b	**	ns
168	7,611±0,157 ^a	7,734±0,157 ^a	ns	8,158±0,222 ^a	7,759±0,222 ^a	8,106±0,222 ^a	6,667±0,222 ^b	***	ns
240	8,375±0,146 ^a	8,608±0,146 ^a	ns	8,985±0,206 ^a	8,449±0,206 ^a	8,924±0,206 ^a	7,608±0,206 ^b	***	ns
336	9,078±0,1 ^{ABC}	9,504±0,104 ^b	*	9,809±0,148 ^c	9,128±0,148 ^{ab}	9,542±0,148 ^{bc}	8,685±0,148 ^a	***	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE

Segundo a observação da Figura 32, que representa a evolução de *Pseudomonas* spp. nas amostras embaladas sob vácuo, verifica-se um desenvolvimento menor nas amostras embadas em aerobiose, visto o caráter aeróbio destas bactérias. À temperatura de 2°C todas as amostras com OE's apresentam um efeito inibitório até às 24h de armazenamento, sendo esse efeito mais evidente na amostra com OE de murta, obtendo um valor inferior às 840h do inicial.

À temperatura de 8°C, apenas as amostras com OE de murta apresenta uma inibição às 1h de armazenamento, bem como é a amostra com teores microbianos inferiores, atingindo aproximadamente 5,8 log ufc/g às 840h de armazenamento.

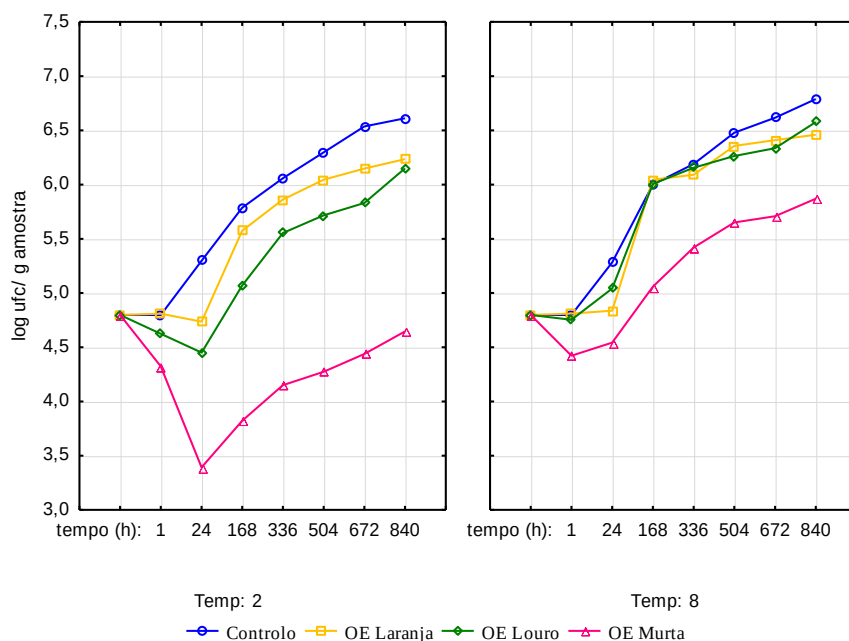


Figura 32: Gráficos de evolução das *Pseudomonas* spp. nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C

Na Tabela 31, existe diferenças significativas entre as amostras com e sem OE's, bem como entre as temperaturas a partir das 168h. Pode observar-se efeito significativo da temperatura e da aplicação de OE's a partir das 336.

Tabela 31: Contagens das *Pseudomonas* spp. (ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig.	Óleo essencial				Sig.	T x
	2	8	Temp	Controlo	Laranja	Louro	Murta	OE	OE
0	4,798±0,261 ^a	4,798±0,261 ^a	ns	4,798±0,370 ^a	4,798±0,370 ^a	4,798±0,370 ^a	4,798±0,370 ^a	ns	ns
1	4,633±0,246 ^a	4,633±0,246 ^a	ns	4,798±0,348 ^a	4,724±0,348 ^a	4,624±0,348 ^a	4,373±0,348 ^a	ns	ns
24	4,469±0,238 ^a	4,926±0,238 ^a	ns	5,290±0,337 ^a	4,786±0,337 ^a	4,746±0,337 ^a	3,967±0,337 ^a	ns	ns
168	5,063±0,129 ^a	5,778±0,129 ^b	**	5,894±0,183 ^a	5,810±0,183 ^a	45,538±0,183 ^a	4,440±0,183 ^b	***	ns
336	5,406±0,092 ^a	5,964±0,092 ^b	***	6,124±0,130 ^a	5,977±0,130 ^a	5,855±0,130 ^a	4,785±0,130 ^b	***	*
504	5,583±0,088 ^a	6,187±0,088 ^b	***	6,388±0,125 ^a	6,201±0,125 ^a	5,990±0,125 ^a	4,962±0,125 ^b	***	*
672	5,738±0,084 ^a	6,268±0,084 ^b	***	6,577±0,119 ^a	6,279±0,119 ^{ab}	6,083±0,119 ^a	5,073±0,119 ^c	***	*
840	5,910±0,056 ^a	6,424±0,056 ^b	***	6,700±0,079 ^c	6,347±0,079 ^a	6,363±0,079 ^a	5,257±0,079 ^b	***	***

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE

Salienta-se que as amostras embaladas sob vácuo apresentam uma elevada multiplicação de *Pseudomonas* em ambas as temperaturas, sendo inferior à temperatura de 2°C na amostra com OE de murta, atingindo apenas 4,6 log ufc/g aproximadamente.

2.2.6.6 Fungos (Bolores e leveduras)

Os valores médios de contagens de Fungos nas amostras controlo e com OE's de laranja, louro e murta armazenadas à temperatura de 2°C e 8°C, estão representados na Figura 33 e Tabela 32 para as amostras embaladas em aerobiose e na Figura 34 e Tabela 33 para as amostras embaladas sob vácuo. Após análise da Figura 33, pode verificar-se que os fungos apresentam não só o mesmo comportamento, mas também valores similares aos de *Pseudomonas* spp. na embalagem de aerobiose e, em ambas temperaturas, as amostras apresentam uma multiplicação dos fungos com um declive crescente acentuado. As amostras com OE's apresentam valores inferiores aos das amostras de controlo, salientando-se a amostra com OE de murta com os mesmos teores de fungos, principalmente a 2°C, não ultrapassando em média os 7log ufc/g.

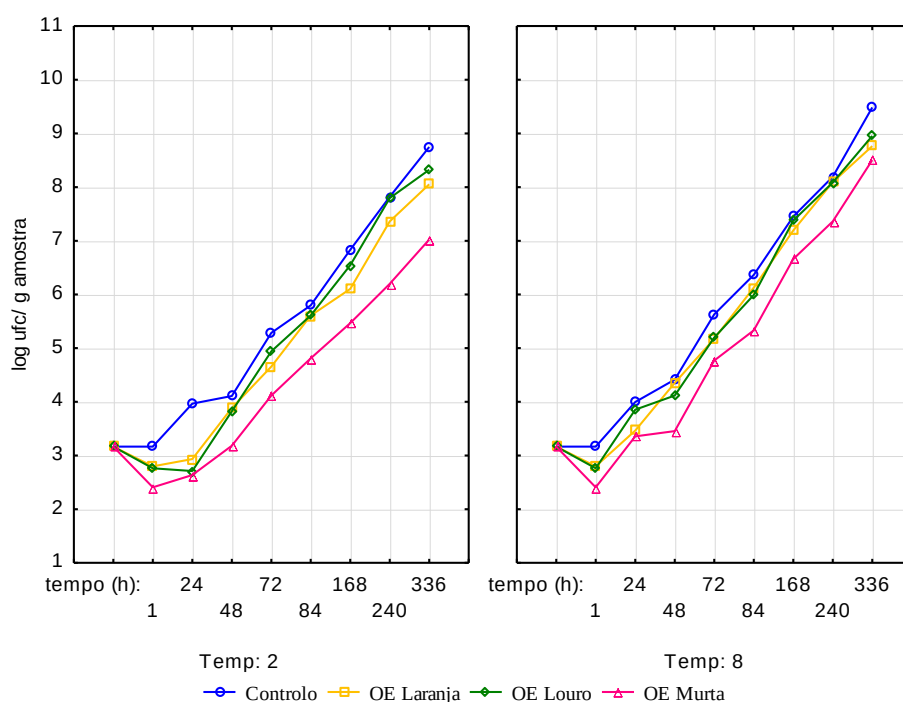


Figura 33: Gráficos de evolução dos Fungos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas em aerobiose às temperaturas 2°C e 8°C

A Tabela 32 indica-nos que apenas existem diferenças significativas entre as duas temperaturas a partir das 168h e que, entre as amostras com e sem OE's a partir das 240h existem também diferenças significativas. Verifica-se ainda que, como referido anteriormente,

a amostras com OE de murta são as que apresentam menores níveis de fungos, diferindo significativamente das amostras de controlo a partir das 240h.

Tabela 32: Contagens de Fungos (log ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada em aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	3,165±0,822 ^a	3,165±0,822 ^a	ns	3,165±0,922 ^a	3,165±0,922 ^a	3,165±0,922 ^a	3,165±0,922 ^a	ns	ns
1	2,783±0,626 ^a	2,783±0,626 ^a	ns	3,165±0,844 ^a	2,797±0,884 ^a	2,761±0,884 ^a	2,408±0,884 ^a	ns	ns
24	3,060±0,371 ^a	3,667±0,371 ^a	ns	3,981±0,524 ^a	3,199±0,524 ^a	3,283±0,524 ^a	2,997±0,524 ^a	ns	ns
48	3,750±0,257 ^a	4,085±0,257 ^a	ns	4,261±0,364 ^a	4,119±0,364 ^a	3,971±0,364 ^a	3,319±0,364 ^a	ns	ns
72	4,749±0,252 ^a	5,193±0,252 ^a	ns	5,457±0,356 ^a	4,915±0,356 ^a	5,069±0,356 ^a	4,443±0,356 ^a	ns	ns
84	5,455±0,234 ^a	5,954±0,234 ^a	ns	6,080±0,330 ^a	5,868±0,330 ^a	5,799±0,330 ^a	5,070±0,330 ^a	ns	ns
168	6,237±0,205 ^a	7,170±0,205 ^b	**	7,142±0,290 ^a	6,648±0,290 ^a	6,691±0,290 ^a	6,062±0,290 ^a	ns	ns
240	7,294±0,191 ^a AB	7,933±0,191 ^b AB	*	8,006±0,270 ^a AB A	7,727±0,270 ^{ab} AB A	7,941±0,270 ^a AB A	6,780±0,270 ^b B AB	*	ns
336	8,036±0,189 ^a AB	8,924±0,189 ^b AB	**	9,116±0,269 ^b AB B	8,409±0,269 ^{ab} AB AB	8,638±0,269 ^{ab} AB A	7,763±0,269 ^a B AB	*	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE

Relativamente às amostras embaladas sob vácuo à temperatura de 2°C verifica-se, pela análise da Figura 34, um acréscimo das contagens de fungos de aproximadamente uma unidade logarítmica desde o tempo inicial até às 840h. À temperatura de 8°C, as amostras apresentam um acréscimo de 2,8 unidades logarítmicas para as amostras de controlo, 1,8 unidades logarítmicas relativamente às amostras com OEs de louro e laranja, bem como apenas uma unidade logarítmica relativamente a amostras com OE de murta. Salienta-se ainda que, similar ao comportamento dos restantes microrganismos, existe uma inibição da multiplicação nas amostras com OE's.

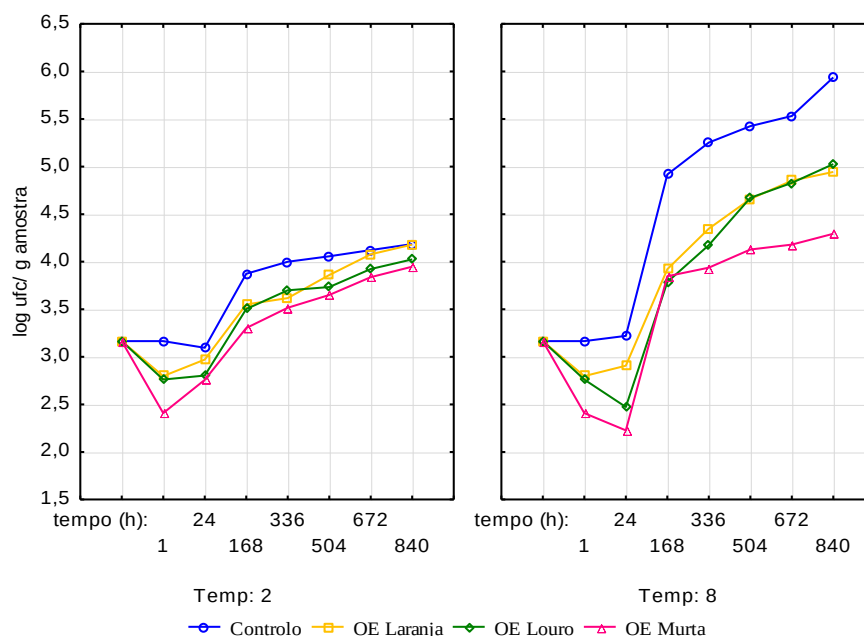


Figura 34: Gráficos de evolução dos Fungos nas amostras de controlo e de OE de laranja, louro e murta embaladas a vácuo às temperaturas 2°C e 8°C

A Tabela 33 permite-nos observar que as amostras com OE's apresentam valores inferiores às amostras do controlo, particularmente as amostras com OE de murta, contudo, apenas existem diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento a partir das 336h e entre as amostras com e sem OE's a partir das 504h. Apenas às 840h de armazenamento existe uma interação significativa entre as temperaturas e os OE's, salientando-se que as amostras embaladas a vácuo apresentam uma menor quantidade de fungos à temperatura de 2°C.

Tabela 33: Contagens de Fungos (log ufc/g, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig.	Óleo essencial				Sig.	T x
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	3,165±0,822 ^a	3,165±0,822 ^a	ns	3,165±0,922 ^a	3,165±0,922 ^a	3,165±0,922 ^a	3,165±0,922 ^a	ns	ns
1	2,783±0,626 ^a	2,783±0,626 ^a	ns	3,165±0,844 ^a	2,797±0,884 ^a	2,761±0,884 ^a	2,408±0,884 ^a	ns	ns
24	2,707±0,397 ^a	2,907±0,397 ^a	ns	3,157±0,588 ^a	2,939±0,588 ^a	2,638±0,588 ^a	2,593±0,588 ^a	ns	ns
168	3,556±0,206 ^a	4,118±0,206 ^a	ns	4,395±0,291 ^a	3,736±0,291 ^a	3,645±0,291 ^a	3,575±0,291 ^a	ns	ns
336	3,708±0,160 ^a AB	4,428±0,160 ^b AB	**	4,626±0,226 ^a AB B	3,936±0,226 ^a A AB	3,936±0,226 ^a AB AB	3,727±0,226 ^a A AB	ns	ns
504	3,825±0,142 ^a AB	4,721±0,142 ^b AB	***	4,741±0,200 ^b AB B	4,259±0,200 ^{ab} A AB	4,203±0,200 ^{ab} A AB	3,889±0,200 ^a A AB	*	ns
672	3,990±0,119 ^a AB	4,848±0,119 ^b AB	***	4,827±0,169 ^b A B	4,465±0,169 ^{ab} A AB	4,376±0,169 ^{ab} A AB	4,009±0,169 ^b A A	*	ns
840	4,084±0,098 ^a ABC	5,050±0,098 ^b ABCD	***	5,061±0,139 ^a ABC D	4,561±0,139 ^{ab} ABC BC	4,525±0,139 ^{ab} AB CD	4,121±0,139 ^a A ABC	**	*

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$). Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE

2.2.7 Análise Sumária das variáveis

2.2.7.1 Análise Físico-químicas

Com o intuito de efetuar uma discussão global de resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras armazenadas nas duas temperaturas, e embaladas em aerobiose e sob vácuo, apresentam-se gráficos de evolução destes parâmetros nas Figura 35 e 36 para as amostras embaladas em aerobiose e nas Figuras 37 e 38 para as amostras embaladas sob vácuo.

Pela análise das Figuras 35 e 36, pode observar-se que as amostras embaladas em aerobiose apresentam maior luminosidade no início do armazenamento e uma maior redução da componente vermelha (a^*) a 8°C ao longo do tempo, contudo essa redução é menos intensa nas amostras embaladas com OE's de murta e de laranja. Apresenta ainda valores crescentes de pH, principalmente a 8°C. Tal como referido na revisão bibliográfica, o pH aumenta com o aumento da carga microbiana das *Pseudomonas* spp. devido à sua atividade proteolítica.

Os teores de TBARS apenas aumentaram ligeiramente nas amostras controlo a 8°C, o que pode ser justificado pelo efeito dos OE's na redução das reações de oxidação nas amostras inoculadas.

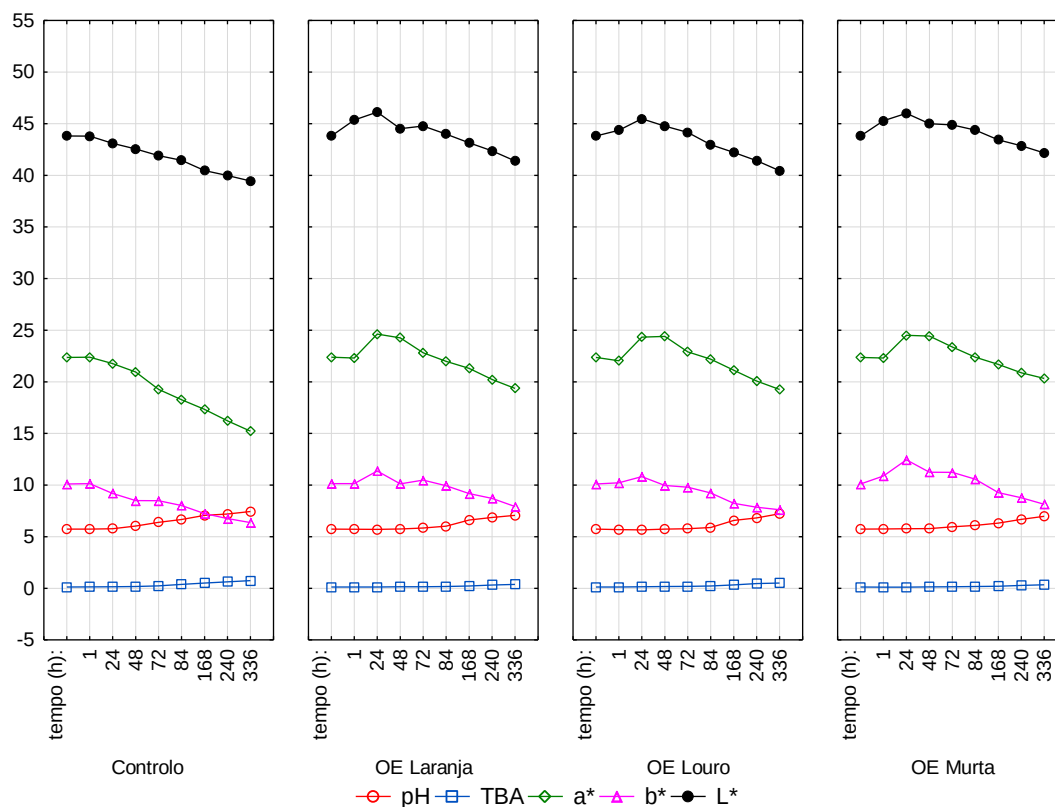


Figura 35: Gráfico de evolução das análises físico-químicas à temperatura de 2°C em aerobiose

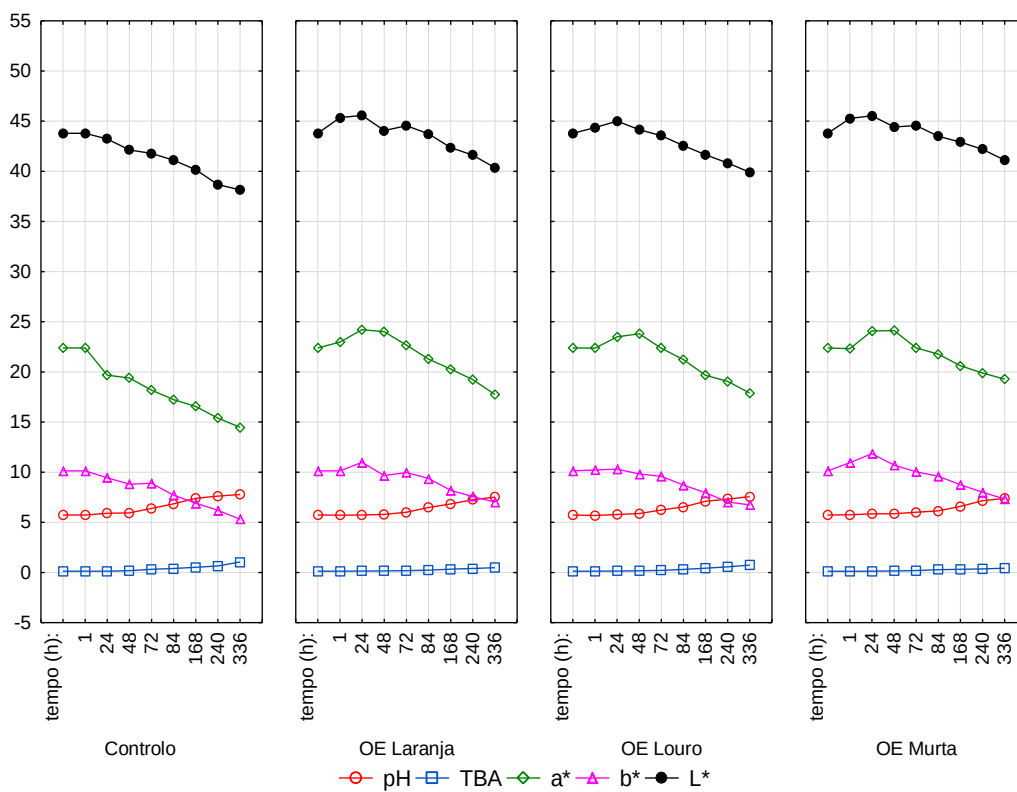


Figura 36: Gráfico de evolução das análises físico-químicas à temperatura de 8°C em aerobiose

Pela análise das Figuras 37 e 38, comparativamente às amostras embaladas em aerobiose, pode observar-se que as amostras embaladas sob vácuo apresentam maior luminosidade bem como uma maior componente vermelha (a^*), no entanto, apresenta uma redução desta componente ao longo do tempo, contudo essa redução é menos intensa nas amostras embaladas com OE's de murta e de laranja. Apresenta ainda valores inferiores de pH e de TBARS. Tal pode ser justificado pelo que está descrito na literatura de (Zhou *et al.*, 2010), que a embalagem de vácuo apresenta uma excelente eficácia na redução das reações de oxidação, nas quais formam maior componente amarela (b^*). Este comportamento é semelhante em ambas as temperaturas.

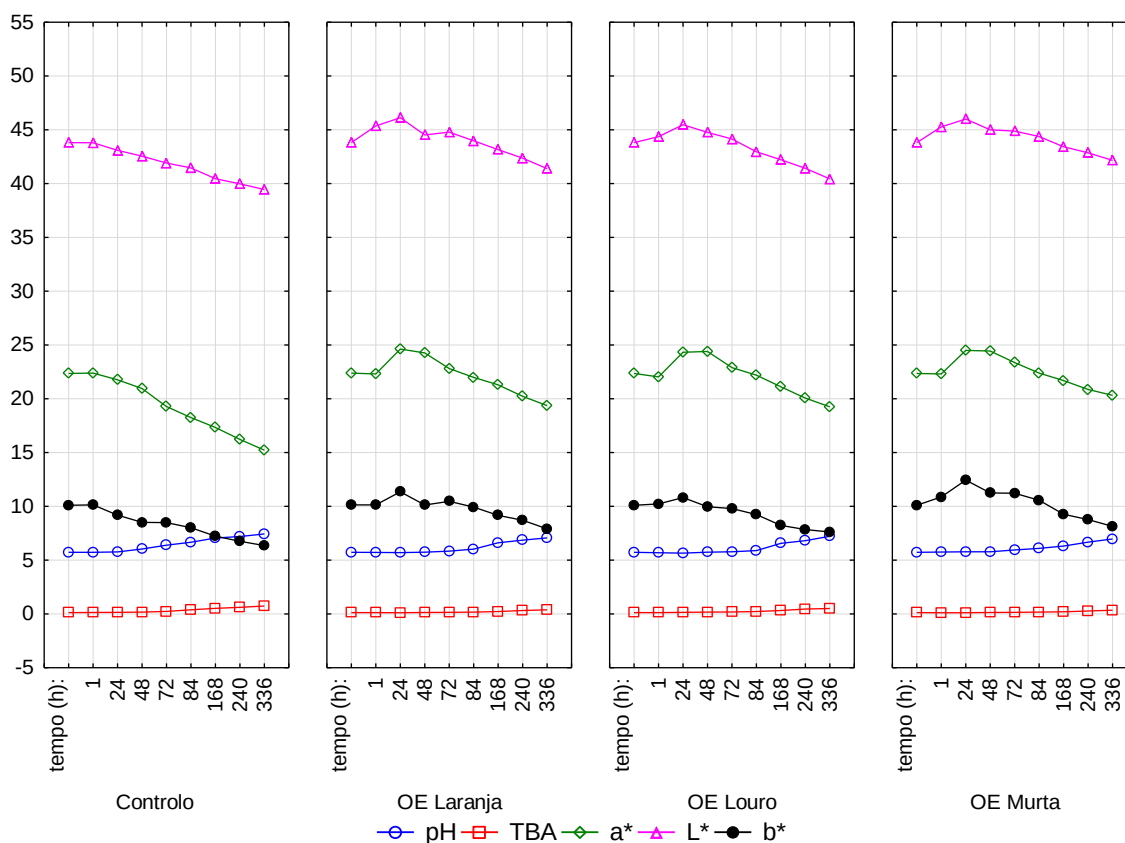
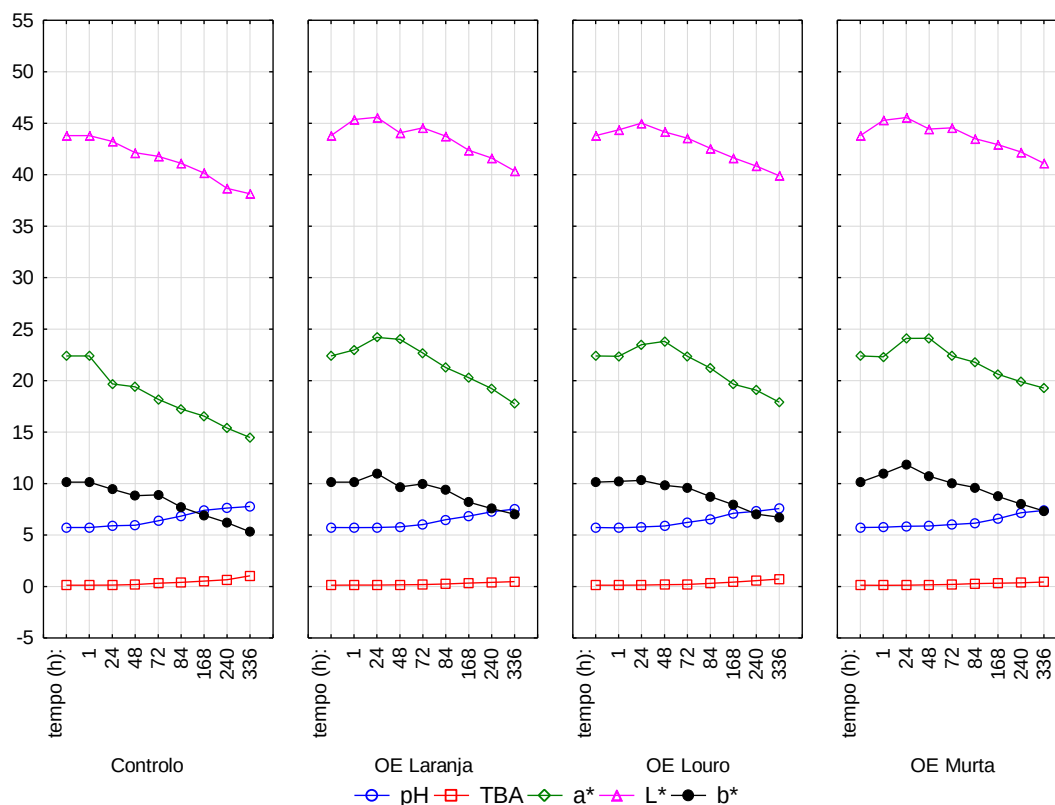


Figura 37: Gráfico de evolução das análises físico-químicas à temperatura de 2°C em Vácuo**Figura 38:** Gráfico de evolução das análises físico-químicas à temperatura de 8°C em Vácuo

Pode verificar-se em ambas as embalagens, que com o aumento do pH e de TBARS, ocorre uma diminuição dos parâmetros de cor ($L^*a^*b^*$), isto devido a que quando há um aumento dos teores de TBARS existe a formação de produtos secundários como os β -aldeídos (malonaldeído) que reagem com a mioglobina, formando oximioglobina e por sua vez metamioglobina, como referido por (Faustman *et al.*, 2010).

Observa-se ainda uma interação dos OE's com a matriz, isto visto que o OE de louro apresenta maior atividade antioxidante, mas quando inoculado na matriz os resultados não se encontram de acordo com os obtidos no ensaio *in vitro*. No entanto, o OE de murta que apresenta menor atividade antioxidante no ensaio *in vitro* é o que apresenta uma interação benéfica com a matriz, reduzindo os teores de TBARS devido à adição de compostos antioxidantes presentes no OE's retardarem a oxidação lipídica, como referido por (Faustman *et al.*, 2010).

2.2.7.2 Análise Microbiológicas

Com o intuito de efetuar uma discussão global de resultados dos parâmetros microbiológicos entre as embalagens (aeróbica e vácuo), de acordo com a temperatura e OE's,

apresentam-se gráficos de evolução destes parâmetros nas Figura 39 e 40 para as amostras embaladas em aerobiose e nas Figuras 41 e 42 para as amostras embaladas sob vácuo.

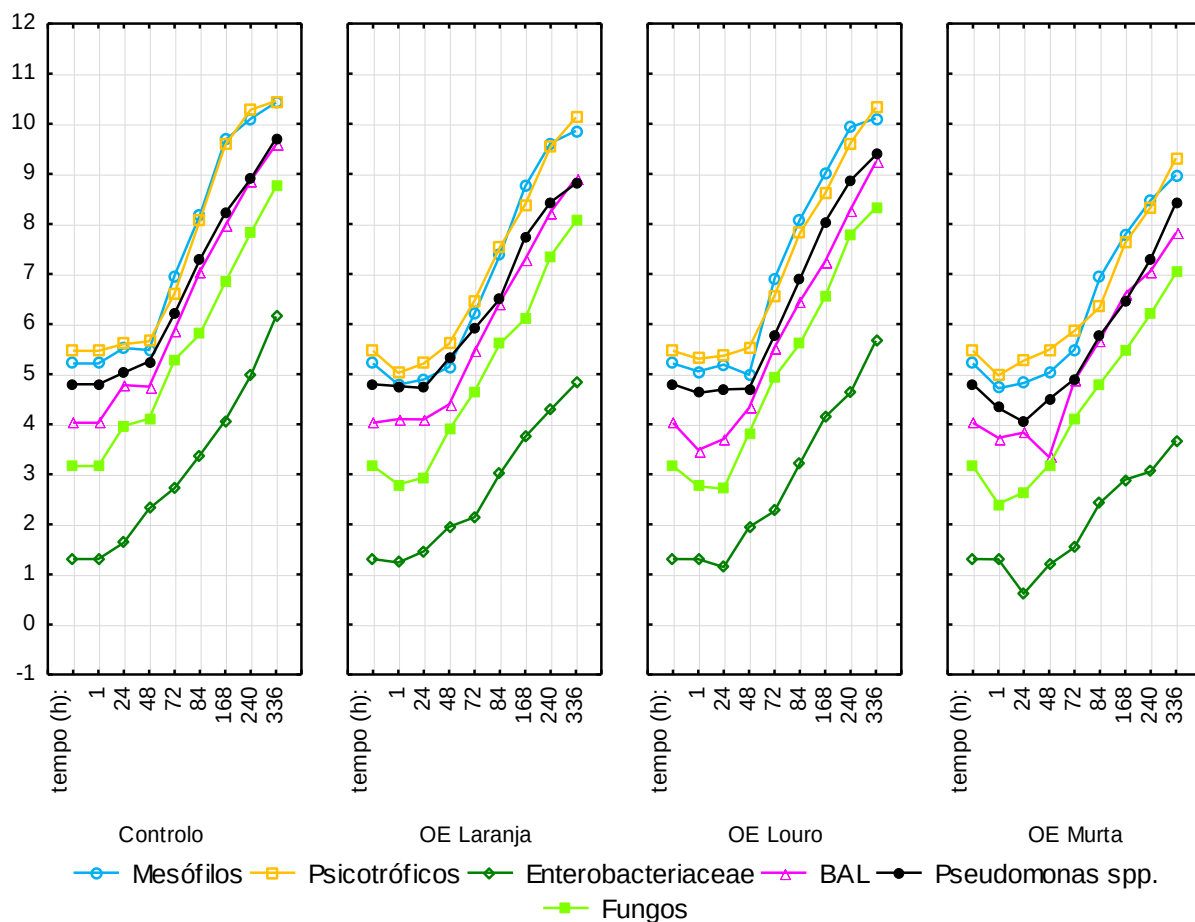


Figura 39: Gráfico de evolução da microbiota à temperatura de 2°C em aerobiose

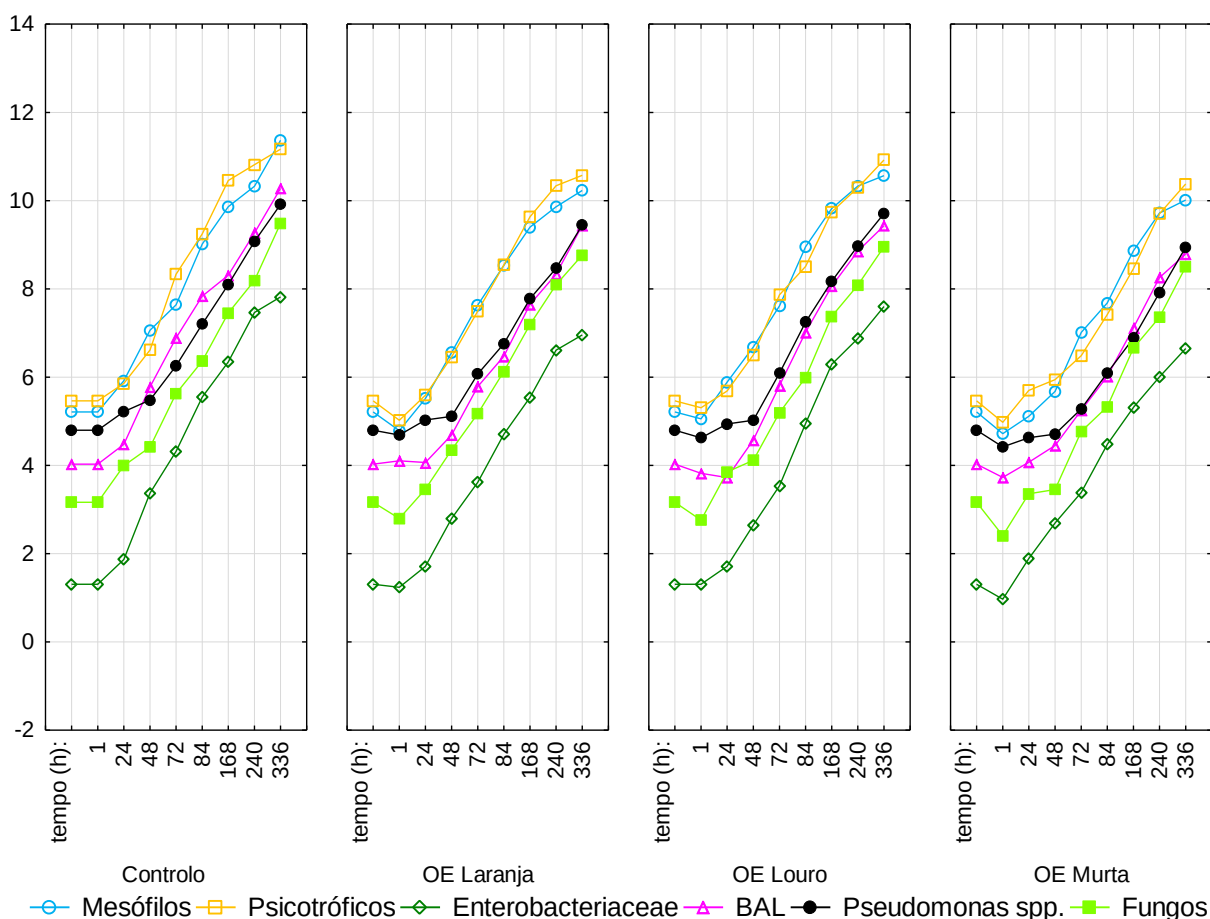


Figura 40: Gráfico de evolução da microbiota à temperatura de 8°C em aerobiose

Como evidenciado pelos gráficos de evolução das Figuras 39 e 40, as amostras embaladas em aerobiose apresentam teores mais elevados de microrganismos, que as amostras embaladas sob vácuo, o que era expectável. Sendo isto justificado com referido por (Zhou *et al.*, 2010), que a embalagem de vácuo apresenta eficácia numa redução microbiana, pela inexistência de oxigénio disponível. Verifica-se ainda que, o OE de murta tem um efeito positivo na redução da carga microbiana principalmente a 2°C. Nota-se algum efeito da ação dos óleos essenciais sobre a evolução das BAL, comparativamente ao observado nas amostras controlo, o que pode ser explicado pela atividade antimicrobiana dos OE's ser superior sobre bactérias Gram positivos. (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Nas Figuras 41 e 42, embalagem sob vácuo, observa-se um padrão deteriorativo muito distinto do observado em aerobiose. Realça-se que existe uma multiplicação muito superior das BAL do que de *Pseudomonas* spp., sendo isso explicado pelo aumento da multiplicação das BAL apresentarem um efeito benéfico na acidificação da carne, ou seja, na diminuição do pH, devido à formação do ácido láctico. *Pseudomonas* spp. diminuem a sua multiplicação com a

diminuição do pH como referido por (Argyri *et al.*, 2011) e essencialmente pela ausência de oxigénio. Também pode observar-se um efeito dos óleos essenciais na redução de *Enterobacteriaceae*, particularmente nas amostras inoculadas com OE's de murta e de laranja nas amostras a 2°C e apenas de murta nas amostras a 8°C, mantendo-se os seus teores inferiores a 3log ufc/g em média nessas amostras.

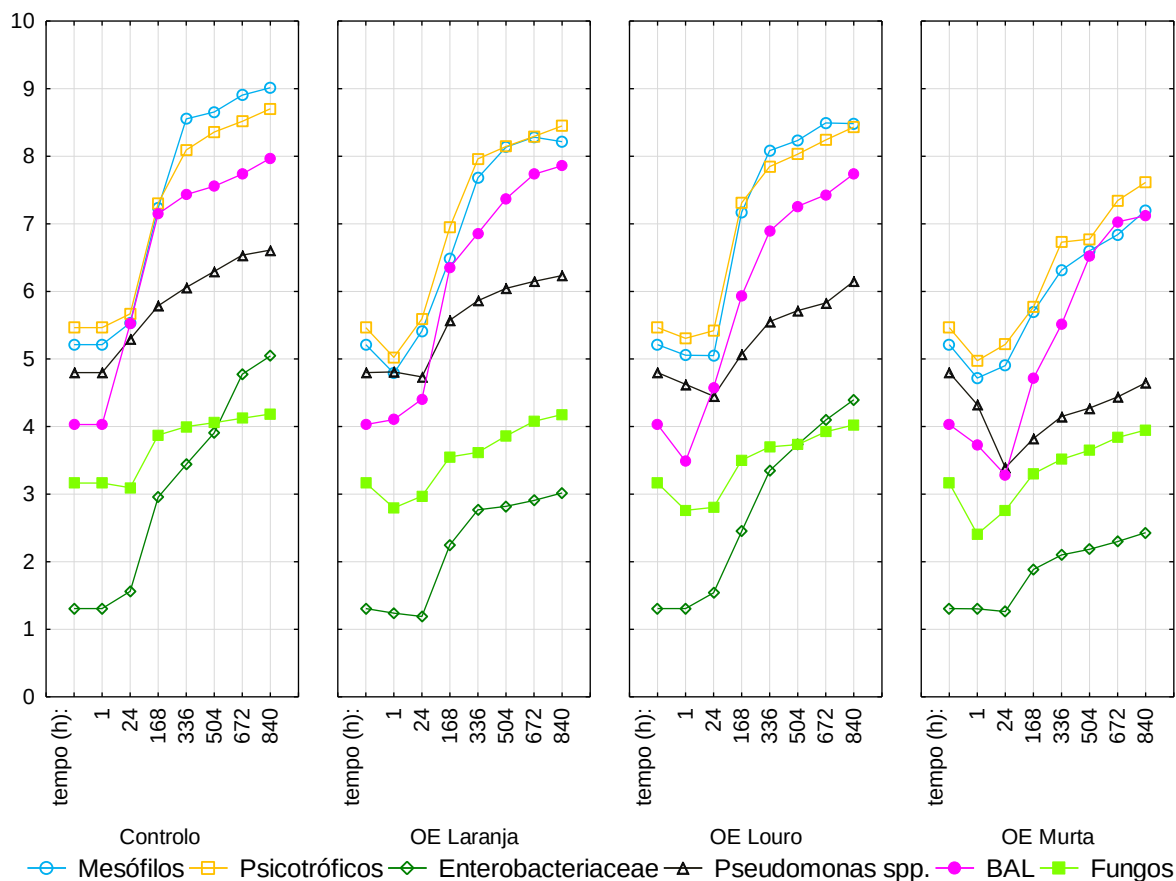


Figura 41: Gráfico de evolução das bactérias analisadas relativamente às temperaturas de 2°C em Vácuo

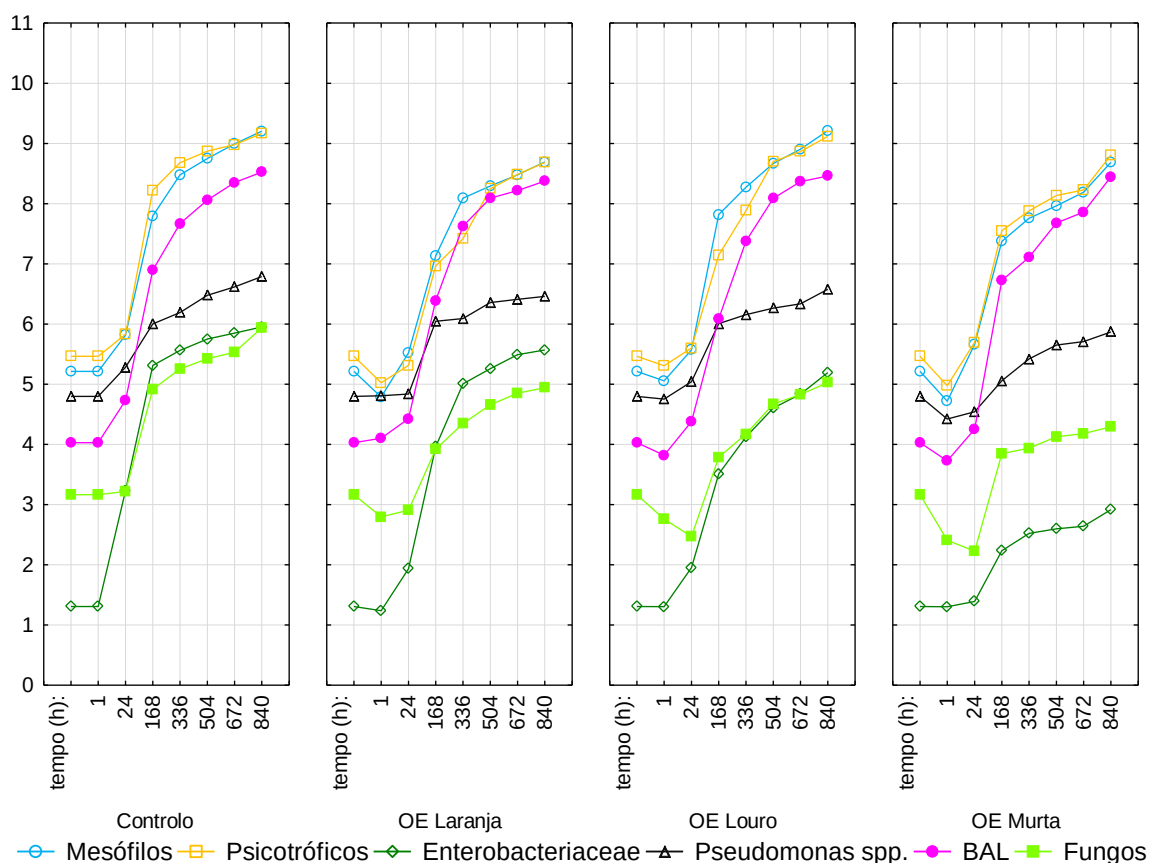


Figura 42: Gráfico de evolução das bactérias analisadas relativamente às temperaturas de 8°C em Vácuo

Pode ainda referir-se que existe um efeito antimicrobiano pelos OE's nas amostras de ambas as embalagens, de salientar o OE de murta o que apresenta um efeito antimicrobiano superior na matriz.

2.2.8 Análise Sensorial

Os resultados da análise sensorial estão apresentados na Figura 43 e na Tabela 34 para a embalagem de aerobiose e Figura 44 e Tabela 35 para a embalagem a vácuo.

A avaliação global de frescura está avaliada numa escala de 0 a 15 cm, sendo classificada como fresca de 10-15 cm, semi-fresca de 5-10 cm e deteriorada de 0 a 5 cm, para melhor estabelecer o tempo de vida útil das amostras.

No tempo inicial, as amostras apresentam-se frescas com um valor de 14,2 cm para a avaliação global de frescura, segundo o painel de provadores.

Ao longo do período de armazenamento das amostras, verifica-se um decréscimo da frescura da carne, sendo determinado o tempo de vida útil das amostras pela linha vermelha que se encontra nos gráficos de evolução colocada aos 5cm.

Na Figura 43, as amostras armazenadas à temperatura de 8°C apresentam valores de frescura inferiores aos das amostras armazenadas à temperatura de 2°C como seria expectável. As amostras de controlo apresentam um tempo de vida útil até às 77h (~3 dias) e 120h (5 dias), aproximadamente, para o armazenamento a 8 e 2°C respetivamente. As amostras com OE's apresentam uma AGF superior às amostras controlo, devido ao efeito antimicrobiano e antioxidante dos OE's, podendo considerar-se para as amostras com OE de murta uma apreciação sensorial aceitável de ~288h (~12 dias) e de ~120h (5 dias) a 2 e 8°C respetivamente.

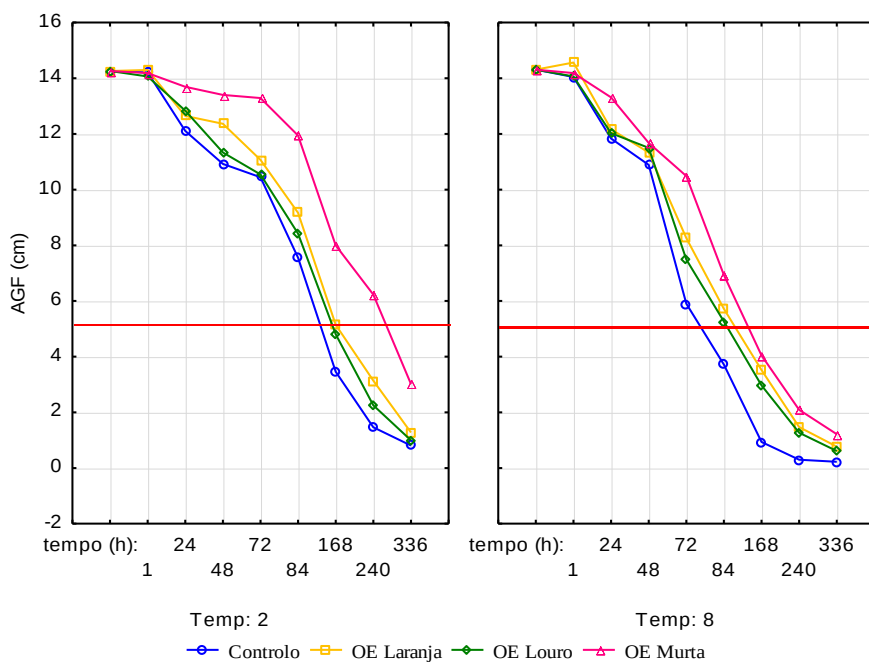


Figura 43: Gráfico de evolução da avaliação global de frescura das amostras de controlo, OE de laranja, louro e murta em embalagem de aerobiose às temperaturas de 2°C e 8°C

O efeito dos OE's confirma-se pela análise da Tabela 34, pois verifica-se um efeito significativo a partir das 24h, como as amostras com OE apresentarem diferenças significativas em relação às amostras de controlo, em particular com as amostras com OE de murta.

As amostras deterioram-se mais precocemente quando armazenadas à temperatura de 8°C com repercussões em termos sensoriais, visto que a ação da microbiota e os fenómenos (bio) químicos causam a formação de compostos com odores desagradáveis, bem como descoloração (Faustman *et al.*, 2010), muito mais precocemente do que a 2°C, sendo essa diferença significativa nas amostras analisadas a partir das 48h de armazenamento.

Tabela 34: Avaliação global de frescura (cm, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada em aerobiose

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	14,284±0,232 ^a	14,284±0,232 ^a	ns	14,284±0,232 ^a	14,284±0,232 ^a	14,284±0,232 ^a	14,284±0,232 ^a	ns	ns
1	14,189±0,211 ^a	14,189±0,211 ^a	ns	14,126±0,298 ^a	14,430±0,298 ^a	14,064±0,298 ^a	14,183±0,298 ^a	ns	ns
24	12,822±0,239 ^a	12,335±0,239 ^a	ns	11,973±0,339 ^a	12,408±0,339 ^{ab}	12,431±0,339 ^{ab}	13,502±0,339 ^b	*	ns
48	12,006±0,183 ^b	11,349±0,183 ^a	*	10,906±0,263 ^a	11,848±0,263 ^{ab}	11,419±0,263 ^{ab}	12,538±0,263 ^b	*	ns
72	11,336±0,294 ^b	8,034±0,294 ^a	***	8,172±0,416 ^a	9,663±0,416 ^a	9,017±0,416 ^a	10,889±0,416 ^b	***	ns
84	9,270±0,444 ^b	5,408±0,444 ^a	***	5,635±0,627 ^a	7,442±0,627 ^{ab}	6,842±0,627 ^a	9,438±0,627 ^b	**	ns
168	5,351±0,257 ^b	2,867±0,257 ^a	***	2,295±0,363 ^b	4,333±0,363 ^a	3,888±0,363 ^a	6,021±0,363 ^b	***	ns
240	3,272±0,266 ^b	1,282±0,266 ^a	***	0,882±0,376 ^a	2,305 ±0,376 ^a	1,760±0,376 ^a	4,161±0,376 ^b	***	*
336	1,523±0,252 ^b	0,704±0,252 ^a	*	0,514±0,356 ^a	1,021±0,356 ^{ab}	0,803±0,356 ^{ab}	2,117±0,356 ^b	*	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE

Na Figura 44 verifica-se que a AGF das amostras diminui com o aumento do período de armazenamento bem como na temperatura de 8°C, no entanto apresentam um tempo de vida útil superior às amostras embaladas em aerobiose. As amostras de controlo apresentam um tempo de vida útil sensorial inferior às amostras com OE's, obtendo um período máximo às 336h (14d) e 672h (28d), quando armazenadas à temperatura de 8°C e 2°C, respetivamente. As amostras às 600h de armazenamento, aproximadamente, com OE de murta apresentam um tempo de vida útil superior às outras amostras com OE's à temperatura de 8°C e, à temperatura de 2°C não chegam a atingir o período máximo de vida útil sensorial, sendo classificadas como amostras ainda semi-frescas às 840h.

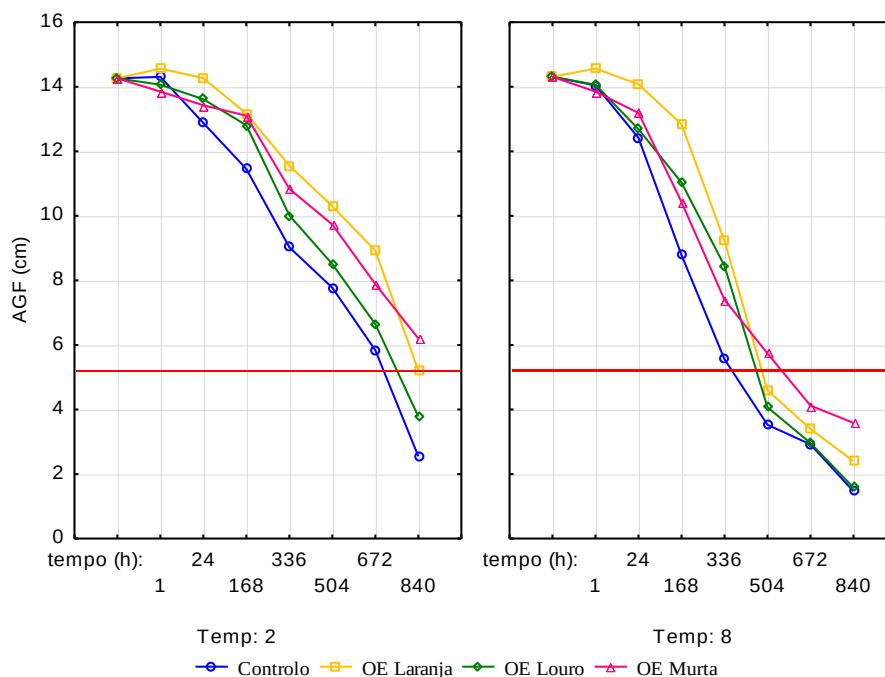


Figura 44: Gráfico de evolução da avaliação global de frescura das amostras de controlo, OE de laranja, louro e murta em embalagem de vácuo às temperaturas de 2°C e 8°C

O efeito dos OE's é notável às 24h, como se pode observar na Tabela 35, pois as amostras com OE diferem significativamente das amostras de controlo. As amostras com OE de murta são as que apresentam os valores superiores de AGF, logo, são os que apresentam um maior tempo de vida útil sensorial. As amostras apresentam uma deterioração superior quando armazenadas à temperatura de 8°C, visto que a deterioração (aumento da carga microbiana e da oxidação lipídica) é superior a temperaturas superiores a 2°C, notando-se essa diferença entre temperaturas de armazenamento às 168h. O tempo máximo de vida útil sensorial é superior no armazenamento das amostras à temperatura de 2°C para ambas as embalagens, sobretudo na embalagem sob vácuo.

Tabela 35: Avaliação global de frescura (cm, média e desvio padrão) em carne de bovino ao longo do período de armazenamento de acordo com a temperatura e óleo essencial embalada a vácuo

Tempo (horas)	Temperatura (°C)		Sig. Temp	Óleo essencial				Sig. OE	T x OE
	2	8		Controlo	Laranja	Louro	Murta		
0	14,284±0,232 ^a	14,284±0,232 ^a	ns	14,284±0,232 ^a	14,284±0,232 ^a	14,284±0,232 ^a	14,284±0,232 ^a	ns	ns
1	14,189±0,211 ^a	14,189±0,211 ^a	ns	14,126±0,298 ^a	14,430±0,298 ^a	14,064±0,298 ^a	14,183±0,298 ^a	ns	ns
24	13,547±0,245 ^a	13,092±0,245 ^a	ns	12,647±0,346 ^a	14,172±0,346 ^b	13,150±0,346 ^{ab}	13,308±0,346 ^{ab}	*	ns
168	12,634±0,344 ^b	10,773±0,344 ^a	**	10,120±0,486 ^a	13,003±0,486 ^b	11,921±0,486 ^{ab}	11,768±0,486 ^{ab}	**	ns
336	10,336±0,320 ^b	7,659±0,320 ^a	***	7,293±0,452 ^b AB C	10,390±0,452 ^a	9,235±0,452 ^a	9,119±0,452 ^{ab}	**	ns
504	9,078±0,319 ^b	4,484±0,319 ^a	***	5,651±0,451 ^a	7,450±0,451 ^{ab}	6,287±0,451 ^{ab}	7,735±0,451 ^b	*	ns
672	7,320±0,334 ^b	3,352±0,334 ^a	***	4,376±0,473 ^a	6,159±0,473 ^{ab}	4,804±0,473 ^{ab}	6,005±0,473 ^b	*	ns
840	4,338±0,370 ^b	2,258±0,370 ^a	***	2,008±0,523 ^a	3,808±0,523 ^{ab}	2,683±0,523 ^a	4,892±0,523 ^b	***	ns

ns – não significativo ($p \geq 0,05$); * – significativo ($p < 0,05$); ** – muito significativo ($p < 0,01$); *** – altamente significativo ($p < 0,001$); Médias na mesma linha que apresentam letras diferentes distinguem-se significativamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas relativas à interação temperatura x OE

2.2.9 Correlações de pearson

A tabela 36 representa a correlação de pearson entre os parâmetros descritos, estando distribuída com o valor de p simetricamente ao valor de R^2 , simetricamente. Como evidenciado na tabela, os parâmetros físico-químicos pH e TABRS bem como os parâmetros microbiológicos mesófilos e psicrotróficos totais, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp, BAL e Fungos estão correlacionados negativamente com os parâmetros a^* , L^* e AGF. Isto é, com o aumento do pH, TBARs (oxidação lipídica), mesófilos e psicrotróficos há uma diminuição da luminosidade, componente vermelha da carne, logo uma menor AGF, o que é concordante com os resultados anteriormente apresentados.

Verifica-se ainda uma correlação positiva entre as contagens microbianas e o aumento de pH, o que está relacionado com a formação de aminas e outros compostos básicos que fazem aumentar o pH da carne.

Tabela 36: Correlação de Pearson das amostras de controlo e com OE's para ambas as embalagens a 8°C e 2°C

	pH	TBA	Mesófilos	Psicrotróficos	<i>Enterobacteriaceae</i>	BAL	<i>Pseudomonas</i> spp.	Fungos	a*	b*	L*	AGF (cm)
pH	1,000	0,385	0,441	0,477	0,512	0,178	0,161	0,672	0,066	-0,396	-0,538	-0,46
TBA	p=0,000	1,000	0,449	0,449	0,487	0,322	0,175	0,429	-0,127	-0,199	-0,251	-0,49
Mesófilos	p=0,000	p=0,000	1,000	0,949	0,761	0,787	0,386	0,590	-0,362	-0,010	-0,033	-0,86
Psicrotróficos	p=0,000	p=0,000	p=0,00	1,000	0,727	0,767	0,383	0,609	-0,363	-0,059	-0,061	-0,86
Enterobacteriaceae	p=0,00	p=0,000	p=0,00	p=0,00	1,000	0,523	0,340	0,550	-0,092	-0,227	-0,237	-0,71
BAL	p=0,003	p=0,000	p=0,00	p=0,00	p=0,00	1,000	0,300	0,452	-0,343	0,140	0,126	-0,66
<i>Pseudomonas</i> spp.	p=0,007	p=0,003	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	1,000	0,419	-0,203	-0,040	-0,003	-0,34
Fungos	p=0,00	p=0,000	p=0,00	p=0,00	p=0,00	p=0,000	p=0,000	1,000	-0,138	-0,071	-0,250	-0,52
a*	p=0,269	p=0,034	p=0,000	p=0,000	p=0,127	p=0,000	p=0,001	p=0,021	1,000	-0,153	-0,362	0,40
b*	p=0,000	p=0,001	p=0,870	p=0,328	p=0,000	p=0,019	p=0,511	p=0,238	p=0,011	1,000	0,697	0,18
L*	p=0,00	p=0,000	p=0,580	p=0,312	p=0,000	p=0,036	p=0,957	p=0,000	p=0,000	p=0,00	1,000	0,07
AGF (cm)	p=0,000	p=0,000	p=0,00	p=0,00	p=0,00	p=0,00	p=0,000	p=0,00	p=0,000	p=0,002	p=0,215	1,00

2.2.10 Análise Quimiométrica

A análise quimiométrica dos resultados experimentais baseou-se na análise em componentes principais (PCA), na análise discriminante linear (DA) e nas regressões multivariadas usando as técnicas de regressão por componente principais (PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS-R). Para a análise em componentes principais utilizaram-se valores de absorvâncias do espectro de FTIR na região de 1750 e 950 cm^{-1} . A análise em componentes principais foi efectuada utilizando quer as variáveis microbiológicas e físico-químicas, quer as variáveis espectrais medidas no FTIR. As restantes análises basearam-se neste último conjunto de variáveis.

- Análise em componentes principais com variáveis microbiológicas e físico-químicas

Os resultados da análise em componentes principais das amostras de controlo, de OE de louro e de murta estão ilustradas na Figura 45 para a embalagem em aerobiose e na Figura 46 para a embalagem sob vácuo.

As características das análises encontram-se resumidas na Tabela 37.

Os gráficos presentes na Figura 45 foram obtidos com base em dois factores F1 e F2 apresentam valores de KMO de 0,88, 0,81 e 0,80 para as amostras de controlo, inoculadas com OE's de louro e de murta, respetivamente, considerando-se uma boa amostragem, visto ser superior a 0,5. A Figura 46 explica 71,18 %, 69,75 % e 69,06% da variabilidade da amostragem para as amostras de controlo, inoculadas com OE's de louro e de murta, respectivamente, embaladas em aerobiose e armazenadas às temperaturas de 2 e 8°C.

Pela análise da Figura 45, pode observar-se uma projecção das amostras armazenadas à temperatura de 2°C no factor 1 e das amostras armazenadas à temperatura de 8°C no fator 2, referindo-nos isto que, existe efeito da temperatura na qualidade das amostras, devido à separação entre fatores ser saliente em todas as amostras, controlo e inoculadas com OE's de louro e murta. Esta separação, é mais evidente nas amostras inoculadas com OE de murta e na amostra controlo, e menos evidente nas amostras inoculadas com OE de louro, devido a estas se apresentarem mais dispersas entre os dois fatores (F1 e F2).

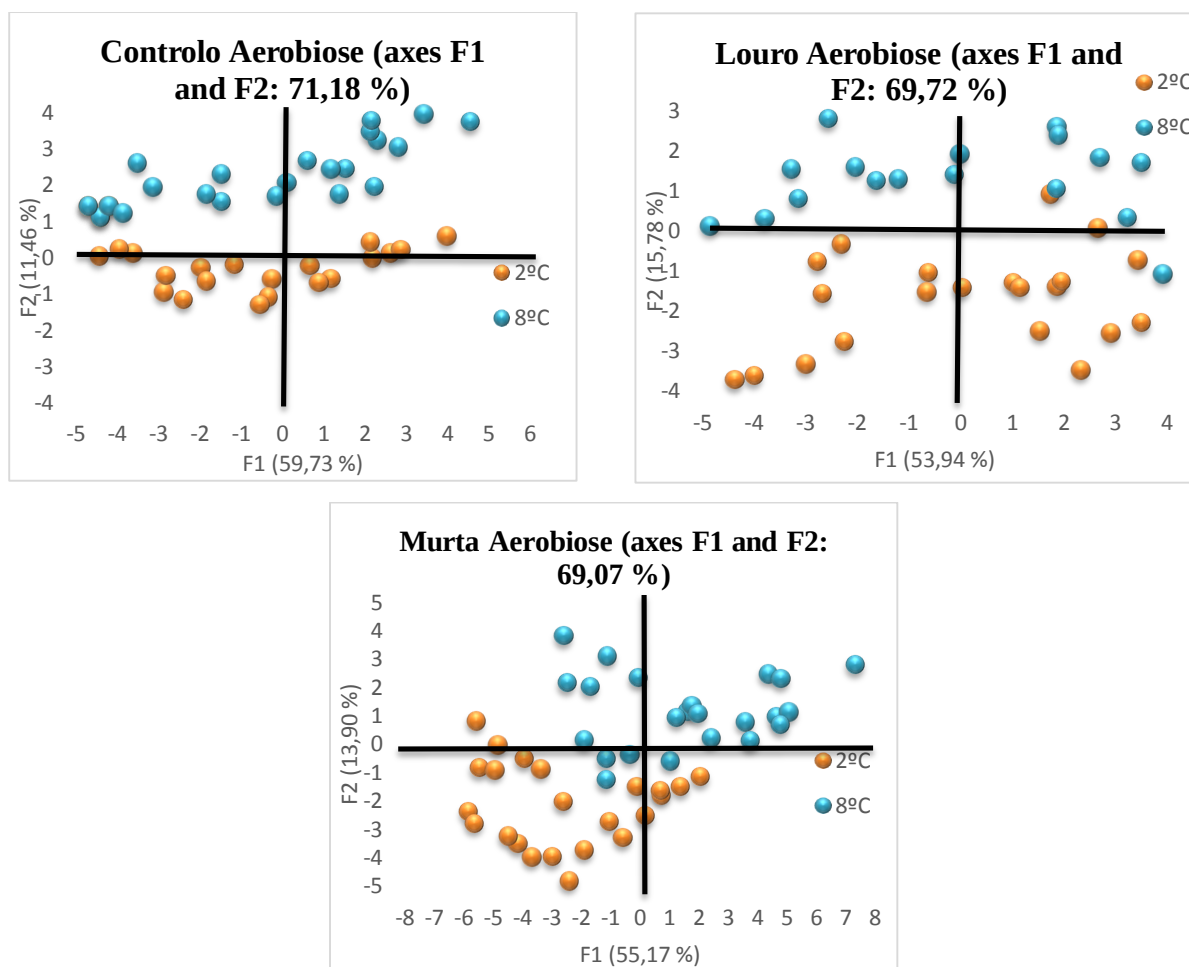


Figura 45: Gráfico das observações obtido por PCA para os OE's em **aerobiose** utilizando variáveis microbiológicas e físico-químicas

Os gráficos presentes na Figura 46 foram obtidos com base em dois factores F1 e F2. Os valores de KMO para embalagem sob vácuo para as amostras de controlo e amostras inoculadas com OE's de louro e de murta são 0,72, 0,71 e 0,78, respectivamente que explicam 56,35 %, 60,37 % e 61,56% da variabilidade da amostragem para as amostras de controlo, com OE's de louro e de murta, respetivamente, embaladas em vácuo e armazenadas às temperaturas de 2 e 8°C.

Pela análise da Figura 46, pode observar-se uma projeção das amostras armazenadas à temperatura de 2°C no factor 1 e das amostras armazenadas à temperatura de 8°C no fator 2, referindo-nos isto que, existe efeito da temperatura nas amostras, devido à separação entre factores ser evidente em todas as amostras, controlo e inoculadas com OE's de louro e murta. Esta separação, é mais notória nas amostras inoculadas com OE's de louro e murta, e menos

evidente nas amostras controle, devido a estas se apresentarem mais dispersas entre os dois fatores (F1 e F2).

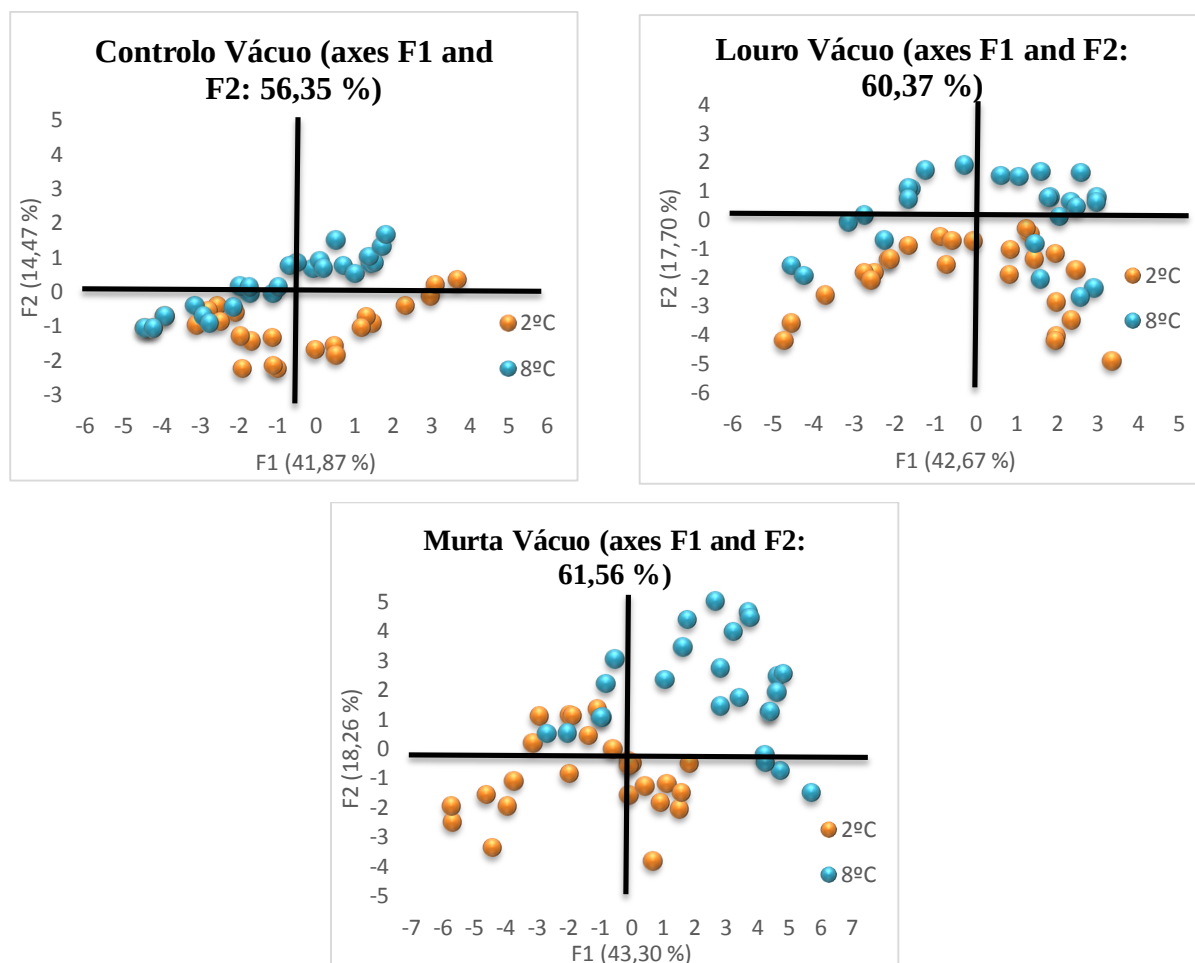


Figura 46: Gráfico das observações obtido por PCA para os OE's em **vácuo** utilizando variáveis microbiológicas e físico-químicas

Tabela 37: Fatores de determinação da PCA em função das variáveis microbiológicas e físico-químicas

	Controlo				Louro				Murta			
	Aerobiose		Vácuo		Aerobiose		Vácuo		Aerobiose		Vácuo	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
Eigenvalue	7,765	1,48	5,44	1,88	7,01	2,05	5,54	2,30	7,17	1,80	5,62	2,37
Variability (%)	59,72	11,45	41,87	14,47	53,94	15,71	42,67	17,70	55,16	13,90	43,29	18,26
Cumulative %	59,72	71,18	41,87	56,34	53,94	69,75	42,67	60,38	55,16	69,06	43,29	61,56

- Análise em componentes principais usando variáveis espectrais

Os resultados da análise em componentes principais com variáveis espectrais das amostras controle, e inoculadas com OE's de louro e de murta são apresentadas na Figura 47.

O gráfico foi obtido com base em dois factores, F1 e F2, explicando 66,14% da variabilidade da amostragem para as amostras controle, e inoculadas com OE's de louro e de murta. Esta amostragem apresenta ainda um índice de adequação da amostragem (KMO) de 0,80, ou seja, uma boa amostragem.

Como pode verificar-se as amostras encontram-se distribuídas pelo plano F1/F2 agrupadas em três grupos que coincidem com o tipo de OE utilizado, justificando a boa amostragem.

Observa-se ainda que, as amostras inoculadas com OE de louro diferenciam-se das amostras controle, devido a estarem em fatores diferentes, bem como as amostras inoculadas com OE de murta se diferenciam parcialmente das amostras controle.

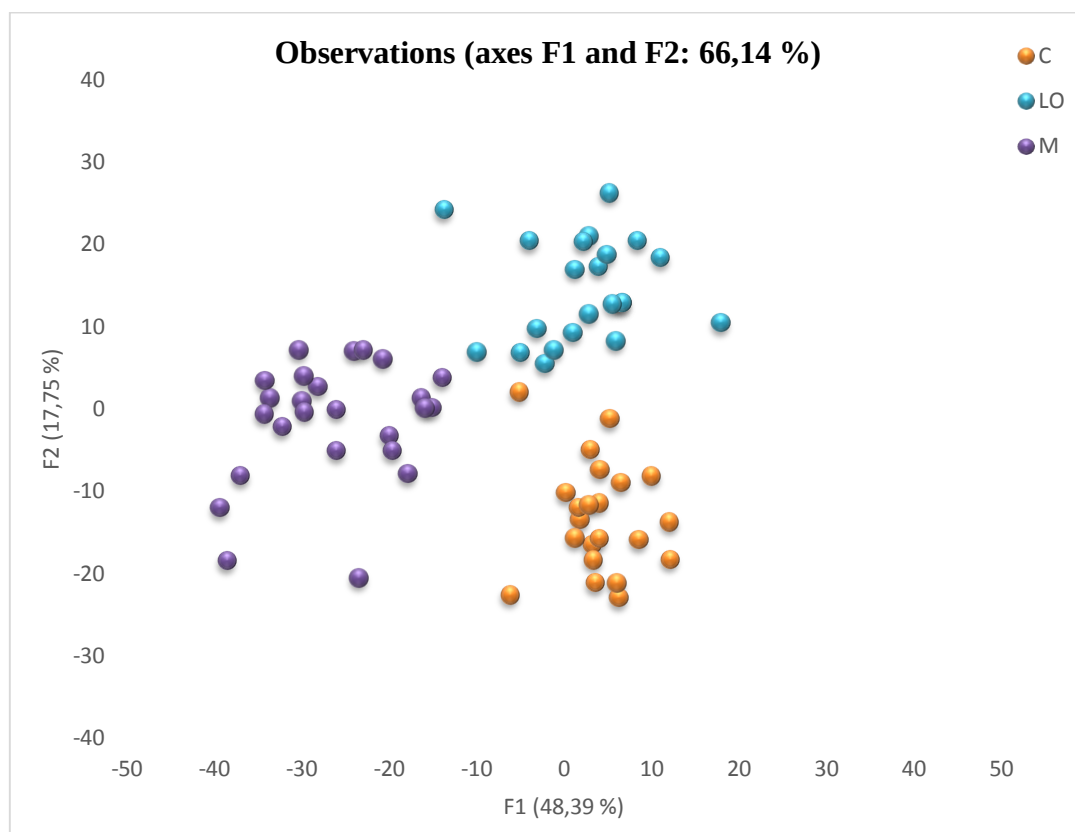


Figura 47: Gráfico das observações obtido por PCA utilizando variáveis espectrais

- Análise discriminante linear usando variáveis espectrais

Para quantificar a diferença da avaliação global de frescura nas amostras controle e inoculadas com OE de louro e OE de murta, aplicou-se a análise discriminante ao mesmo conjunto de amostras, usando como variáveis as absorvâncias espectrais.

As Figuras 48, 49, 50 e representam os gráficos de observações com dois fatores, F1 e F2, que explicam 100% da variância. Nos três gráficos, as amostras encontram-se distribuídas em grupos distintos, mas que por vezes interceptam-se, o que poderá estar relacionado com a inclusão na categoria semi-fresca de frescura.

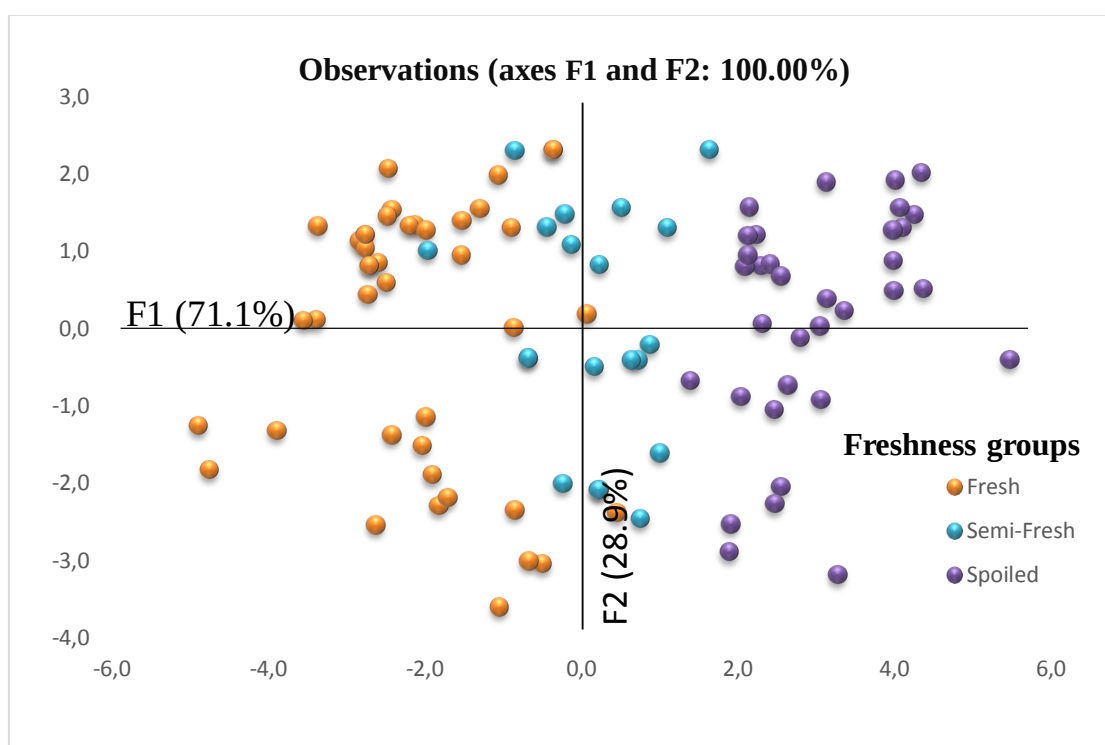


Figura 48: Gráfico das observações resultante da análise discriminante para o controlo em função da AGF utilizando as variáveis espectrais

As Tabelas 39, 40 e 41 mostram os resultados das matrizes de determinação para o conjunto de amostras de calibração e validação cruzada.

Na Figura 48, pode observar-se uma distinção evidente da classificação das amostras deterioradas das frescas, nas amostras controlo pelo painel.

A partir da Tabela 39, conclui-se que, para o conjunto de amostras de calibração, a análise discriminante permite classificar corretamente 85,36% das amostras de controlo quanto à sua frescura. Destes 85,36%, apenas 79,28% dos resultados foram corretamente classificados pelo painel de provadores quando submetidos à validação cruzada, visto que das 44 amostras frescas de controlo apenas 38 foram classificadas corretamente, das 32 amostras deterioradas

de controlo apenas 28 foram classificadas corretamente e das 20 amostras semi-frescas de controlo apenas 13 foram classificadas corretamente.

Tabela 38: Matriz de confusão para o conjunto de amostras de controlo de calibração e para validação cruzada com base nas observações dos dados espectrais para AGF.

Calibração					
	F	D	SF	Total	% correct
F	39	1	4	42	92,86
D	2	30	2	34	88,24
SF	1	4	15	20	75,00
Total	42	35	21	98	85,36

Validação					
	F	D	SF	Total	% correct
F	38	0	4	42	90,48
D	3	28	3	34	82,35
SF	3	4	13	20	65,00
Total	44	32	20	96	79,28

Na Figura 49, pode observar-se uma distinção evidente da classificação das amostras deterioradas das frescas, nas amostras controlo pelo painel.

A partir da Tabela 39 conclui-se que, para o conjunto de amostras de calibração, a análise discriminante permite classificar corretamente 92,02% das amostras com OE de louro quanto à sua frescura. Destes 92,02%, apenas 82,96% dos resultados foram classificados corretamente quando submetidos à validação cruzada, visto que das 42 amostras frescas de controlo 41 foram classificadas corretamente, das 30 amostras deterioradas de controlo apenas 26 foram classificadas corretamente e das 24 amostras semi-fresca de controlo apenas 14 foram classificadas corretamente.

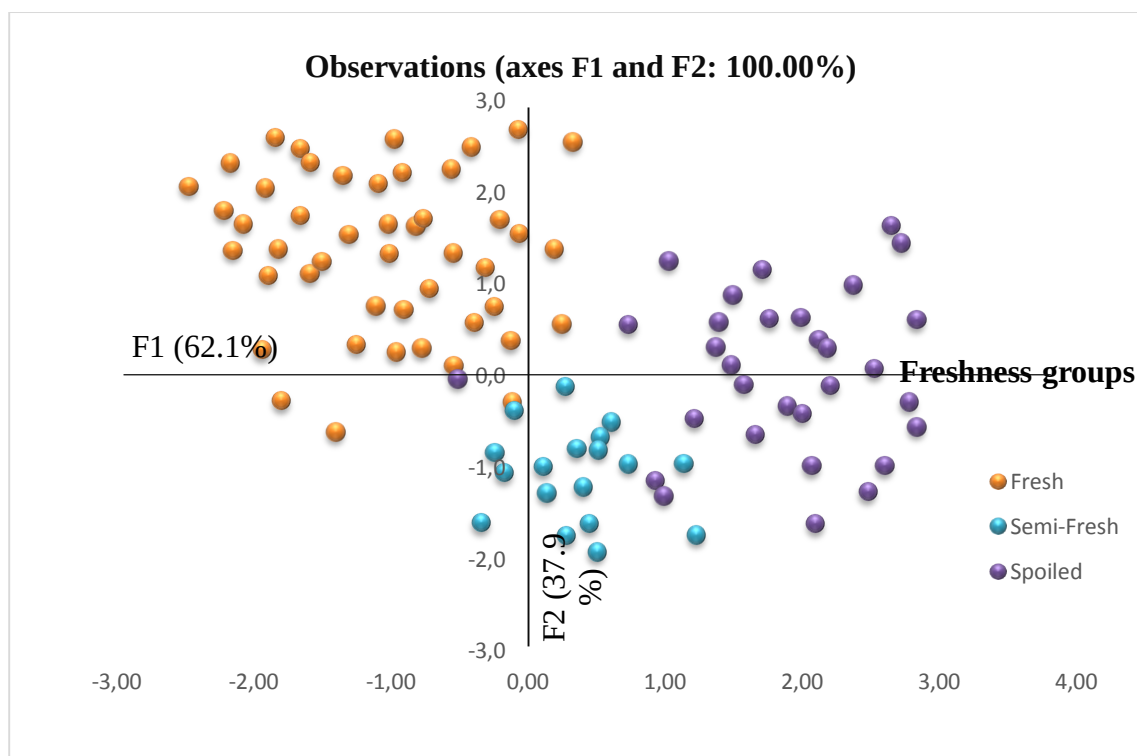


Figura 49: Gráfico das observações resultante da análise discriminante para o OE de louro em função da AGF utilizando as variáveis espectrais

Tabela 39: Matriz de confusão para o conjunto de amostras de OE de Louro de calibração e para validação cruzada com base nas observações dos dados espectrais para AGF.

Calibração					
	F	D	SF	Total	% correct
F	44	0	3	47	93,62
D	0	29	2	31	93,55
SF	0	2	16	18	88,89
Total	44	31	21	96	92,02
Validação					
	F	D	SF	Total	% correct
F	41	1	5	47	87,23
D	0	26	5	31	83,87
SF	1	3	14	18	77,78
Total	42	30	24	96	82,96

Na Figura 50, pode observar-se uma distinção evidente da classificação das amostras deterioradas, das semi-frescas e das frescas, nas amostras controlo pelo painel.

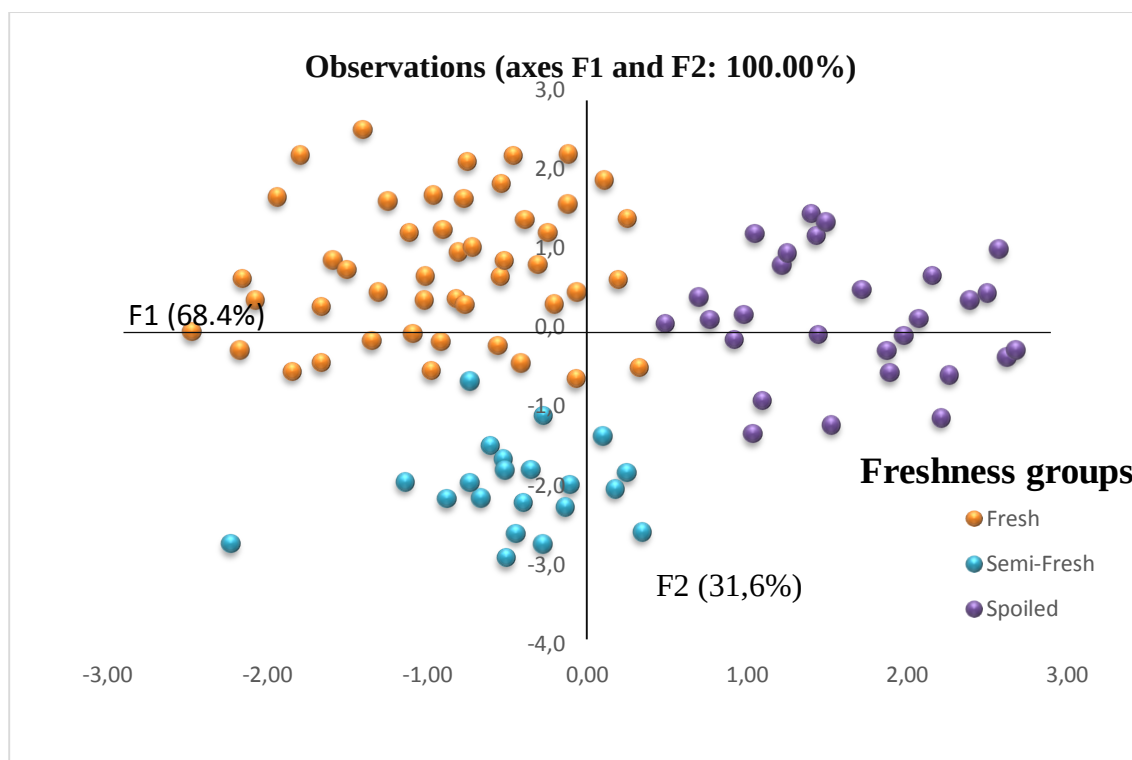


Figura 50: Gráfico das observações resultante da análise discriminante para o OE de murta em função da AGF utilizando as variáveis espectrais

A partir da Tabela 40 conclui-se que, para o conjunto de amostras de calibração, a análise discriminante permite classificar corretamente 89,79% das amostras com OE de murta quanto à sua frescura. Destes 89,79%, apenas 82,82% dos resultados foram classificados corretamente quando submetidos à validação cruzada, visto que as 39 amostras frescas de controlo foram classificadas corretamente, das 32 amostras deterioradas 25 foram classificadas corretamente e das 25 amostras semi-frescas apenas 16 foram classificadas corretamente.

Tabela 40: Matriz de confusão para o conjunto de amostras de OE de Murta de calibração e para validação cruzada com base nas observações dos dados espectrais para AGF.

Calibração					
	F	D	SF	Total	% correct
F	41	2	4	47	87,23
D	0	27	1	28	96,43
SF	0	3	18	21	85,71
Total	41	32	23	96	89,79

Validação					
	F	D	SF	Total	% correct
F	39	2	6	47	82,98
D	0	25	3	28	89,29
SF	0	5	16	21	76,19
Total	39	32	25	96	82,82

Em suma pode verificar-se que a utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) combinado com o uso de quimiometria permitiu discriminar as amostras que foram tratadas com os diferentes óleos essenciais e diferenciar o seu grau de frescura. De salientar que as amostras inoculadas com OE's de louro e de murta foram classificadas mais corretamente pelo painel que as amostras, podendo ser justificado este resultado pelo efeito benéfico dos OE's no aumento de vida útil das amostras.

2.2.11 Regressão PCR e PLS-R

As regressões multivariadas foram realizadas com a finalidade de determinar a relação entre as variáveis preditivas (X, absorvâncias) e as variáveis de estudo (Y, variáveis de resposta). Utilizou-se as mesmas regiões espectrais que foram utilizadas para PCA e LDA.

A qualidade do ajuste foi avaliada pelo erro quadrático médio de calibração (RMSEC), coeficiente de determinação múltipla ou coeficiente de regressão (R^2 , sendo R o fator de correlação) e pelo erro quadrático medio de validação cruzada (RMSECV). Os valores de RMSEC e RMSECV são dados pelas seguintes equações:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad RMSECV = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-K-1}}$$

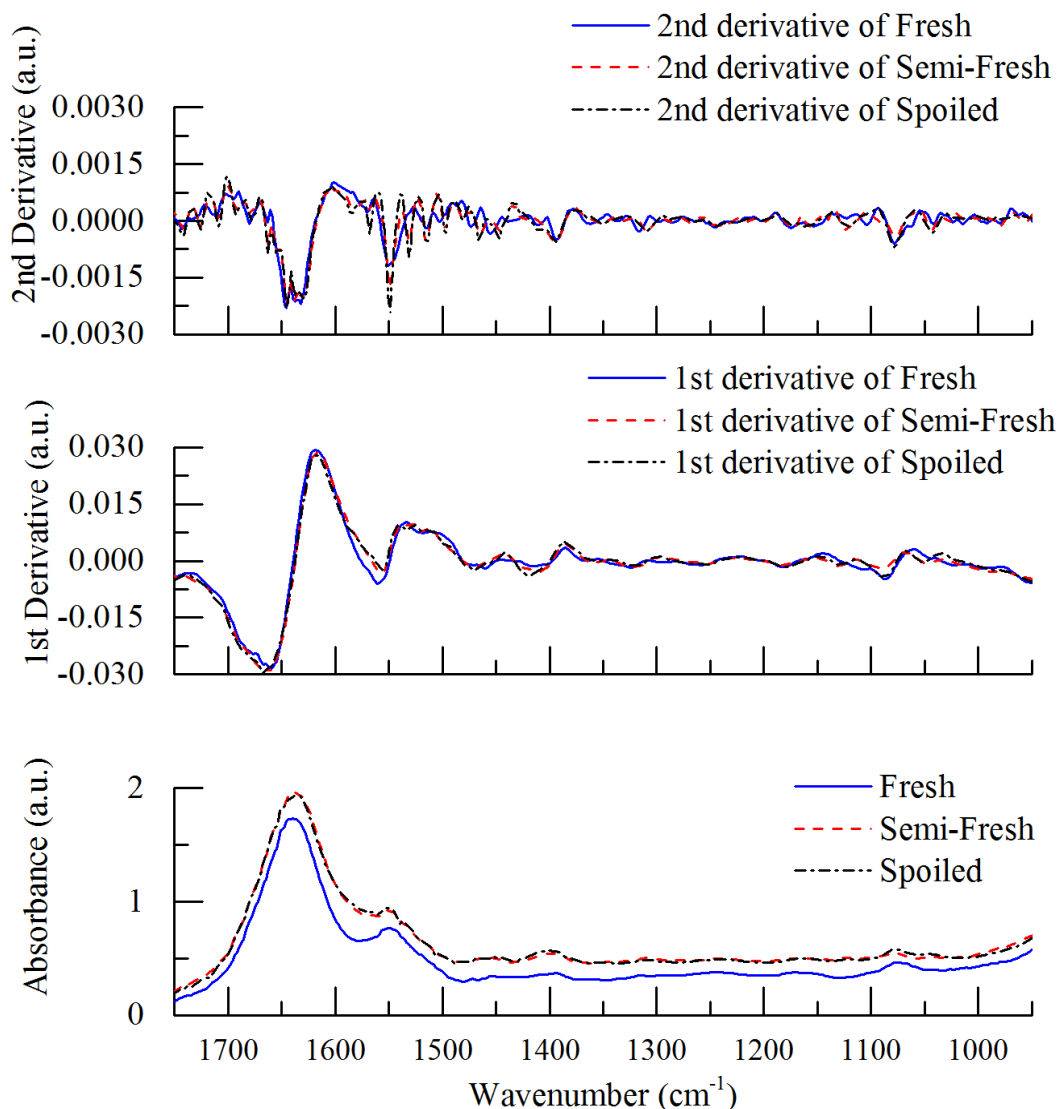
em que y_i' o valor estimado pelo modelo usando k variáveis latentes e y_i representa o valor de referência, e n representa o número de observações.

A qualidade dos modelos PLS-R foram validados segundo o método de validação cruzada *leave-one-out* (LOOCV). Neste método uma amostra é excluída de cada vez de forma aleatória. A grandeza em causa para a amostra excluída foi calculada com uma modelo construído com as restantes amostras (conjunto de treino ou de calibração). Este procedimento, foi repetido n vezes até que cada uma das amostras fosse excluída uma vez. O número ótimo de variáveis latentes do modelo PLS-R é o que minimiza o RMSECV.

A Figura 51 representa o gráfico de regressões PLS-R e PCR normal, da 1ª derivada e da 2ª derivada das amostras inoculadas com OE's de murta, uma fresca, outra semi-fresca e outra deteriorada. Usando estes três tipos de espectros contruiu-se modelos PCR e PLS-R, como se apresenta a seguir.

Pode se referir que o método de regressão PLS-R apresentou valores de erros médios quadráticos inferiores aos do método de regressão por PCR, sendo isto explicado por (Rajalahti e Kvalheim, 2011) devido a uma limitação do método PCR relacionada com o facto da variância nas variáveis X pode não estar relacionada com a variância nas variáveis Y , tendo sido verificado que a técnica PLS-R minimizar este problema.

Na maioria o modelo que apresentou o menor erro quadrático médio é baseado na técnica PLS-R com 4 variáveis latentes usando a 1ª derivada dos espectros.

Figura 51: Regressão PLS-R e PCR**-pH controlo**

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espetros de FTIR relativos à determinação da evolução do pH, é evidenciado na Figura 52 e na Tabela 41.

A tabela 41 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 41, apresenta valores de 0,67 a 0,83 log para o método de PCR e de 0,70 a 0,86 para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de pH é um modelo baseado em PLS-R, com 5 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,86 sendo esta a Figura 52 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R^2) relativo à predição é de 0,768. Como tal, com um valor de R^2 elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

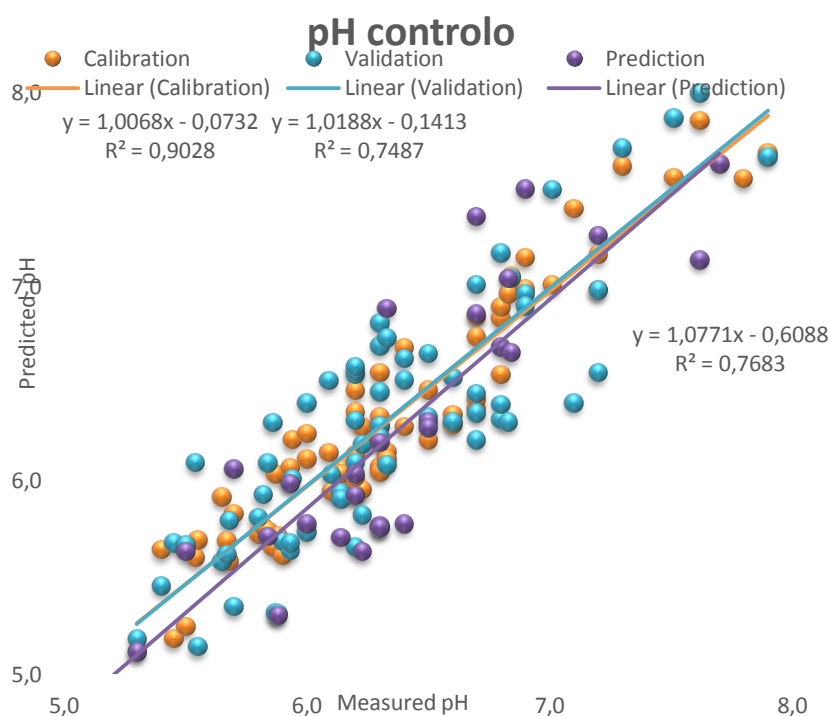


Figura 52: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para o pH das amostras Controlo

Tabela 41: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo no pH

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log cfu g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	4	Normal	y=0.97x-0.10 (ΔI;ΔS) (0.25; 0.04)	y=0.99x-0.17 (0.06; 0.17)	y=1.06x-0.64 (0.08; 0.29)	0.88	0.73	0.75
	6	1 st der	y=1.05x+0.08 (ΔI;ΔS) (0.05; 0.05)	y=1.02x+0.07 (0.06; 0.26)	y=1.08x+0.09 (0.08; 0.18)	0.90	0.87	0.83
	7	2 nd der	y=0.97x-0.19 (ΔI;ΔS) (0.05; 0.16)	y=0.86x-0.25 (0.10; 0.29)	y=0.91x+0.29 (0.11; 0.19)	0.86	0.71	0.67
PLS-R	4	Normal	y=1.00x-0.07 (ΔI;ΔS) (0.23; 0.02)	y=1.01x-0.14 (0.04; 0.15)	y=1.07x-0.61 (0.06; 0.27)	0.90	0.75	0.77
	5	1 st der	y=1.02x+0.05 (ΔI;ΔS) (0.01; 0.02)	y=1.04x+0.04 (0.03; 0.23)	y=1.10x+0.06 (0.04; 0.14)	0.91	0.88	0.86
	7	2 nd der	y=0.98x-0.16 (ΔI;ΔS) (0.03; 0.11)	y=0.89x-0.22 (0.05; 0.25)	y=0.94x+0.26 (0.07; 0.16)	0.88	0.72	0.70

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-TBARS contolo

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução do TBARS, é evidenciado na Figura 53 e na Tabela 42.

A tabela 42 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 42, apresenta valores de 0,77 mg malonaldeído/ 100g de amostra a 0,91 mg malonaldeído/ 100g de amostra para o método de PCR e de 0,80 mg malonaldeído/ 100g de amostra a 0,94 mg malonaldeído/ 100g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o teores de TBARS é um modelo baseado em PLS-R, com 4 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,95, sendo esta a Figura 53 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R^2) relativo à predição é de 0,947. Como tal, com um valor de R^2 elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

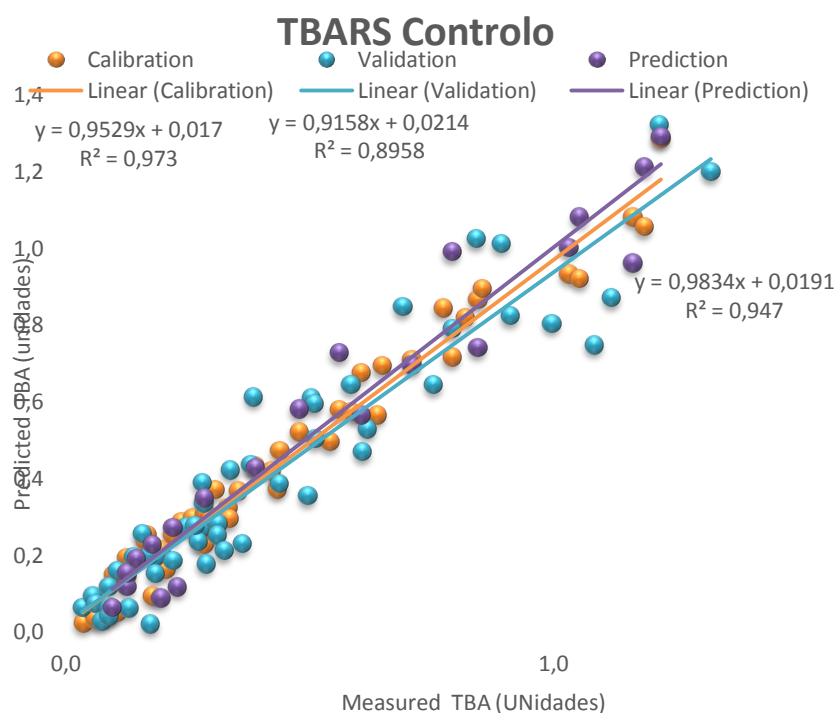


Figura 53: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para o TBARS do Controlo

Tabela 42: Calibração e Validação de PCR e PLS-R de controlo no TBARS

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log cfu g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	5	Normal	y=0.98x-0.11	y=0.95x-0.11	y=0.99+0.12	0.94	0.90	0.88
		(ΔI;ΔS)	(0.13; 0.18)	(0.18; 0.24)	(0.19; 0.25)			
	4	1 st der	y=1.12x+0.18	y=1.01x-0.15	y=1.08x-0.14	0.95	0.89	0.91
		(ΔI;ΔS)	(0.18; 0.22)	(0.19; 0.23)	(0.20; 0.25)			
	5	2 nd der	y=1.21x+0.26	y=1.25x-0.29	y=1.29x+0.16	0.88	0.83	0.77
		(ΔI;ΔS)	(0.23; 0.21)	(0.23; 0.29)	(0.25; 0.28)			
PLS-R	5	Normal	y=0.95x+0.01	y=0.92x-0.01	y=0.98x-0.02	0.97	0.90	0.94
		(ΔI;ΔS)	(0.11; 0.08)	(0.14; 0.14)	(0.16; 0.15)			
	4	1 st der	y=1.05x+0.05	y=1.01x-0.04	y=1.08x-0.06	0.98	0.91	0.95
		(ΔI;ΔS)	(0.11; 0.12)	(0.13; 0.13)	(0.14; 0.15)			
	6	2 nd der	y=0.97x+0.16	y=0.97x-0.22	y=0.95x+0.26	0.90	0.85	0.80
		(ΔI;ΔS)	(0.13; 0.11)	(0.15; 0.27)	(0.17; 0.18)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-Mesófilos contolo

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução dos Mesófilos (TVC), é evidenciado na Figura 54 e na Tabela 43.

A tabela 43 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 43, apresenta valores de 0,80 log ufc/g de amostra a 0,89 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,78 log ufc/g de amostra a 0,85 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de mesófilos é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1^a derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,85, sendo esta a Figura 54 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R²) relativo à predição é de 0,846. Como tal, com um valor de R² elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

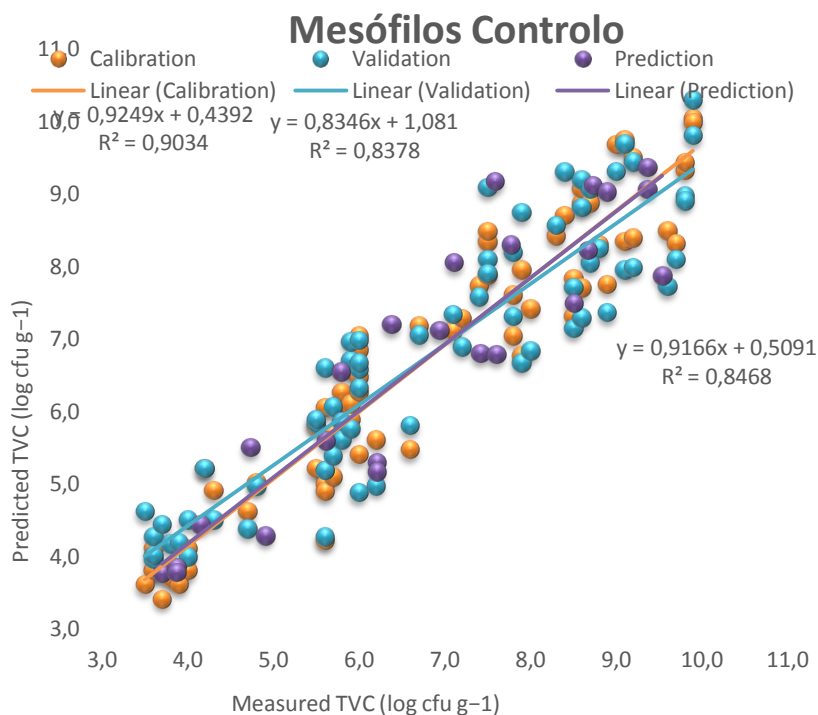


Figura 54: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os Mesófilos das amostras Controlo

Tabela 43: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo nos Mesófilos

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log cfu g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	5	Normal	y=1.10x-0.08 (ΔI;ΔS) (0.11; 0.13)	y=1.12x-0.53 (0.24; 0.25)	y=1.14x+0.09 (0.15; 0.27)	0.91	0.92	0.88
		1 st der	y=1.00x-0.21 (ΔI;ΔS) (0.13; 0.22)	y=1.01x+0.33 (0.13; 0.13)	y=1.02x+0.45 (0.14; 0.14)	0.93	0.94	0.89
	6	2 nd der	y=1.20x-0.35 (ΔI;ΔS) (0.33; 0.32)	y=1.29x-0.12 (0.45; 0.35)	y=1.27x+0.37 (0.37; 0.46)	0.84	0.82	0.80
		Normal	y=0.92x-0.44 (ΔI;ΔS) (0.20; 0.43)	y=0.83x-1.1 (0.24; 0.62)	y=0.92x+0.51 (0.15; 0.34)	0.90	0.84	0.85
	3	1 st der	y=0.99x+0.29 (ΔI;ΔS) (0.31; 0.41)	y=1.01x+0.57 (0.23; 0.22)	y=1.05x-0.28 (0.34; 0.34)	0.91	0.85	0.85
		2 nd der	y=1.3x-0.45 (ΔI;ΔS) (0.15; 0.49)	y=1.29x+0.14 (0.64; 0.75)	y=1.21x-0.36 (0.36; 0.36)	0.83	0.81	0.78

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-Psicrotróficos controlo

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução dos *Psicrotróficos* é evidenciado na Figura 55 e na Tabela 44.

A tabela 44 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 44, apresenta valores de 0,88 log ufc/g de amostra a 0,95 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,79 log ufc/g de amostra a 0,89 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de *Psicrotróficos* é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,89, sendo esta a Figura 55 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R^2) relativo à predição é de 0,885. Como tal, com um valor de R^2 elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

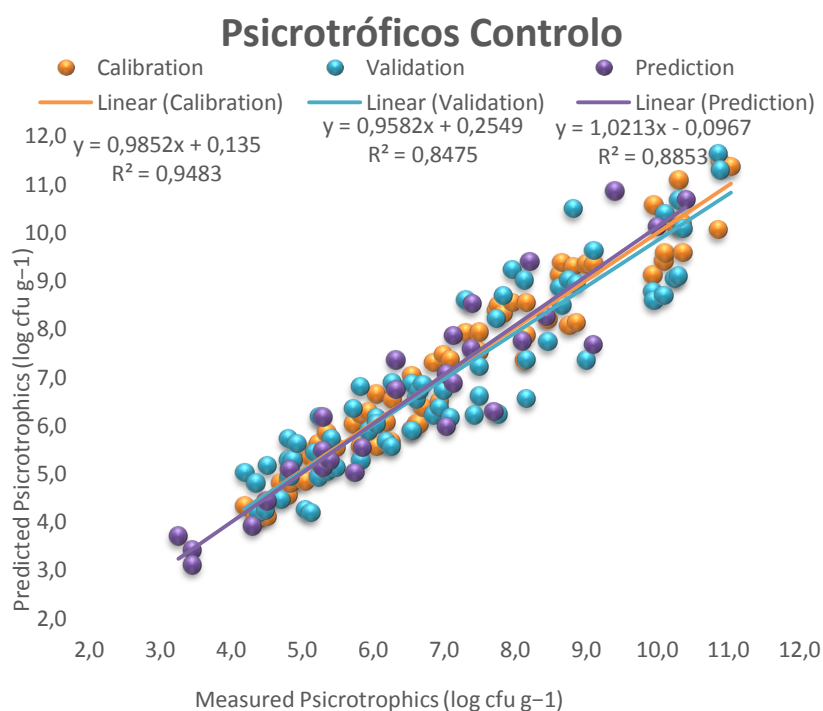


Figura 55: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os *Psicrotróficos* das amostras Controlo

Tabela 44: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo no *Psicotróficos*

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log cfu g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	5	Normal	y=1.03x+0.16	y=1.13x+0.31	y=1.13x-0.43	0.93	0.91	0.89
		(ΔI;ΔS)	(0.12; 0.03)	(0.14; 0.03)	(0.15; 0.04)			
	4	1 st der	y=0.99x-0.19	y=1.01x+0.46	y=1.07x-0.18	0.99	0.95	0.95
		(ΔI;ΔS)	(0.11; 0.02)	(0.13; 0.02)	(0.14; 0.04)			
	5	2 nd der	y=1.23x-0.44	y=1.19x-0.14	y=1.10x-0.25	0.93	0.91	0.88
		(ΔI;ΔS)	(0.13; 0.03)	(0.14; 0.05)	(0.16; 0.06)			
PLS-R	3	Normal	y=0.98x+0.14	y=0.96x-0.25	y=1.02x-0.09	0.95	0.85	0.88
		(ΔI;ΔS)	(0.11; 0.13)	(0.24; 0.25)	(0.26; 0.37)			
	3	1 st der	y=1.00x-0.25	y=1.02x+0.22	y=1.10x-0.32	0.96	0.87	0.89
		(ΔI;ΔS)	(0.09; 0.09)	(0.14; 0.19)	(0.18; 0.26)			
	5	2 nd der	y=1.19x-0.24	y=1.12x-0.42	y=1.27x+0.17	0.90	0.84	0.79
		(ΔI;ΔS)	(0.23; 0.18)	(0.25; 0.25)	(0.28; 0.36)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-BAL contolo

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução das BAL é evidenciado na Figura 56 e na Tabela 45.

A tabela 45 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 45, apresenta valores de 0,76 log ufc/g de amostra a 0,90 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,78 log ufc/g de amostra a 0,89 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de BAL é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,93, sendo esta a Figura 56 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R²) relativo à predição é de 0,893. Como tal, com um valor de R² elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

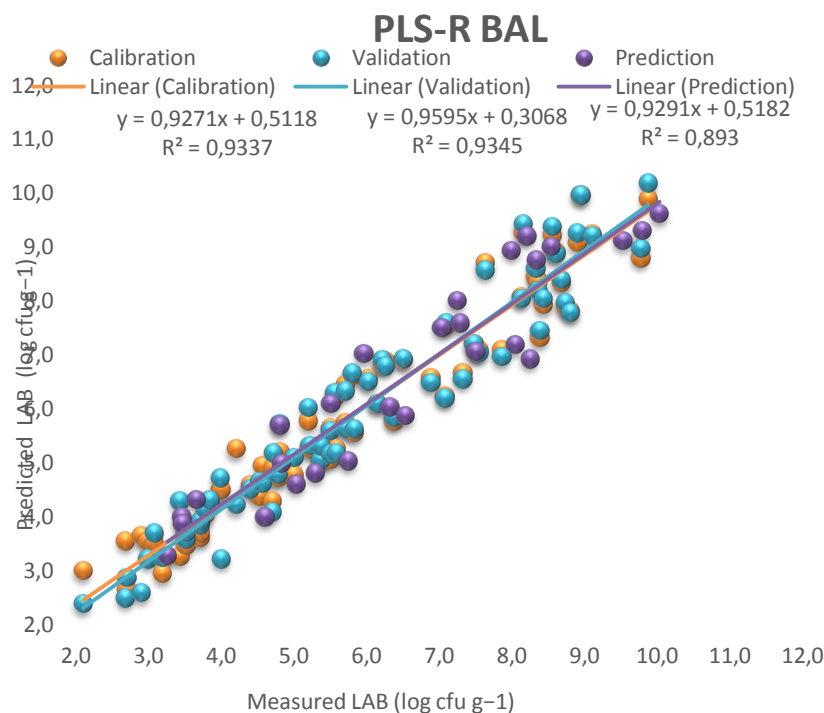


Figura 56: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para BAL das amostras Controlo

Tabela 45: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo para as BAL

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log cfu g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	4	Normal	y=0.91x+0.49 (ΔI;ΔS) (0.23; 0.07)	y=0.94x+0.32 (0.30; 0.16)	y=0.91x+0.50 (0.28; 0.19)	0.91	0.91	0.87
	4	1 st der	y=1.01x+0.02 (ΔI;ΔS) (0.13; 0.08)	y=1.05x+0.37 (0.18; 0.16)	y=1.16x+0.36 (0.21; 0.27)	0.93	0.91	0.90
	5	2 nd der	y=1.21x-0.27 (ΔI;ΔS) (0.20; 0.14)	y=1.19x-0.20 (0.17; 0.18)	y=1.27x+0.28 (0.19; 0.18)	0.88	0.86	0.76
PLS-R	3	Normal	y=0.93x+0.51 (ΔI;ΔS) (0.21; 0.05)	y=0.96x+0.31 (0.28; 0.14)	y=0.93x+0.52 (0.26; 0.17)	0.93	0.93	0.89
	3	1 st der	y=1.03x+0.04 (ΔI;ΔS) (0.10; 0.05)	y=1.07x+0.39 (0.15; 0.13)	y=1.18x+0.38 (0.18; 0.24)	0.95	0.93	0.93
	4	2 nd der	y=1.19x-0.25 (ΔI;ΔS) (0.18; 0.12)	y=1.17x-0.18 (0.15; 0.16)	y=1.25x+0.26 (0.17; 0.16)	0.90	0.88	0.78

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

- *Enterobacteriaceae* contolo

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução das *Enterobacteriaceae* é evidenciado na Figura 57 e na Tabela 46.

A tabela 46 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 46, apresenta valores de 0,82 log ufc/g de amostra a 0,90 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,85 log ufc/g de amostra a 0,93 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de *Enterobacteriaceae* é um modelo baseado em PLS-R, com 4 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,93, sendo esta a Figura 57 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R^2) relativo à predição é de 0,910. Como tal, com um valor de R^2 elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

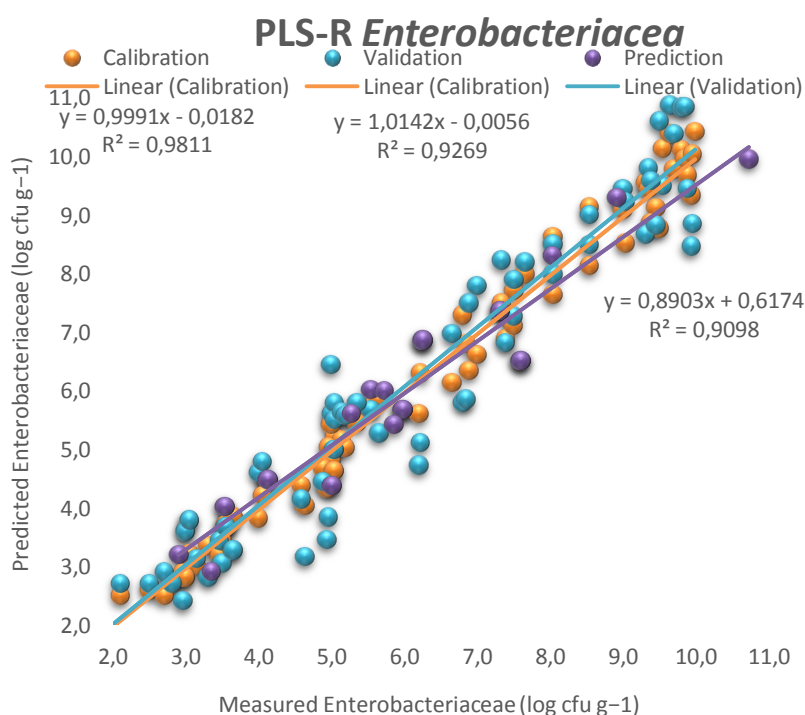


Figura 57: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para *Enterobacteriaceae* das amostras Controlo

Tabela 46: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo para as *Enterobacteriaceae*

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log cfu g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	3	Normal	y=1.03x+0.10	y=0.99x+0.02	y=0.98x+0.68	0.95	0.93	0.89
		(ΔI;ΔS)	(0.17; 0.03)	(0.15; 0.05)	(0.21; 0.11)			
	3	1 st der	y=1.0x-0.11	y=1.01x-0.18	y=1.07x+0.26	0.96	0.94	0.90
		(ΔI;ΔS)	(0.02; 0.08)	(0.21; 0.08)	(0.17; 0.02)			
	4	2 nd der	y=1.19x+0.16	y=1.06x-0.22	y=1.25x-0.20	0.93	0.94	0.82
		(ΔI;ΔS)	(0.24; 0.09)	(0.35; 0.15)	(0.37; 0.16)			
PLS-R	3	Normal	y=0.99x-0.01	y=1.01x	y=0.89x-0.62	0.98	0.93	0.91
		(ΔI;ΔS)	(0.10; 0.03)	(0.11; 0.01)	(0.16; 0.10)			
	4	1 st der	y=1.01x+0.41	y=1.03x+0.23	y=1.05x-0.32	0.97	0.96	0.93
		(ΔI;ΔS)	(0.02 0.05)	(0.23; 0.08)	(0.24; 0.02)			
	5	2 nd der	y=1.2x+0.25	y=1.19x-0.19	y=1.19x-0.26	0.94	0.89	0.85
		(ΔI;ΔS)	(0.24; 0.09)	(0.35; 0.15)	(0.37; 0.16)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-Pseudomonas spp. controlo

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução das *Pseudomonas* spp. é evidenciado na Figura 58 e na Tabela 47.

A tabela 47 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 47, apresenta valores de 0,86 log ufc/g de amostra a 0,93 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,81 log ufc/g de amostra a 0,96 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de *Pseudomonas* spp. é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1^a derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,93 log ufc/g, sendo esta a Figura 58 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R²) relativo à predição é de 0,960. Como tal, com um valor de R² elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

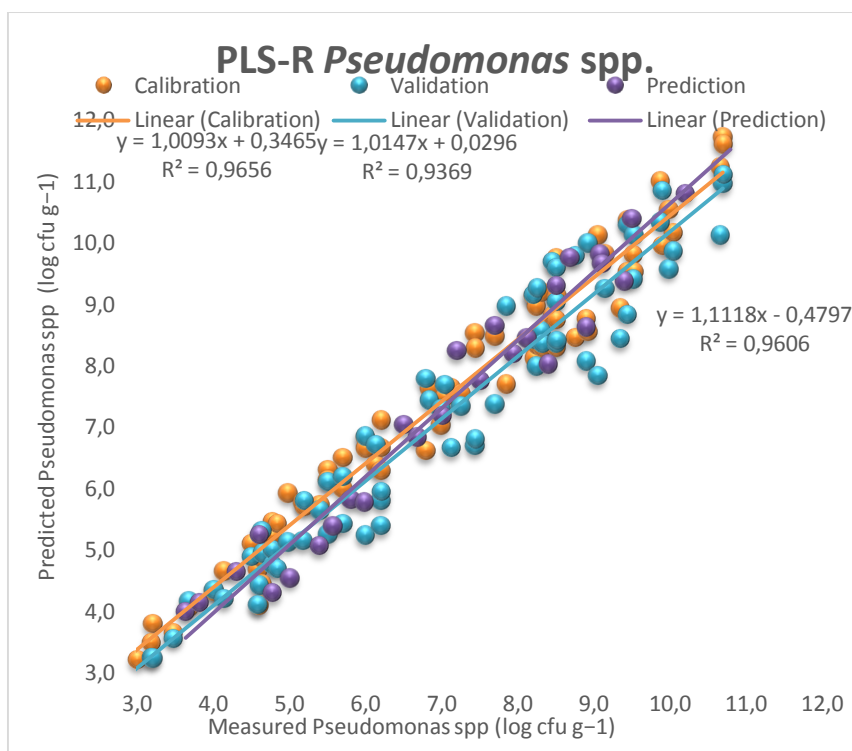


Figura 58: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para *Pseudomonas* spp. das amostras controlo

Tabela 47: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo para as *Pseudomonas* spp.

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log cfu g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	5	Normal	y=1.06x-0.19 (0.15; 0.06)	y=1.17x+0.31 (0.17; 0.06)	y=1.16x+0.47 (0.18; 0.08)	0.90	0.989	0.87
		1 st der	y=0.98x-0.21 (0.16; 0.07)	y=1.02x-0.45 (0.18; 0.07)	y=1.02x+0.15 (0.19; 0.09)	0.97	0.93	0.93
	5	2 nd der	y=1.21x-0.46 (0.18; 0.09)	y=1.21x-0.15 (0.19; 0.10)	y=1.12x+0.37 (0.21; 0.11)	0.91	0.89	0.86
		Normal	y=1.00x+0.38 (0.14; 0.05)	y=1.01x+0.03 (0.16; 0.07)	y=1.11x-0.48 (0.18; 0.09)	0.96	0.94	0.96
	3	1 st der	y=1.00x+0.04 (0.09; 0.01)	y=1.01x-0.03 (0.11; 0.01)	y=1.19x-0.46 (0.12; 0.02)	0.98	0.95	0.93
		2 nd der	y=1.22x-0.37 (0.15; 0.22)	y=1.11x-0.15 (0.15; 0.15)	y=1.19x+0.39 (0.27; 0.16)	0.90	0.88	0.81

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-Fungos controlo

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução das Fungos é evidenciado na Figura 50 e na Tabela 48.

A tabela 48 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 48, apresenta valores de 0,71 log ufc/g de amostra a 0,84 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,70 log ufc/g de amostra a 0,86 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de Fungos é um modelo baseado em PLS-R, com 4 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,86 log ufc/g , sendo esta a Figura 50 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R^2) relativo à predição é de 0,860. Como tal, com um valor de R^2 elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

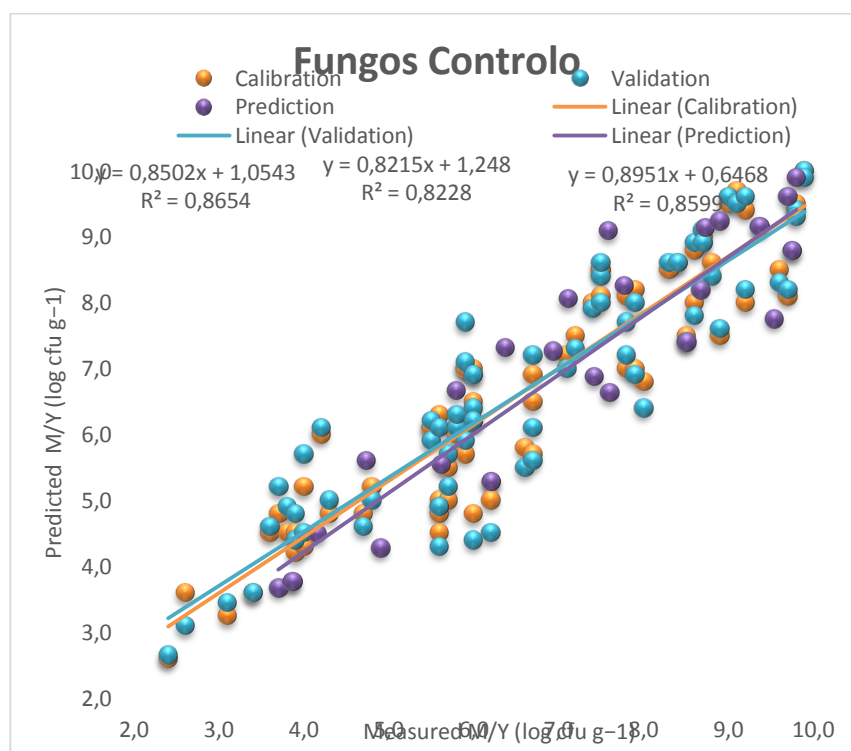


Figura 59: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os Fungos das amostras Controlo

Tabela 48: Calibração e Validação de PCR e PLS-R das amostras controlo para os Fungos

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log cfu g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	5	Normal	y=0.82x+0.99	y=0.79x+1.17	y=0.88x+0.57	0.84	0.80	0.83
		(ΔI;ΔS)	(0.37; 0.23)	(0.38; 0.29)	(0.31; 0.31)			
	5	1 st der	y=0.85x+0.28	y=0.83x+0.57	y=0.94x+0.64	0.88	0.81	0.84
		(ΔI;ΔS)	(0.34; 0.32)	(0.45; 0.23)	(0.49; 0.34)			
	6	2 nd der	y=0.87x-0.39	y=0.86x-0.45	y=0.88x+0.48	0.81	0.78	0.71
		(ΔI;ΔS)	(0.49; 0.22)	(0.51; 0.25)	(0.57; 0.41)			
PLS-R	5	Normal	y=0.84x+0.96	y=0.81x+1.14	y=0.90x+0.54	0.86	0.82	0.85
		(ΔI;ΔS)	(0.32; 0.23)	(0.34; 0.25)	(0.36; 0.27)			
	4	1 st der	y=0.86x+0.25	y=0.84x+0.54	y=0.93x+0.62	0.89	0.82	0.86
		(ΔI;ΔS)	(0.31; 0.32)	(0.43; 0.23)	(0.44; 0.34)			
	6	2 nd der	y=0.89x-0.36	y=0.88x-0.42	y=0.90x+0.46	0.84	0.81	0.70
		(ΔI;ΔS)	(0.43; 0.22)	(0.45; 0.25)	(0.47; 0.36)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-pH OE de Murta

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução do pH é evidenciado na Figura 60 e na Tabela 49.

A tabela 49 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 49, apresenta valores de 0,40 a 0,74 para o método de PCR e de 0,40 a 0,71 para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de Fungos é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1^a derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,40, sendo esta a Figura 60 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R²) relativo à predição é de 0,932. Como tal, com um valor de R² elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

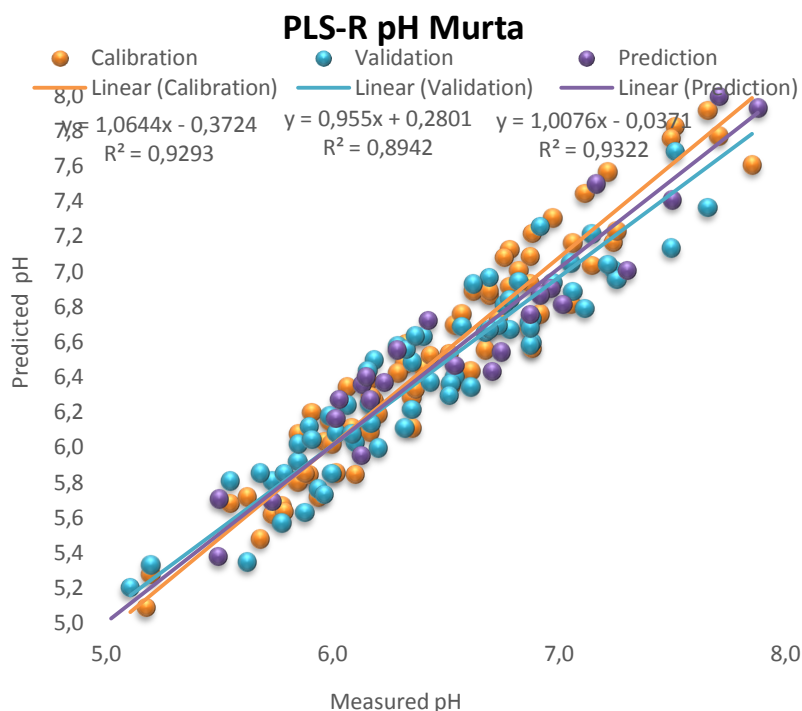


Figura 60 :Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para o pH do OE de murta

Tabela 49: Características das regressões PCR e PLS-R do pH do OE de Murta

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	4	Normal	0.91	0.90	0.88	0.37	0.42	0.50
		(ΔI;ΔS)	(0.17; 0.11)	(0.14; 0.10)	(0.17; 0.09)			
	4	1 st der	0.92	0.88	0.87	0.30	0.42	0.42
PLS-R		(ΔI;ΔS)	(0.04; 0.05)	(0.12; 0.14)	(0.14; 0.10)			
	6	2 nd der	0.85	0.73	0.76	0.25	0.51	0.74
		(ΔI;ΔS)	(0.14; 0.20)	(0.15; 0.18)	(0.16; 0.16)			
	4	Normal	0.93	0.89	0.93	0.34	0.38	0.45
		(ΔI;ΔS)	(0.07; 0.12)	(0.04; 0.15)	(0.06; 0.07)			
	3	1 st der	0.94	0.90	0.88	0.26	0.39	0.40
		(ΔI;ΔS)	(0.04; 0.05)	(0.12; 0.14)	(0.14; 0.10)			
	5	2 nd der	0.89	0.74	0.74	0.19	0.46	0.71
		(ΔI;ΔS)	(0.05; 0.22)	(0.06; 0.15)	(0.08; 0.21)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-TBARS OE de murta

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução do TBARS, é evidenciado na Figura 61 e na Tabela 50.

A tabela 50 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 50, apresenta valores de 0,17 mg malonaldeído/ 100g de amostra a 0,46 mg malonaldeído/ 100g de amostra para o método de PCR e de 0,13 mg malonaldeído/ 100g de amostra a 0,49 mg malonaldeído/ 100g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever os teores de TBARS é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,13, sendo esta a Figura 61 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R^2) relativo à predição é de 0,930. Como tal, com um valor de R^2 elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão

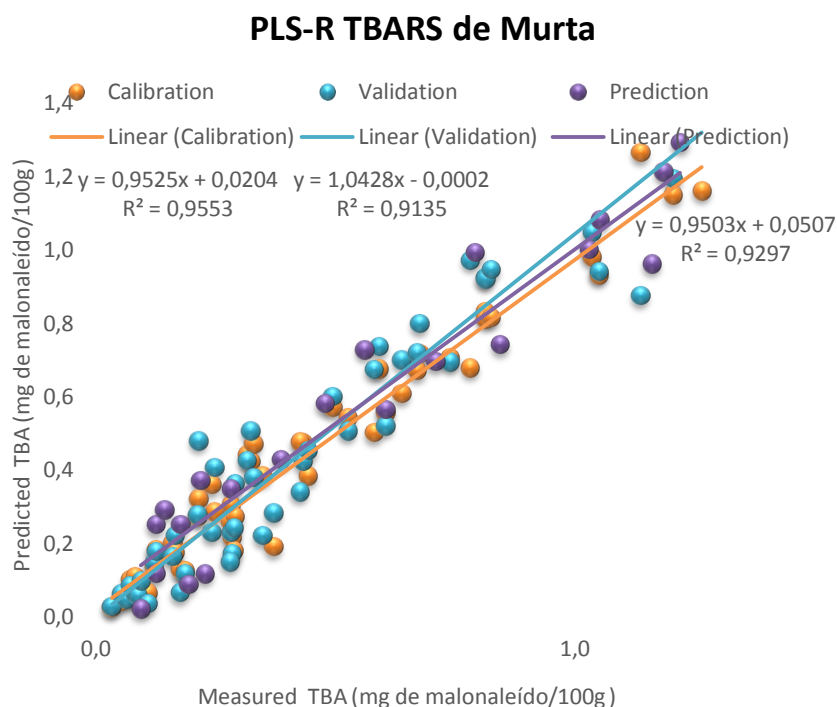


Figura 61: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para o TBARS do OE de murta

Tabela 50: Características das regressões PCR e PLS-R de TBARS do OE de Murta

Método de Regressão	Factor	Spectra	Calibração	R ²		RMSE (mg de malonaldeído/ 100g)		
				Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	4	Normal	0.93	0.88	0.89	0.13	0.15	0.19
		(ΔI;ΔS)	(0.11; 0.05)	(0.05; 0.04)	(0.05; 0.07)			
	3	1 st der	0.93	0.97	0.90	0.09	0.16	0.17
		(ΔI;ΔS)	(0.02; 0.01)	(0.02; 0.03)	(0.05; 0.04)			
	4	2 nd der	0.89	0.83	0.80	0.20	0.24	0.46
		(ΔI;ΔS)	(0.13; 0.11)	(0.06; 0.10)	(0.07; 0.17)			
PLS-R	3	Normal	0.95	0.91	0.93	0.07	0.10	0.15
		(ΔI;ΔS)	(0.07; 0.07)	(0.08; 0.03)	(0.10; 0.08)			
	3	1 st der	0.96	0.91	0.94	0.05	0.11	0.13
		(ΔI;ΔS)	(0.01; 0.02)	(0.03; 0.03)	(0.09; 0.06)			
	4	2 nd der	0.91	0.86	0.82	0.14	0.19	0.41
		(ΔI;ΔS)	(0.11; 0.10)	(0.05; 0.17)	(0.10; 0.20)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-Mesófilos OE de murta

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução de Mesófilos é evidenciado na Figura 62 e na Tabela 51.

A tabela 51 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 51, apresenta valores de 0,79 log ufc/g de amostra a 0,91 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,75 log ufc/g de amostra a 0,92 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de Mesófilos é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,76, sendo esta a Figura 62 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R²) relativo à predição é de 0,799. Como tal, com um valor de R² elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

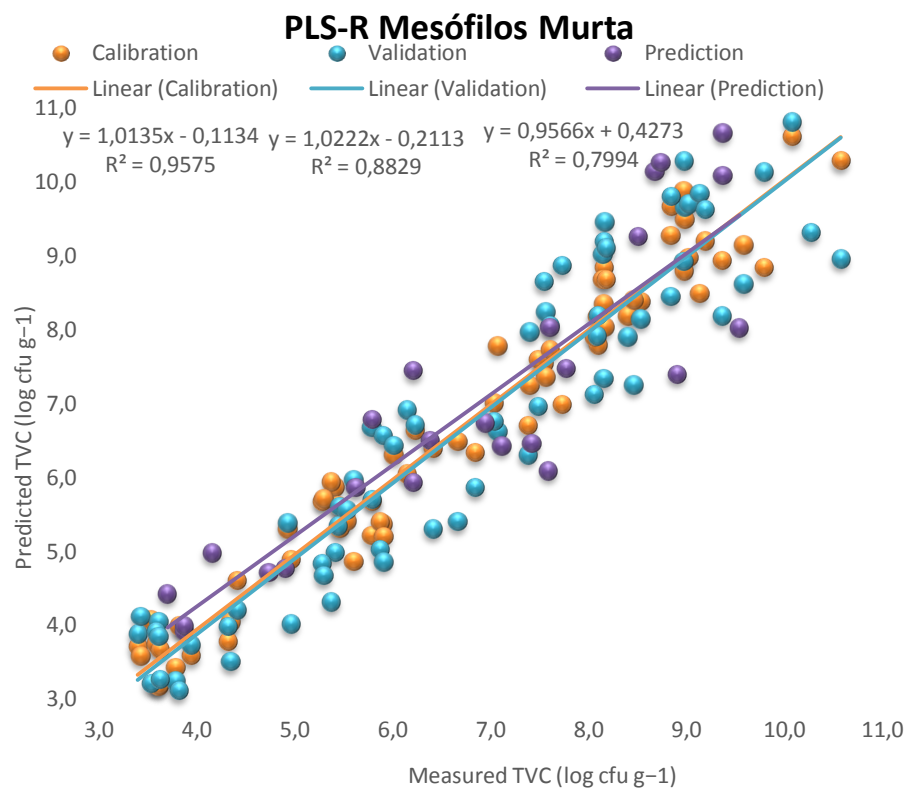


Figura 62: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os mesófilos do OE de murta

Tabela 51: Características das regressões PCR e PLS-R dos Mesófilos do OE de Murta

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log ufc g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	4	Normal	0.92 (ΔI;ΔS) (0.12; 0.35)	0.85 (0.17; 0.45)	0.75 (0.18; 0.34)	0.64	0.89	0.91
	4	1 st der	0.96 (ΔI;ΔS) (0.11; 0.31)	0.89 (0.03; 0.12)	0.88 (0.04; 0.15)	0.71	0.74	0.79
	5	2 nd der	0.89 (ΔI;ΔS) (0.35; 0.37)	0.82 (0.44; 0.35)	0.75 (0.41; 0.26)	0.75	0.86	0.90
PLS-R	3	Normal	0.96 (ΔI;ΔS) (0.35; 0.37)	0.88 (0.44; 0.35)	0.80 (0.41; 0.26)	0.63	0.88	0.92
	3	1 st der	0.98 (ΔI;ΔS) (0.21; 0.41)	0.91 (0.13; 0.22)	0.84 (0.24; 0.34)	0.70	0.73	0.75
	4	2 nd der	0.91 (ΔI;ΔS) (0.25; 0.39)	0.84 (0.54; 0.45)	0.77 (0.45; 0.47)	0.73	0.83	0.86

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-Psicrotróficos OE de murta

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução de *Psicrotróficos* é evidenciado na Figura 63 e na Tabela 52.

A tabela 52 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 52, apresenta valores de 0,79 log ufc/g de amostra a 0,91 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,76 log ufc/g de amostra a 0,86 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de *Psicrotróficos* é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,76, sendo esta a Figura 63 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R^2) relativo à predição é de 0,883. Como tal, com um valor de R^2 elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

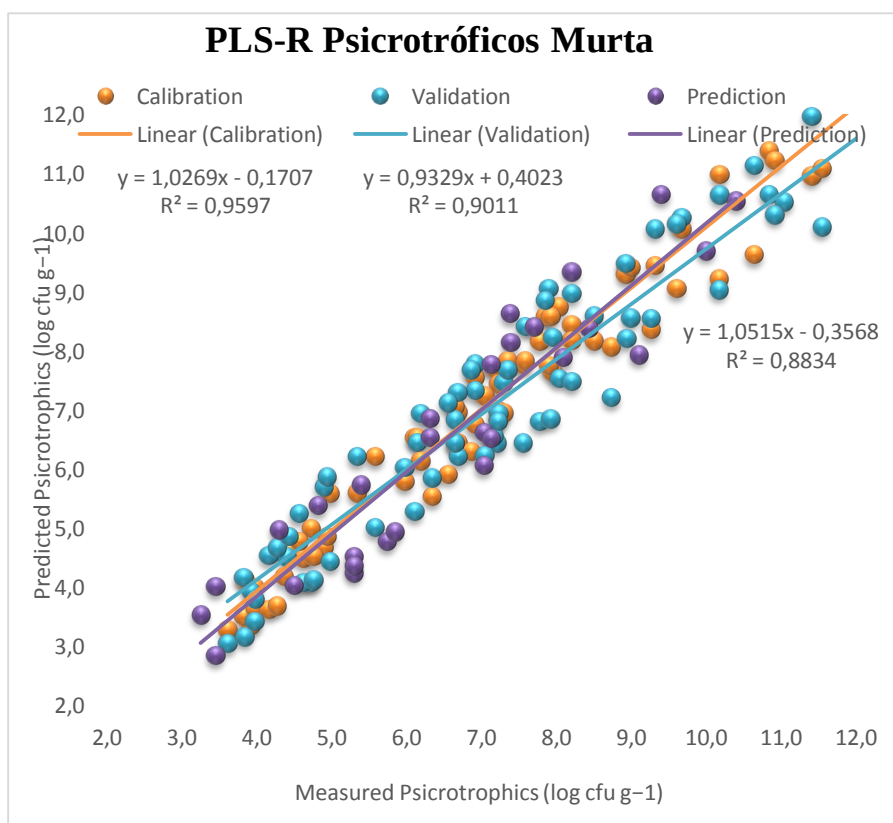


Figura 63: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para os psicrotróficos do OE de murta

Tabela 52: Calibração e Validação de PCR e PLS-R dos Psicotróficos do OE de Murta

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE (log cfu g ⁻¹)		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	5	Normal	0.94	0.77	0.84	0.71	0.73	0.84
		(ΔI ; ΔS)	(0.14; 0.05)	(0.16; 0.06)	(0.15; 0.06)			
	3	1 st der	0.98	0.93	0.94	0.64	0.72	0.79
		(ΔI ; ΔS)	(0.11; 0.12)	(0.13; 0.12)	(0.14; 0.14)			
	5	2 nd der	0.86	0.82	0.74	0.74	0.79	0.91
		(ΔI ; ΔS)	(0.11; 0.13)	(0.18; 0.15)	(0.18; 0.26)			
PLS-R	4	Normal	0.96	0.80	0.88	0.69	0.74	0.80
		(ΔI ; ΔS)	(0.21; 0.03)	(0.14; 0.15)	(0.16; 0.27)			
	3	1 st der	0.97	0.91	0.90	0.63	0.70	0.76
		(ΔI ; ΔS)	(0.08; 0.07)	(0.04; 0.09)	(0.08; 0.16)			
	5	2 nd der	0.88	0.85	0.78	0.71	0.75	0.86
		(ΔI ; ΔS)	(0.13; 0.11)	(0.20; 0.21)	(0.23; 0.34)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-BAL OE de murta

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução de BAL é evidenciado na Figura 64 e na Tabela 53.

A tabela 53 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 53, apresenta valores de 0,77 log ufc/g de amostra a 0,99 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,81 log ufc/g de amostra a 0,95 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de BAL é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1^a derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,95, sendo esta a Figura 64 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R²) relativo à predição é de 0,892. Como tal, com um valor de R² elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

PLS-R Contagens de BAL de Murta

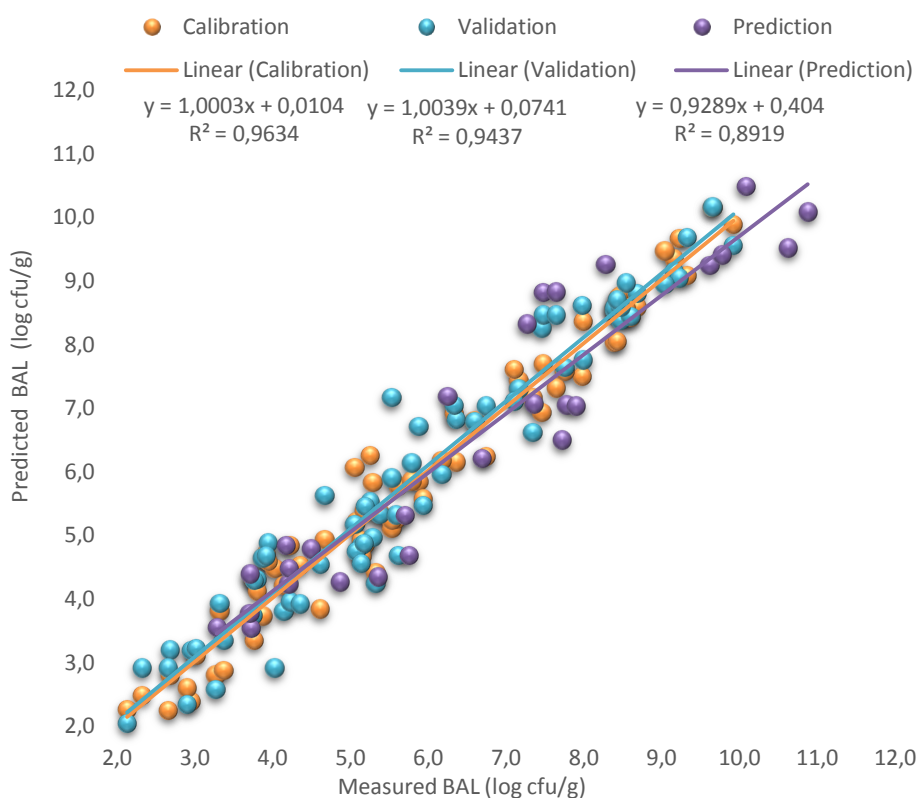


Figura 64: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para BAL de murta

Tabela 53: Calibração e Validação de PCR e PLS-R do valor de contagens de BAL do OE de Murta

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	4	Normal	y=0.98x+0.11	y=0.097x+0.17	y=0.95x+0.45	0.93	0.90	0.84
		(ΔI;ΔS)	(0.18; 0.12)	(0.23; 0.14)	(0.21; 0.16)			
	3	1 st der	y=1.04x-0.05	y=1.04x+0.35	y=1.14x-0.18	0.93	0.91	0.90
		(ΔI;ΔS)	(0.11; 0.10)	(0.15; 0.11)	(0.18; 0.10)			
	4	2 nd der	y=1.18x-0.14	y=1.19x+0.12	y=1.18x+0.46	0.87	0.86	0.77
		(ΔI;ΔS)	(0.22; 0.18)	(0.15; 0.15)	(0.25; 0.21)			
PLS-R	3	Normal	y=1.00x+0.01	y=1.00x+0.07	y=0.93x+0.40	0.96	0.94	0.89
		(ΔI;ΔS)	(0.11; 0.05)	(0.18; 0.04)	(0.16; 0.07)			
	3	1 st der	y=1.03x	y=1.07x+0.42	y=1.16x+0.28	0.98	0.96	0.95
		(ΔI;ΔS)	(0.01; 0.07)	(0.05; 0.13)	(0.08; 0.14)			
	3	2 nd der	y=1.11x-0.14	y=1.13x-0.12	y=1.18x+0.16	0.92	0.90	0.81
		(ΔI;ΔS)	(0.21; 0.10)	(0.13; 0.12)	(0.21; 0.18)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-Enterobacteriaceae OE de murta

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução de *Enterobacteriaceae* é evidenciado na Figura 65 e na Tabela 54.

A tabela 54 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 54, apresenta valores de 0,80 log ufc/g de amostra a 0,88 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,84 log ufc/g de amostra a 0,92 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de *Enterobacteriaceae* é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,91, sendo esta a Figura 65 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R^2) relativo à predição é de 0,917. Como tal, com um valor de R^2 elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

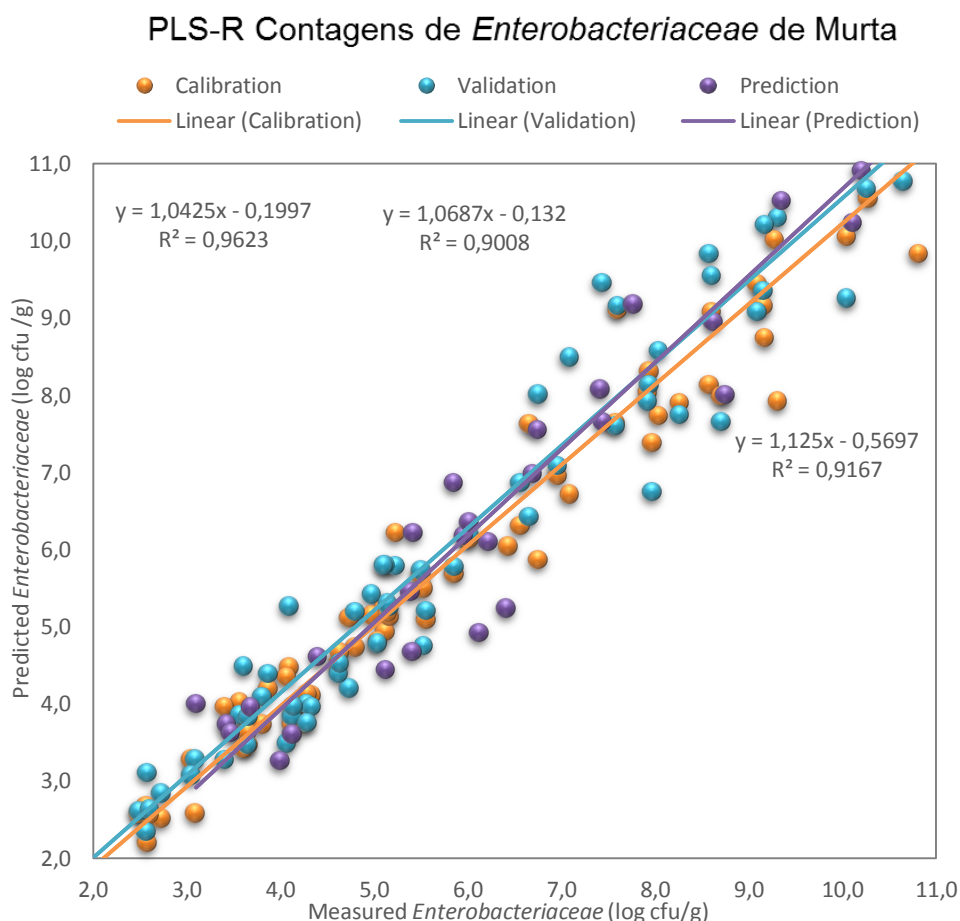


Figura 65: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para *Enterobacteriaceae* de murta

Tabela 54: Calibração e Validação de PCR e PLS-R do valor de contagens de *Enterobacteriaceae* do OE de Murta

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	4	Normal	y=1.07x-0.23	y=1.10x-.17	y=1.17x-0.45	0.93	0.91	0.87
		(ΔI;ΔS)	(0.15; 0.12)	(0.18; 0.14)	(0.20; 0.22)			
	3	1 st der	y=1.01x-0.11	y=1.01x-0.2	y=1.07x-0.07	0.94	0.92	0.88
		(ΔI;ΔS)	(0.06 0.05)	(0.04; 0.11)	(0.05; 0.03)			
	4	2 nd der	y=1.26x+0.24	y=1.19x-.21	y=1.21x+0.27	0.91	0.92	0.80
(ΔI;ΔS)	(0.32; 0.21)	(0.32; 0.15)	(0.24; 0.22)					
PLS-R	3	Normal	y=1.04x-0.20	y=1.07x-.13	y=1.13x-0.57	0.96	0.90	0.92
		(ΔI;ΔS)	(0.13; 0.10)	(0.15; 0.11)	(0.26; 0.18)			
	3	1 st der	y=1.00x-0.41	y=1.03x	y=1.03x-0.02	0.97	0.95	0.91
		(ΔI;ΔS)	(0.04 0.08)	(0.13; 0.18)	(0.14; 0.12)			
	4	2 nd der	y=1.24x+0.25	y=1.21x-.19	y=1.17x-0.26	0.92	0.88	0.84
(ΔI;ΔS)	(0.42; 0.19)	(0.27; 0.14)	(0.42; 0.25)					

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-Pseudomonas OE de murta

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução de *Pseudomonas* spp. é evidenciado na Figura 66 e na Tabela 55.

A tabela 55 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 55, apresenta valores de 0,77 log ufc/g de amostra a 0,91 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,79 log ufc/g de amostra a 0,93 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de *Pseudomonas* spp. é um modelo baseado em PLS-R, com 3 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,91, sendo esta a Figura 66 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R²) relativo à predição é de 0,935. Como tal, com um valor de R² elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

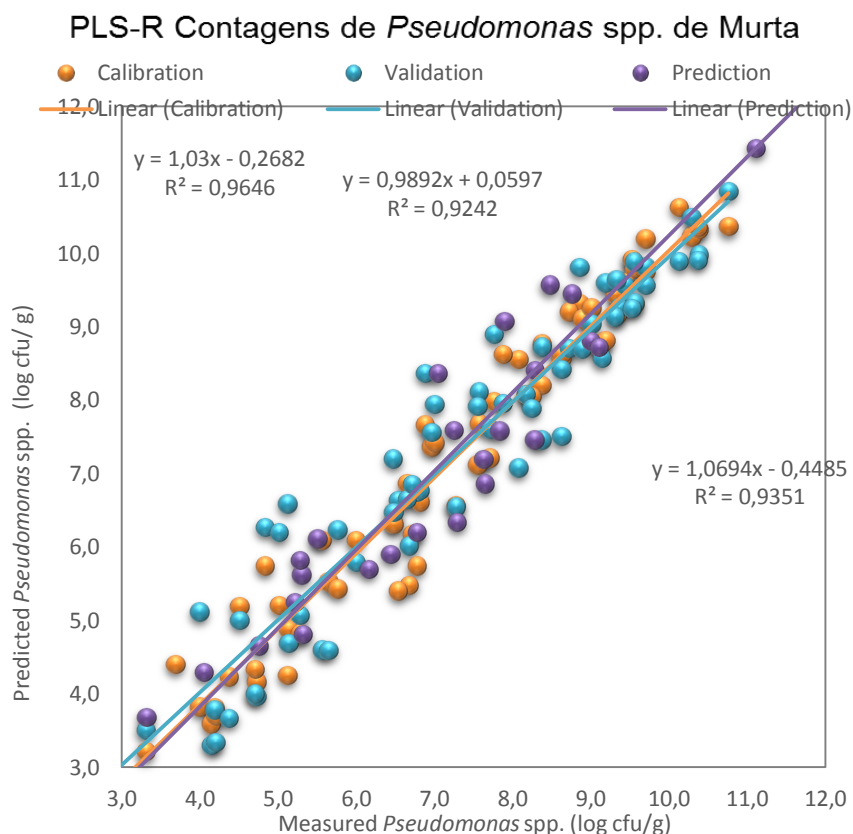


Figura 66: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para *Enterobacteriaceae* de murta

Tabela 55: Calibração e Validação de PCR e PLS-R do valor de contagens de *Enterobacteriaceae* do OE de Murta

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	5	Normal	$y=1.07x-0.23$	$y=1.06x+0.03$	$y=1.13x-0.42$	0.92	0.91	0.91
		(ΔI;ΔS)	(0.15; 0.15)	(0.17; 0.05)	(0.13; 0.20)			
	3	1 st der	$y=1.02x-0.09$	$y=1.06x+0.07$	$y=1.13x-0.18$	0.93	0.90	0.90
		(ΔI;ΔS)	(0.12; 0.07)	(0.13; 0.09)	(0.15; 0.15)			
	5	2 nd der	$y=1.10x-0.17$	$y=1.11x-0.25$	$y=1.21x-0.31$	0.85	0.84	0.77
		(ΔI;ΔS)	(0.27; 0.14)	(0.28; 0.21)	(0.30; 0.17)			
PLS-R	3	Normal	$y=1.03x-0.27$	$y=0.99x+0.06$	$y=1.07x-0.44$	0.96	0.94	0.93
		(ΔI;ΔS)	(0.05; 0.6)	(0.07; 0.08)	(0.09; 0.10)			
	3	1 st der	$y=1.00x$	$y=1.01x-0.03$	$y=1.09x-0.16$	0.97	0.93	0.91
		(ΔI;ΔS)	(0.02; 0.02)	(0.03; 0.06)	(0.04; 0.05)			
	5	2 nd der	$y=1.14x-0.17$	$y=1.16x-0.25$	$y=1.18x+0.26$	0.89	0.87	0.79
		(ΔI;ΔS)	(0.15; 0.12)	(0.16; 0.19)	(0.18; 0.15)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

-Fungos OE de murta

A precisão e o desempenho dos modelos que correlacionam os valores atuais e estimados obtidos a partir dos espectros de FTIR relativos à determinação da evolução de Fungos é evidenciado na Figura 67 e na Tabela 56.

A tabela 56 refere-nos o número de fatores necessários para construir a regressão, para os modelos de PCR e PLS-R, como tal, o valor do erro medio quadrático evidenciado na Tabela 56, apresenta valores de 0,76 log ufc/g de amostra a 0,88 log ufc/g de amostra para o método de PCR e de 0,75 log ufc/g de amostra a 0,89 log ufc/g de amostra para o método de PLS-R. Refere-nos ainda, que o melhor modelo para prever o valor de Fungos é um modelo baseado em PLS-R, com 4 fatores, baseado na 1ª derivada, que apresenta um RMSE de predição de 0,89, sendo esta a Figura 64 ilustrada, que apresenta um valor de coeficiente múltiplo de determinação (R^2) relativo à predição é de 0,875. Como tal, com um valor de R^2 elevado e um erro medio quadrático baixo para ambos os métodos, podemos afirmar que houve um bom desempenho preditivo e uma boa precisão.

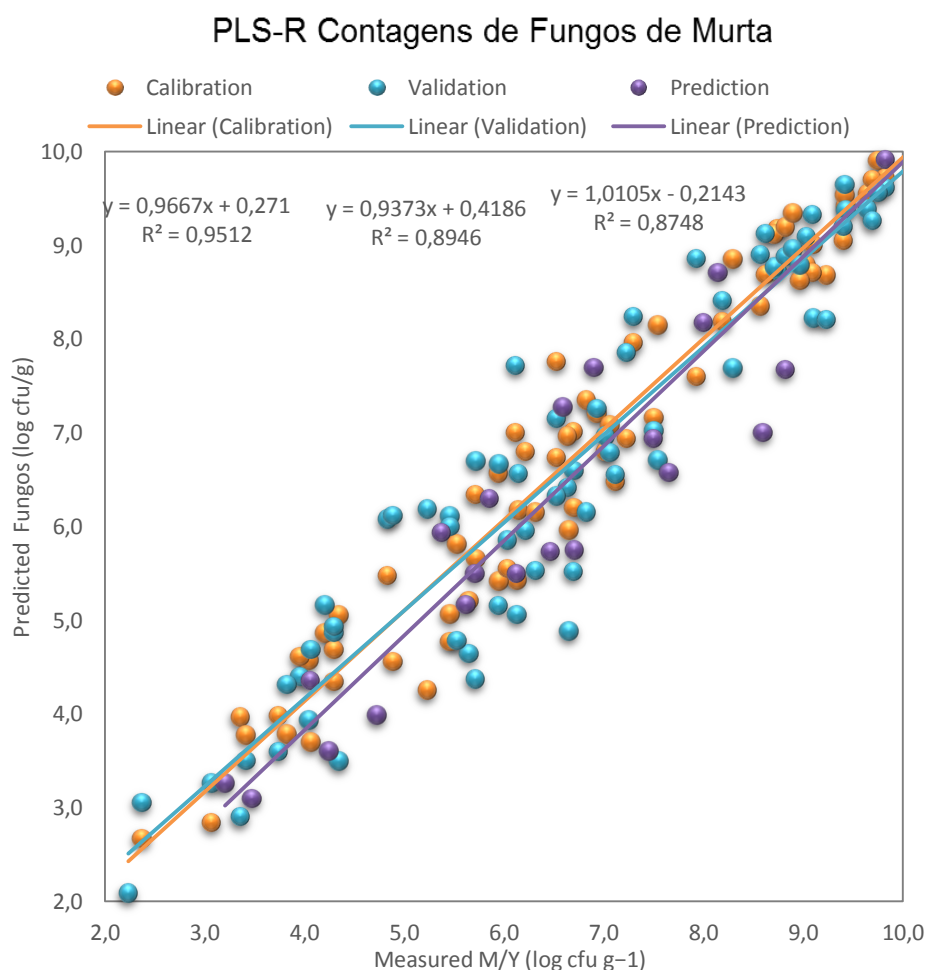


Figura 67: Qualidade do modelo obtido por PLS-R e relação entre os valores medidos e previstos para Fungos de murta

Tabela 56: Calibração e Validação de PCR e PLS-R do valor de contagens de Fungos do OE de Murta

Método de Regressão	Factor	Spectra	R ²			RMSE		
			Calibração	Validação	Predição	Calibração	Validação	Predição
PCR	5	Normal	y=0.98x+0.16	y=0.96x+0.31	y=0.99x-0.18	0.92	0.87	0.84
		(ΔI;ΔS)	(0.32; 0.2)	(0.27; 0.34)	(0.13; 0.29)			
	4	1 st der	y=0.97x+0.16	y=0.95x+0.25	y=0.93x+0.33	0.96	0.93	0.88
		(ΔI;ΔS)	(0.25; 0.37)	(0.27; 0.31)	(0.28; 0.31)			
	5	2 nd der	y=0.95x+0.15	y=0.95x-0.42	y=0.97x-0.48	0.88	0.86	0.76
		(ΔI;ΔS)	(0.23; 0.21)	(0.36; 0.27)	(0.41; 0.36)			
PLS-R	4	Normal	y=0.97x+0.27	y=0.94x+0.42	y=1.01x-0.21	0.95	0.89	0.87
		(ΔI;ΔS)	(0.22; 0.23)	(0.24; 0.35)	(0.16; 0.27)			
	4	1 st der	y=0.99x+0.15	y=0.94x+0.24	y=0.92x+0.31	0.97	0.94	0.89
		(ΔI;ΔS)	(0.21; 0.32)	(0.23; 0.23)	(0.24; 0.34)			
	5	2 nd der	y=0.97x+0.25	y=0.94x-0.31	y=0.91x-0.56	0.87	0.85	0.75
		(ΔI;ΔS)	(0.33; 0.22)	(0.35; 0.25)	(0.37; 0.36)			

(ΔI – error on the intercept; ΔS – error on the slope)

A utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) combinado com o uso de quimiometria permitiu predizer de modo quantitativo o valor de pH, TBARs e as contagens de microorganismos, podendo assim contribuir para o estabelecimento da vida útil de produtos alimentares, neste caso particular, das carnes frescas.

CAPÍTULO IV-

Conclusão

A utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) combinado com o uso de quimiometria permitiu prever de modo quantitativo o valor de pH, TBARs e as contagens de microorganismos, bem como discriminar as amostras que foram tratadas com os diferentes óleos essenciais e diferenciar o seu grau de frescura.

Tendo em consideração que as amostras foram submetidas a diversas condições, como adição de OE's de laranja, louro e murta, a embalagem de aerobiose e de vácuo, bem como a temperatura de 2°C e de 8°C de armazenamento, pretendeu-se com este trabalho verificar se essas diferenças apresentam efeito benéfico para o aumento do tempo de vida útil da carne picada (hambúrguer).

Os estudos *in vitro*, de atividade antimicrobiana e antioxidantes, não reportam a realidade quando colocados os OE's na carne, devido à interação dos OE's com as propriedades da carne. Como tal, o OE de louro foi o que apresentou um efeito mais benéfico no estudo *in vitro*, mas foi o OE de murta quando inoculado na carne que obteve melhores resultados a nível de parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais. As amostras com OE's apresentavam características de qualidade superiores em relação às amostras controlo em todas as condições.

O tempo de vida útil das amostras quando embaladas em aerobiose, método clássico, foi superior na temperatura de 2°C (temperatura estabelecida por lei), sendo superior na amostra com OE de murta durante aproximadamente 200h de armazenamento, enquanto a amostra sem OE é de 80h. Quando embaladas a vácuo, a temperatura de 2°C é essencial para manter as características de qualidade e segurança das amostras, apresentando cerca de 720h de tempo de vida útil e as amostras mantidas a 8°C 168 h.

A adição de OE's na carne picada é benéfica, porque aumenta o tempo de vida útil, ou seja, diminui a deterioração da carne, bem como a embalagem de vácuo é mais benéfica e o armazenamento a 2°C.

CAPITULO V-

Referências Bibliográficas

- Ademosun, A. O., Oboh, G., Olupona, A. J., Oyeleye, S. I., Adewuni, T. M., & Nwanna, E. E. (2015). Comparative Study of Chemical Composition, In Vitro Inhibition of Cholinergic and Monoaminergic Enzymes, and Antioxidant Potentials of Essential Oil from Peels and Seeds of Sweet Orange (*Citrus Sinensis*[L.] Osbeck) Fruits. *Journal of Food Biochemistry*, n/a-n/a.
- Aït-Kaddour, A., Boubellouta, T., & Chevallier, I. (2011). Development of a portable spectrofluorimeter for measuring the microbial spoilage of minced beef. *Meat Sci*, 88(4), 675-681.
- Aleksic, V., & Knezevic, P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 169(4), 240-254.
- Ammor, M. S., Argyri, A., & Nychas, G.-J. E. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Sci*, 81(3), 507-514.
- Antoniewski, M. N., & Barringer, S. A. (2010). Meat shelf-life and extension using collagen/gelatin coatings: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 50(7), 644-653.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126.
- Argyri, A. A., Doulgeraki, A. I., Blana, V. A., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2011). Potential of a simple HPLC-based approach for the identification of the spoilage status of minced beef stored at various temperatures and packaging systems. *Int J Food Microbiol*, 150(1), 25-33.
- Argyri, A. A., Jarvis, R. M., Wedge, D., Xu, Y., Panagou, E. Z., Goodacre, R., & Nychas, G.-J. E. (2013). A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage. *Food Control*, 29(2), 461-470.
- Badawy, M. E. I., & Abdelgaleil, S. A. M. (2014). Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*, 52, 776-782.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Basak, S. S., & Candan, F. (2013). Effect of *Laurus nobilis* L. Essential Oil and its Main Components on α -glucosidase and Reactive Oxygen Species Scavenging Activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 367-379.
- Bingol, E. B., & Ergun, O. (2011). Effects of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat. *Meat Sci*, 88(4), 774-785.
- Borch, E., Kant-Muermans, M.-L., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol*, 33(1), 103-120.
- Brada, M., Tabti, N., Boutoumi, H., Wathélet, J. P., & Lognay, G. (2012). Composition of the essential oil of leaves and berries of Algerian myrtle (*Myrtus communis*L.). *Journal of Essential Oil Research*, 24(1), 1-3.
- Calkins, C. R., & Hodgen, J. M. (2007). A fresh look at meat flavor. *Meat Sci*, 77(1), 63-80.
- Casaburi, A., De Filippis, F., Villani, F., & Ercolini, D. (2014). Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat. *Food Research International*, 62(0), 366-374.

- Chen, H., Xie, C., Wang, H., Jin, D. Q., Li, S., Wang, M., Ren, Q., Xu, J., Ohizumi, Y., & Guo, Y. (2014). Sesquiterpenes inhibiting the microglial activation from *Laurus nobilis*. *J Agric Food Chem*, 62(20), 4784-4788.
- Chen, Y., Wu, J., Xu, Y., Fu, M., & Xiao, G. (2014). Effect of second cooling on the chemical components of essential oils from orange peel (*Citrus sinensis*). *J Agric Food Chem*, 62(35), 8786-8790.
- Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Garcia-Gonzalo, D., Pagan, R., & Laglaoui, A. (2014). Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *J Sci Food Agric*, 94(6), 1197-1204.
- Dairi, S., Madani, K., Aoun, M., Him, J. L., Bron, P., Lauret, C., Cristol, J. P., & Carbonneau, M. A. (2014). Antioxidative properties and ability of phenolic compounds of *Myrtus communis* leaves to counteract in vitro LDL and phospholipid aqueous dispersion oxidation. *J Food Sci*, 79(7), C1260-1270.
- De Corato, U., Maccioni, O., Trupo, M., & Di Sanzo, G. (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. *Crop Protection*, 29(2), 142-147.
- Debbarma, J., Kishore, P., Nayak, B. B., Kannuchamy, N., & Gudipati, V. (2012). Antibacterial Activity of Ginger, Eucalyptus and Sweet Orange Peel Essential Oils on Fish-Borne Bacteria. *Journal of Food Processing and Preservation*, no-no.
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G.-J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int J Food Microbiol*, 157(2), 130-141.
- Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., & Nychas, G.-J. E. (2011). Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Int J Food Microbiol*, 145(1), 77-83.
- Dunne, P. G., Monahan, F. J., O'Mara, F. P., & Moloney, A. P. (2009). Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *Meat Sci*, 81(1), 28-45.
- Esmer, O. K., Irkin, R., Degirmencioglu, N., & Degirmencioglu, A. (2011). The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat Sci*, 88(2), 221-226.
- Fasseas, M. K., Mountzouris, K. C., Tarantilis, P. A., Polissiou, M., & Zervas, G. (2008). Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry*, 106(3), 1188-1194.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Sci*, 86(1), 86-94.
- FDA. (2015). Code of Federal Regulations Food and Drugs. In, vol. 2015).
- Filgueras, R. S., Gatellier, P., Aubry, L., Thomas, A., Bauchart, D., Durand, D., Zambiazzi, R. C., & Santé-Lhoutellier, V. (2010). Colour, lipid and protein stability of *Rhea americana* meat during air- and vacuum-packaged storage: Influence of muscle on oxidative processes. *Meat Sci*, 86(3), 665-673.
- Galvão, J. G., Silva, V. F., Ferreira, S. G., França, F. R. M., Santos, D. A., Freitas, L. S., Alves, P. B., Araújo, A. A. S., Cavalcanti, S. C. H., & Nunes, R. S. (2015). β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential

- oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. *Thermochimica Acta*, 608, 14-19.
- Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107(3), 1120-1130.
- Ghasemi, E., Raofie, F., & Najafi, N. M. (2011). Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 126(3), 1449-1453.
- Gómez-De-Anda, F., Dorantes-Álvarez, L., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Calderón-Domínguez, G., Martínez Labat, P., & de-la-Rosa-Arana, J.-L. (2012). Determination of *Trichinella spiralis* in pig muscles using Mid-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (MID-FTIR) with Attenuated Total Reflectance (ATR) and Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA). *Meat Sci*, 91(3), 240-246.
- Gómez, M., & Lorenzo, J. M. (2012). Effect of packaging conditions on shelf-life of fresh foal meat. *Meat Sci*, 91(4), 513-520.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol*, 78(1–2), 79-97.
- Gribble, A., & Brightwell, G. (2013). Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campestris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. *Meat Sci*, 94(3), 361-368.
- Hadjibagher Kandi, M. N., & Sefidkon, F. (2011). The Influence of Drying Methods on Essential Oil Content and Composition of *Laurus nobilis* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(3), 302-308.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances In flavonoid Research since 1992. *Phytochemistry*, 55.
- Hassiotis, C. N., & Dina, E. I. (2011). The effects of laurel (*Laurus nobilis* L.) on development of two mycorrhizal fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(4), 628-634.
- Hayes, J. E., Stepanyan, V., O'Grady, M. N., Allen, P., & Kerry, J. P. (2010). Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quality indices and sensorial properties of raw and cooked pork stored in different packaging systems. *Meat Sci*, 85(2), 289-296.
- Hennia, A., Brada, M., Nemmiche, S., Fauconnier, M.-L., & Lognay, G. (2015a). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of Algerian *Myrtus communis* L. *Journal of Essential Oil Research*, 27(4), 324-328.
- Hennia, A., Brada, M., Nemmiche, S., Fauconnier, M.-L., & Lognay, G. (2015b). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of Algerian *Myrtus communis* L. *Journal of Essential Oil Research*, 27(4), 324-328.
- Hsouna, A. B., Hamdi, N., Miladi, R., & Abdelkafi, S. (2014). *Myrtus communis* Essential Oil: Chemical Composition and Antimicrobial Activities against Food Spoilage Pathogens. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, 11.
- <http://www.marones.pt/>. (2015). ACM - Associação de Criadores do Maronês. In, vol. 2015).
- Huang, B., He, J., Ban, X., Zeng, H., Yao, X., & Wang, Y. (2011). Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. *Meat Sci*, 87(1), 46-53.

- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*, 3, 12.
- Ismail, A. A., R., C., P., A., & J., S. (2006). Infrared and Raman spectroscopy in Food Science. In T. Francis (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, vol. 1).
- ISO 4833. (1991). Microbiology -- General guidance for the enumeration of micro-organisms -- Colony count technique at 30 degrees C. In ISO (Ed.).
- ISO 5552. (1997). Meat and meat products- Detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* without resuscitation- MPN technique and colony-count technique. In ISO (Ed.).
- ISO 13681. (1995). Meat and meat products -- Enumeration of yeasts and moulds -- Colony-count technique. In).
- ISO 13720. (1995). Meat and meat products -- Enumeration of *Pseudomonas* spp. In ISO (Ed.).
- ISO 17410. (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic micro-organisms. In ISO (Ed.).
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Micoorganisms in Foods. In R. H. Dennis, Ph.D., Associates, San Marcos, California (Ed.), *Moern Food Microbiology* 7^a edition ed.): Food Science Text Series.
- Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013a). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 96-108.
- Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013b). Potential Application of Essential Oils as Natural Antioxidants in Meat and Meat Products: A Review. *Food Reviews International*, 30(1), 71-90.
- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., Guan, Y., Sumner, L. W., & Zhou, Z. (2014). Antifungal Activity of Citrus Essential Oils. *J Agric Food Chem*.
- Julianti, E., Jang, K. H., Lee, S., Lee, D., Mar, W., Oh, K.-B., & Shin, J. (2012). Sesquiterpenes from the leaves of *Laurus nobilis* L. *Phytochemistry*, 80, 70-76.
- Kadim, I. T., Mahgoub, O., Al-Marzooqi, W., Al-Ajmi, D. S., Al-Maqbali, R. S., & Al-Lawati, S. M. (2008). The influence of seasonal temperatures on meat quality characteristics of hot-boned, m. psoas major and minor, from goats and sheep. *Meat Sci*, 80(2), 210-215.
- Kawano, S., Fujisawa, H., Takada, T., & Shiroishi, T. (2015). Sparse principal component regression with adaptive loading. *Computational Statistics & Data Analysis*, 89, 192-203.
- Kerrihard, A. L., Pegg, R. B., Sarkar, A., & Craft, B. D. (2015). Update on the methods for monitoring UFA oxidation in food products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(1), 1-14.
- Khanmohammadi, M., Bagheri Garmarudi, A., & de la Guardia, M. (2013). Feature selection strategies for quality screening of diesel samples by infrared spectrometry and linear discriminant analysis. *Talanta*, 104, 128-134.
- Kodogiannis, V. S., Pachidis, T., & Kontogianni, E. (2014). An intelligent based decision support system for the detection of meat spoilage. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 34, 23-36.
- Konieczka, P., & Namieśnik, J. (2010). Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 1217(6), 882-891.

- Leygonie, C., Britz, T. J., & Hoffman, L. C. (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat Sci*, 91(2), 93-98.
- Limbo, S., Torri, L., Sinelli, N., Franzetti, L., & Casiraghi, E. (2010). Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Sci*, 84(1), 129-136.
- Liu, D., Sun, D.-W., Qu, J., Zeng, X.-A., Pu, H., & Ma, J. (2014). Feasibility of using hyperspectral imaging to predict moisture content of porcine meat during salting process. *Food Chemistry*, 152, 197-204.
- Liu, H., Zhou, D., Tong, J., & Vaddella, V. (2012). Influence of chestnut tannins on welfare, carcass characteristics, meat quality, and lipid oxidation in rabbits under high ambient temperature. *Meat Sci*, 90(1), 164-169.
- Lorenzo, J. M., & Gómez, M. (2012). Shelf life of fresh foal meat under MAP, overwrap and vacuum packaging conditions. *Meat Sci*, 92(4), 610-618.
- Luykx, D. M. A. M., & van Ruth, S. M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2), 897-911.
- Machado, M. d. F. F. (2013). *Aplicação da espectroscopia de infravermelho na análise de clones de azeitonas e azeites cv. "Cobrançosa" em dois estados de maturação*. Unpublished Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Maqsood, S., Benjakul, S., & Kamal-Eldin, A. (2012). Haemoglobin-mediated lipid oxidation in the fish muscle: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 28(1), 33-43.
- Mateus, J. C., & Russo-Almeida, P. A. (2015). Traceability of 9 Portuguese cattle breeds with PDO products in the market using microsatellites. *Food Control*, 47(0), 487-492.
- Medina-Meza, I. G., Barnaba, C., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2014). Effects of high pressure processing on lipid oxidation: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 1-10.
- Moura, D. M. (2014). *Caracterização da composição fenólica e da atividade antioxidante da casta Tinta Roriz*. Unpublished Relatório de estágio Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Nehir El, S., Karagozlu, N., Karakaya, S., & Sahin, S. (2014). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Extracted from *Laurus nobilis* L. Leaves by Using Solvent-Free Microwave and Hydrodistillation. *Food and Nutrition Sciences*, 05(02), 97-106.
- Nerin, C., Tovar, L., Djenane, D., Camo, J., Salafranca, J. S., Beltran, J. A., & Roncalés, P. (2006). Stabilization of Beef Meat by a New Active Packaging.pdf. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7840-7846.
- NF V 04-503. (1988). Dénombrement des Bactéries Lactiques. In N. Française (Ed.), 04-503).
- Nieminen, T. T., Vihavainen, E., Paloranta, A., Lehto, J., Paulin, L., Auvinen, P., Solismaa, M., & Björkroth, K. J. (2011). Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. *Int J Food Microbiol*, 144(3), 360-366.
- Nowak, A., Rygala, A., Oltuszek-Walczak, E., & Walczak, P. (2012). The prevalence and some metabolic traits of *Brochothrix thermosphacta* in meat and meat products packaged in different ways. *J Sci Food Agric*, 92(6), 1304-1310.
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Sci*, 78(1-2), 77-89.

- Okparanma, R. N., & Mouazen, A. M. (2013). Determination of Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) in Soils: A Review of Spectroscopic and Nonspectroscopic Techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*, 48(6), 458-486.
- Pereira, P., Bernardo-Gil, M. G., Cebola, M. J., Mauricio, E., & Romano, A. (2013). Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 83, 57-64.
- Pereira, P. C., Cebola, M. J., & Bernardo-Gil, M. G. (2009). Evolution of the yields and composition of essential oil from Portuguese myrtle (*Myrtus comunis* L.) through the vegetative cycle. *Molecules*, 14(8), 3094-3105.
- Peris, I., & Blázquez, M. A. (2015). Comparative GC-MS Analysis of Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.) Essential Oils in Commercial Samples. *International Journal of Food Properties*, 18(4), 757-762.
- Raharjo, Sofos, J. N., & Schmidt, G. R. (1992). Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. *J. Agric. Food Chem.*, 40(11).
- Rahkila, R., Nieminen, T., Johansson, P., Säde, E., & Björkroth, J. (2012). Characterization and evaluation of the spoilage potential of *Lactococcus piscium* isolates from modified atmosphere packaged meat. *Int J Food Microbiol*, 156(1), 50-59.
- Rajalahti, T., & Kvalheim, O. M. (2011). Multivariate data analysis in pharmaceuticals: A tutorial review. *International Journal of Pharmaceutics*, 417(1–2), 280-290.
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Nunes, M. L., & Marques, A. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Nat Prod Res*, 26(6), 518-529.
- Regulamento (CE) N.º 1441. (2007). Regulamento (CE) N.º 1441/2007 DA COMISSÃO de 5 de Dezembro de 2007. In *que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios*.
- Regulamento (CE) N.º 178/2002, D. P. E. E. D. C. (2002). que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. In J. O. d. C. Europeias (Ed.), *REGULAMENTO (CE) N.º 178/2002 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO*).
- Regulamento(CE) N° 853 do parlamento (2004). Estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem alimentar. In *Regulamento (CE) N° 853 do Parlamento*; , (pp. 1- 151).
- Reid, L. M., O'Donnell, C. P., & Downey, G. (2006). Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science & Technology*, 17(7), 344-353.
- Rezzi, S., Giani, I., Héberger, K., Axelson, D. E., Moretti, V. M., RENIERO, F., & Guillou, C. (2007). Classification of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) from 1 H NMR Lipid Profiling Combined with Principal Component and Linear Discriminant Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 55.
- Sabo, S. d. S., Vitolo, M., González, J. M. D., & Oliveira, R. P. d. S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.

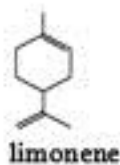
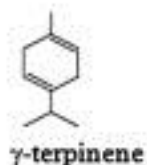
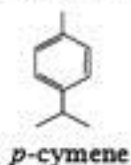
- Saraiva, C. M. T. (2008). Influência do pH final e tipo de embalagem na conservação de carne de bovino da raça maronesa. In). Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321-324.
- Sellami, I. H., Wannes, W. A., Bettaieb, I., Berrima, S., Chahed, T., Marzouk, B., & Limam, F. (2011). Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 126(2), 691-697.
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337-344.
- Shin, E.-C., Craft, B. D., Pegg, R. B., Phillips, R. D., & Eitenmiller, R. R. (2010). Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). *Food Chemistry*, 119(3), 1262-1270.
- Silveira, S. M. d., Luciano, F. B., Fronza, N., Cunha Jr, A., Scheuermann, G. N., & Vieira, C. R. W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 86-93.
- Skandamis, P., & Nychas, G. J. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011-1022.
- Suman, S. P., & Joseph, P. (2013). Myoglobin chemistry and meat color. *Annu Rev Food Sci Technol*, 4, 79-99.
- Sun, X. D., & Holley, R. A. (2012). Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf Life of Fresh Red Meats. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(4), 340-354.
- Tournas, V. H., Calo, J. R., & Memon, S. (2011). Comparison of the SimPlate yeast and mould color indicator to the BAM method for quantification of fungi in naturally-contaminated foods. *Food Control*, 22(5), 775-777.
- Troy, D. J., & Kerry, J. P. (2010). Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Sci*, 86(1), 214-226.
- Tuberoso, C. I. G., ANDREA BARRA, ALBERTO ANGIONI, ERIKA SARRITZU, & PIRISI, F. M. (2006). Chemical Composition of Volatiles in Sardinian Myrtle (*Myrtus communis* L.) Alcoholic Extracts and Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*
- Usai, M., Mulas, M., & Marchetti, M. (2015). Chemical composition of essential oils of leaves and flowers from five cultivars of myrtle (*Myrtus communis*L.). *Journal of Essential Oil Research*, 1-12.
- Uysal, B., Sozmen, F., Aktas, O., Oksal, B. S., & Kose, E. O. (2011). Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus Paradisi*. L) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7), 1455-1461.
- WHO. (2015). Food safety, microbiological risks. In): World Health Organization.
- Wu, Q. J., Dong, Q. H., Sun, W. J., Huang, Y., Wang, Q. Q., & Zhou, W. L. (2014). Discrimination of Chinese teas with different fermentation degrees by stepwise

- linear discriminant analysis (S-LDA) of the chemical compounds. *J Agric Food Chem*, 62(38), 9336-9344.
- Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12), 1249-1255.
- Yudthavorasit, S., Wongravee, K., & Leepipatpiboon, N. (2014). Characteristic fingerprint based on gingerol derivative analysis for discrimination of ginger (*Zingiber officinale*) according to geographical origin using HPLC-DAD combined with chemometrics. *Food Chemistry*, 158, 101-111.
- Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Sci*, 86(1), 119-128.
- Zomorodian, K., Moein, M., Lori, Z. G., Ghasemi, Y., Rahimi, M. J., Bandegani, A., Pakshir, K., Bazargani, A., Mirzamohammadi, S., & Abbasi, N. (2013). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from *Myrtus communis* Leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(1), 76-84.
- Zór, K., Dymek, K., Ortiz, R., Faure, A. M., Saatci, E., Gorton, L., Bardsley, R., & Nistor, M. (2012). Indirect, non-competitive amperometric immunoassay for accurate quantification of calpastatin, a meat tenderness marker, in bovine muscle. *Food Chemistry*, 133(2), 598-603.

Anexo 1

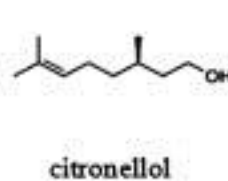
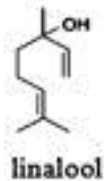
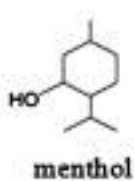
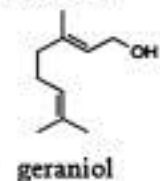
1. Terpenes

Carbures

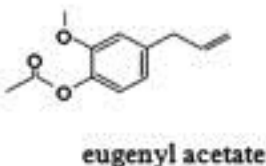
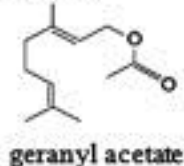


2. Terpenoids

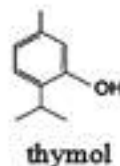
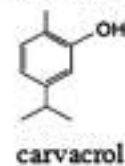
Alcohols



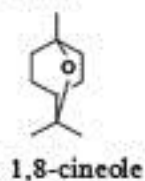
Esters



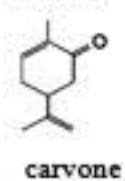
Phenols



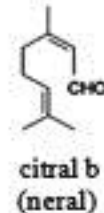
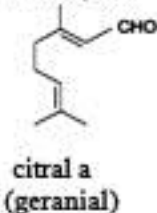
Ether



Ketone

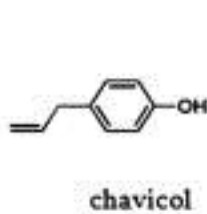
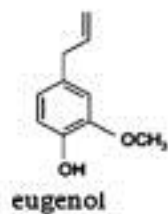


Aldehydes

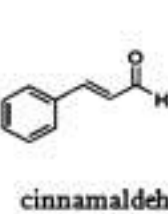


3. Aromatic compounds (Phenylpropanoids)

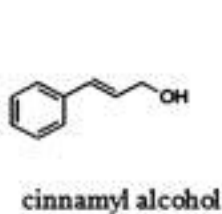
Phenols



Aldehyde



Alcohol



Methoxy derivatives

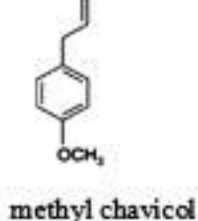
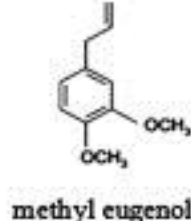
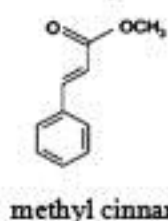


Figura 68: Estrutura química dos compostos principais dos óleos essenciais (Bakkali, *et al.*, 2008; Jayasena e Jo, 2013a)

Anexo 1I

ANÁLISE SENSORIAL DE Hambúrguer Nome _____ código _____ Assinale com um X	
COR	
Rosa pálido	
Vermelho	
Beje/ castanho	
CHEIRO a deteriorado (Intensidade)	
Pouco intenso	Muito intenso
Quais os CHEIRO (S) que detectou (Intensidade):	
Adocicado	
+ a manteiga	
a ranço	
Acídico	
Amoniacal	
Pútrido	
APRECIÇÃO GLOBAL de frescura	
Muito deteriorada	Muito fresca

Figura 69: Ficha de análise sensorial